

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Funktionsanalyse des cRNA-Promotors des Influenza A-Virus
und der Aufbau eines *Ambisense*-Transkriptionssystems**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) durch die Naturwissenschaftlichen
Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Maysa Azzeh

Gießen, August 2000

Dekan	Prof. Dr. R. Renkawitz
1. Gutachter	Prof. Dr. Dr. G. Hobom
2. Gutachter	Prof. Dr. T. Chakraborty

für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I MUTANTEN-INDEX.....	1
II OLIGONUKLEOTIDE-INDEX.....	3
III ABKÜRZUNGEN.....	5
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Geschichtlicher Überblick.....	8
1.2 Klassifizierung der Influenza-Viren.....	9
1.3 Vielfalt der Influenza-Viren.....	10
1.4 Influenza A-Virus.....	12
1.4.1 Aufbau.....	12
1.4.2 Die RNA-Segmente.....	13
1.4.2.1 Segmente 1-3: Der Polymerasekomplex PB1, PB2 und PA.....	14
1.4.2.2 Segment 4: Hämagglutinin (HA).....	15
1.4.2.3 Segment 5: Das Nukleoprotein (NP).....	16
1.4.2.4 Segment 6: Neuraminidase (NA).....	17
1.4.2.5 Segment 7: Das Matrixprotein M1 und das Porenprotein M2.....	18
1.4.2.6 Segment 8: Die nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2.....	19
1.4.3 Der genomische Aufbau der RNA-Segmente.....	21
1.4.3.1 Der vRNA-Promotor.....	21
1.4.3.2 Der cRNA-Promotor.....	23
1.5 Infektionszyklus.....	24
1.5.1 Rezeptor-Bindung und Virus-Endocytose.....	24
1.5.2 Transkription und Replikation.....	25
1.5.3 Verpackung und Ausknospung.....	27
1.6 Protektives und therapeutisches Vorgehen bei der Influenza-Infektion.....	28
1.7 Reverse Genetik von Influenza-Viren.....	30
1.7.1 Das <i>in vivo</i> Polymerase I-Transkriptionssystem.....	30
1.8 Ziel dieser Arbeit.....	33
2 MATERIAL UND METHODEN.....	35
2.1 Bakterienkulturen.....	35
2.1.1 Bakterienstämme.....	35
2.1.2 Nährmedien und Nährböden für <i>E.coli</i>	35

2.1.3 Anlegen von stabilisierten Glycerinkulturen (<i>stabs</i>).....	36
2.2 Klonierung und Analyse von DNA-Molekülen.....	36
2.2.1 Plasmide und Vektoren.....	36
2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der Minilysatmethode.....	36
2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Qiagen® Midipräparation.....	38
2.2.4 RNase A-Behandlung.....	40
2.2.5 Aufreinigung von DNA-Molekülen.....	40
2.2.5.1 Alkoholfällung.....	40
2.2.5.2 Phenolextraktion.....	41
2.2.5.3 Adsorption an Glasmilch (<i>gene clean</i> -Verfahren).....	41
2.2.5.4 Aufreinigung von amplifizierten DNA-Molekülen.....	42
2.2.6 Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	42
2.2.6.1 Analytische Spaltung mittels Restriktionsenzymen.....	43
2.2.6.2 Präparative Spaltung mittels Restriktionsenzymen.....	43
2.2.6.3 Partielle Spaltung mittels Restriktionsenzymen.....	44
2.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	44
2.2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.2.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.2.8 Fragmentgrößenstandard.....	46
2.2.9 Färben und Fotografieren der Gele.....	46
2.2.10 Isolierung von DNA-Molekülen aus Gelen.....	47
2.2.10.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	47
2.2.10.2 Diffusion von DNA-Molekülen aus Polyacrylamidgelen.....	47
2.2.11 DNA-Modifikation und –Ligation.....	47
2.2.11.1 Ligationsreaktion.....	47
2.2.11.2 Phosphatase-Reaktion.....	48
2.2.11.3 Auffüllreaktion mit Hilfe der Klenow-Polymerase (<i>fill-in</i> -Reaktion)....	49
2.2.11.4 T4-Polymerase.....	49
2.2.11.5 <i>Tailing</i> -Reaktion.....	50
2.2.12 Bakterientransformation.....	51
2.2.12.1 Klassische CaCl ₂ -Methode.....	51
2.2.12.2 Transformation nach der RbCl ₂ -Methode.....	52

2.2.13 DNA-Sequenzierung.....	53
2.2.13.1 Sequenzierung nach Sanger.....	53
2.2.13.1.1 Denaturierung doppelsträngiger Plasmid-DNA.....	54
2.2.13.1.2 Sequenzierungsreaktion.....	54
2.2.13.1.3 Herstellung eines Sequenzgels.....	56
2.2.13.2 Automatische DNA-Sequenzierung.....	57
2.2.14 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR-Methode nach K.B. Mullis).....	58
2.2.14.1 <i>Hot-Start</i> -PCR.....	59
2.2.15 Synthetische Oligonukleotide (<i>Primer</i>).....	61
2.3 RNA-Methoden.....	62
2.3.1 Präparation von RNA-Molekülen aus eukaryoten Zellen.....	62
2.3.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	62
2.3.1.2 Isolierung von mRNA-Molekülen.....	62
2.3.2 Präparation viraler RNA-Molekülen.....	63
2.3.3 Auftrennung von RNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	63
2.3.4 Reverse Transkription mit MMLV-RT.....	64
2.4 Zellkultur.....	66
2.4.1 Zelllinien.....	66
2.4.2 Kultivierung von Gewebekulturen.....	66
2.4.3 Trypsinbehandlung zur Ausdünnung von Gewebekulturzellen.....	66
2.4.4 DNA-Transfektion in eukaryoten Zellen.....	67
2.4.5 Virusvermehrung.....	68
2.4.5.1 Herstellung von Virusstammlösung durch Zellinfektion.....	68
2.4.6 Hämagglutinationstest.....	69
2.4.7 Plaque-Test.....	69
2.4.8 Primärinfektion und Passage.....	70
2.4.9 Virale RNA aus Hämadsorption-gereinigten Viren.....	70
2.5 Reporter-gen-Nachweisverfahren.....	71
2.5.1 Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT).....	71
2.5.2 Grün-fluoreszierendes Protein (GFP).....	72
2.5.3 β -Galaktosidase.....	73
3 ERGEBNISSE.....	75
3.1 Einführung.....	75
3.1.1 CAT-Expressionsrate des positiven Kontrollkonstruktes pHL1844.....	78

3.2 Längenabhängigkeit der Inkorporation von rekombinanten vRNA-Molekülen	
in Influenza A-Viren.....	80
3.2.1 Verlängerung des kodierenden Segmentbereiches auf 3000 und 4000	
Nukleotide.....	80
3.2.2 Einfluss der Polymerase-Untereinheiten und des NP-Proteins auf die	
Transkription verlängerten Segmente.....	83
3.2.3 Versuche zur Optimierung des 3'-verlängerten vRNA-Fremdsegmentes.....	86
3.2.4 Inkorporation langkettiger fremder vRNA-Moleküle am Beispiel des	
β-Galaktosidase-Gens aus <i>E.coli</i>	88
3.3 Mutationsanalyse des cRNA-Promotors.....	89
3.3.1 Einführung.....	89
3.3.2 Expressionsanalyse des 1104-analogen cRNA-Promotors.....	95
3.3.3 Analyse des proximalen cRNA-Promotorabschnittes.....	96
3.3.3.1 Einzelsubstitutionen und nichtkompensierende Doppelsubstitutionen	
innerhalb des proximalen cRNA-Promotors.....	98
3.3.3.2 Kompensierende Doppelsubstitutionen innerhalb des proximalen	
cRNA-Promotors.....	103
3.3.4 Analyse des distalen cRNA-Promotorabschnittes.....	107
3.4 Analyse des 5'-Endes der cRNA-Transkriptions- und Replikationsprodukte.....	109
3.5 Variationen in den cRNA-Konstrukten.....	115
3.5.1 Aufbau eines pHL2583 analogen Konstruktes.....	115
3.5.2 Aufbau eines cRNA-Konstruktes mit positiv orientiertem CAT-Reportergen..	117
3.6 Kombination von cRNA- und vRNA-Molekülen zu <i>ambisense</i> Molekülen.....	119
3.6.1 CAT-Expression in den <i>ambisense</i> Konstrukten.....	124
3.6.1.1 vRNA- und cRNA-Promotoraktivität im 1104- <i>ambisense</i> Promotor-	
system.....	126
3.6.1.2 CAT-Aktivität des cRNA- und vRNA-Promotors in den CAT-GFP	
<i>ambisense</i> Konstrukten.....	128
3.6.2 Variation in der Promotorregion von <i>ambisense</i> Konstrukten.....	131
3.6.3 GFP-Expression der <i>ambisense</i> Segmente.....	133
3.7 GFP-Expression: Transfektionskontrolle.....	135
3.8 Einfluss der Konzentration des Nukleoproteins (NP) auf die Transkription und	
Replikation von Influenza A-Segmenten.....	137

3.8.1 Einfluss der Konzentration des Nukleoproteins (NP) auf die Transkription und Replikation von cRNA-Konstrukten.....	138
3.8.2 Einfluss der NP-Konzentration auf die Transkription und Replikation der <i>ambisense</i> Segmente.....	139
4 DISKUSSION.....	142
4.1 Einführung.....	142
4.2 Längenabhängigkeit der Transkription, Replikation und Verpackung von rekombinanten vRNA-Molekülen.....	143
4.3 Konstruktion der cRNA für die Transkription.....	146
4.4 Aktivitätsanalyse des cRNA-Promotors in der Transkription.....	148
4.5 Die aktive Struktur des cRNA-Promotors.....	150
4.6 Die <i>ambisense</i> Konstruktion bicistronischer RNA-Segmente.....	154
4.7 Verpackung und Passage der Fremdsegmente.....	157
4.8 Interaktion der viralen RNA-Polymerase und NP mit dem cRNA-Promotor.....	159
4.8.1 Vergleich der cRNA- bzw. vRNA-Promotor-Wechselwirkung mit der viralen RNA-Poylmerase.....	159
4.8.2 Einfluss der NP-Konzentration auf die Transkription und Replikation der cRNA und der vRNA.....	161
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	163
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	165

I MUTANTEN-INDEX

pHL-Mutante	Seite
pHL2583	90, 92, 93-95 u.a.
pHL2630	82, 84-86
pHL2640	80, 82, 84-87
pHL2641	86, 87
pHL2651	80- 82, 84, 85
pHL2620	88
pHL2706	117, 118
pHL2721	115, 116
pHL2708	90, 94
pHL2891	120, 124, 125, 127
pHL2899	120, 124, 125
pHL2900	120, 124, 125
pHL2903	120, 124, 125, 127
pHL2950	88
pHL2957	125, 127, 130
pHL2959	125, 127, 130
pHL2989	125, 130
pHL2960	125, 130
pHL2968	86, 87
pHL3006	131, 132
pHL3010	115, 116
pHL3106	131, 132
pHL3107	131, 132
pHL3123	104
pHL3124	108
pHL3126	108
pHL3127	99
pHL3128	100
pHL3132	108
pHL3145	128-130
pHL3157	128-130

pHL3161	100
pHL3162	100
pHL3163	99
pHL3164	99
pHL3165	105
pHL3208	99
pHL3209	104
pHL3210	104
pHL3211	99
pHL3212	100
pHL3213	105
pHL3214	105
pHL3217	108
pHL3226	104
pHL3227	104
pHL3228	104

II OLIGONUKLEOTIDE-INDEX: M_x

5'-McWT: 5'-TATTAGCAAAAGCAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-McWT: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGCTTTTGCT-3'

5'-M1a: 5'-TATTAGAAGAATCAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M1b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGATTCTTCT-3'

3'-M2a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGATTCTTC-3'

3'-M2b: 5'-GGGAGAAGAATCAAGTGAGACGTCTCACCCCTGTTTCTACT-3'

5'-M3a: 5'-TATTAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M3b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCTTGTTCCTACT-3'

3'-M4a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCATTGTTCCTAC-3'

3'-M4b: 5'-GGGAGTAGAAACAATGAGACGTCTCACCCCTGTTTCTACT-3'

5'-M5a: 5'-TATTAGAAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M5b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGTTTCTTCT-3'

3'-M6a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGATTCTAC-3'

3'-M6b: 5'-GGGAGTAGAATCAAGTGAGACGTCTCACCCCTGTTTCTACT-3'

3'-M7a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGCTTCTAC-3'

3'-M7b: 5'-GGGAGTAGAAGCAAGTGAGACGTCTCACCCCTGTTTCTACT-3'

3'-M8a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGGTTCTTC-3'

3'-M8b: 5'-GGGAGAAGAACCAAGTGAGACGTCTCACCCCTGTTTCTACT-3'

5'-M9a: 5'-TATTAGTAGAAGCAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M9b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGCTTCTACT-3'

5'-M10a: 5'-TATTAGAAGAACCAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M10b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGGTTCTTCT-3'

5'-M11a: 5'-TATTAGCAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M11b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGTTTCTGCT-3'

5'-M12a: 5'-TATTAGCAGAAGCAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M12b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGCTTCTGCT-3'

5'-M13a: 5'-TATTAGGAGAACCAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M13b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGGTTCTCCT-3'

5'-M14a: 5'-TATTAGTAGAATCAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTCCTAC-3'

5'-M14b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCCCTGATTCTACT-3'

3'-M15a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTTCTGC-3'

3'-M15b: 5'-GGGAGCAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCTGTTTCTACT-3'

3'-M16a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGCTTCTGC-3'

3'-M16b: 5'-GGGAGCAGAAGCAAGTGAGACGTCTCACCTGTTTCTACT-3'

3'-M17a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGGTTCTCC-3'

3'-M17b: 5'-GGGAGGAGAACCAAGTGAGACGTCTCACCTGTTTCTACT-3'

5'-M18a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCACTTGTTTCTAC-3'

5'-M18b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCTGTTTCTACT-3'

3'-M19a: 5'-TATTAGTAGAAACAGGGTGAGACGTCTCAGTTGTTTCTAC-3'

3'-M19b: 5'-GGGAGTAGAAACAAGTGAGACGTCTCACCTGTTTCTACT-3'

III. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
A	Adenosin; Ampere
AA	Acrylamid
AA-bis	N, N-Methylenbisacrylamid
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adeninriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CAM	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cRNA	<i>complementary</i> RNA
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CoA	CoEnzym A
CPE	cytopathischer Effekt
CTP	Cytosinriphosphat
d	Desoxy-
dd	Didesoxy-
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco minimal essential medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOPE	Dioleoyl phosphatidylethanolamine
DOSPA	2,3-Dioleoyoxy-N-2[(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin
GTP	Guanosinriphosphat

h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
M	Molar
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	N-Morpholinopropansulfansäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pfu	<i>plaque forming unit</i>
pH	pontus hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration)
p ^{lh}	RNA-Polymerase I-Promotor (human)
p ^{ICMV}	RNA-Polymerase II-Promotor (Cytomegalie Virus)
p ^{lm}	RNA-Polymerase I-Promotor (murin)
pmol	Picomol
PolI	RNA-Polymerase I
PolII	RNA-Polymerase II
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris-borate/EDTA-Puffer
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N,-Tetramethyldiamin

Thr	Threonin
t ₁	Terminator der RNA-Polymerase I
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
vRNA	virale RNA
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewichtprozent
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Geschichtlicher Überblick

Influenza, die Grippe, gehört zu den häufigsten Krankheiten der Menschen. Dies macht die Erforschung dieser Krankheit um so dringender und bedeutsamer. Die Symptome einer Influenza-Infektion (verstopfte Nase, trockener Husten, Schüttelfrost, Fieber, Gliederschmerzen u.a.) sind schon von Hippocrates 412 vor Christus beschrieben worden. Von diesen Symptomen ausgehend kann es fortschreitend auch zu ernsthaften Erkrankungen wie Tracheobronchitis und Pneumonie kommen. Eine Grippe-Erkrankung ist fast immer von einer bakteriellen Infektionen begleitet.

Eine Influenza-Pandemie breitet sich von Zeit zu Zeit aus und kann eine Welle von Krankheit und Tod verursachen, wie die Pandemien von 1889, 1900, 1918/1919 (spanische Grippe), 1957 (asiatische Grippe), 1968 (Hongkong-Grippe) und 1977 (russische Grippe) zeigten. Die spanische Grippe forderte mehr als 20 Millionen Todesopfer. Heute weiß man, dass diese Pandemien von verschiedenen, aber verwandten humanpathogenen Influenza-Stämmen verursacht worden sind, die durch genetischen Austausch mit Schweine- und Geflügelpathogenen Stämmen neu entstanden waren. In Hong Kong wurde 1997 ein weiteres Influenza-Virus direkt von befallenem Geflügel auf den Menschen übertragen und war damit eine Warnung, dass diese Krankheit selbst im neuen Jahrhundert noch außer Kontrolle geraten kann.

Im Jahre 1900 wurde das erste Influenza-Virus, das Fowl Plague Virus (FPV), von Cennani und Savunozzi isoliert. Dieses Virus galt als Erreger der Geflügelpest, und es zeigte sich erst später, dass es antigene und strukturelle Verwandtschaft mit den humanpathogenen Influenza-Viren besitzt. Erst 1933 gelang es den Briten W. Smith, C. H. Andrews und P. P. Laidlaw, das erste humanpathogene Influenza-Virus zu isolieren.

1.2 Klassifizierung der Influenza-Viren

Ein Virion besteht aus der Nukleinsäure, dem Kapsid und evtl. einer Hülle. Die Kapsid-symmetrie, die Art der Nukleinsäure, der Durchmesser des Virions und das Vorhandensein oder Fehlen einer Hülle u.a. sind die Kriterien für eine systematische Einteilung der Viren.

Das Influenza-Virus gehört der Familie der Orthomyxoviridae an (Lamb und Krug, 1996). Viren dieser Familie besitzen ein einzelsträngiges segmentiertes RNA-Genom negativer Polarität, umgeben vom umhüllten Matrixprotein. Die verschiedenen Viren mit einem RNA-Genom negativer Polarität fasst man auch als Negativstrang-RNA-Viren zusammen. Sie besitzen eine eigene RNA-Polymerase, die nach der Infektion der Replikation und Transkription des Virus-Genoms dient.

Ein Influenza-Virion hat einen Durchmesser von 110 nm und zeichnet sich durch erheblichen Pleomorphismus aus. Neben einer Mehrzahl von sphärischen Partikeln unterschiedlicher Größe sind auch filamentöse Formen im Elektronenmikroskop zu beobachten.

Die Virus-Hülle stammt aus der Membran der Wirtszelle (Compans *et al*, 1975) und trägt stachelförmige Fortsätze, die „Spikes“. Hierbei handelt es sich um die viruseigenen Glykoproteine, Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). HA macht die Adsorption des Virus an die Wirtszelle möglich, während NA für die Freisetzung der einzelnen Virus-Nachkommen verantwortlich ist. Ursprünglich basierend auf antigenen Unterschieden in dem Nukleoprotein (NP) und dem Matrixprotein (M) werden die Influenza-Viren in drei typenspezifische Gruppen (A, B und C) eingeteilt. Influenza A und B haben je 8 RNA Segmente, die für ein oder zwei Gene kodieren, während Typ C nur 7 solcher Segmente besitzt. Influenza-A wird weiter nach der HA und NA Proteinvariation unterschieden (Webster *et al*, 1982). Die Wirtsquelle, der Ursprungsort, die Stamm-Nummer und das Jahr der Isolierung müssen für die Bezeichnung des Virus-Subtyps angegeben werden (z. B. A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1)). Bei NA sind bis jetzt 9 Aminosäure-Ausgangsvarianten bekannt, bei HA hat man sogar 15 Grundvarianten gefunden (Scholtissek *et al*, 1978). Bedingt durch eine hohe Mutationsrate („genetic drift“, s.u.) können die einzelnen Virus-Isolate von der Sequenz des jeweiligen Grundtyps noch in unterschiedlichem Ausmaß abweichen.

1.3 Vielfalt der Influenza-Viren

Wie man aus der Klassifizierung sieht, handelt es sich bei dem Influenza-Virus nicht um ein und dasselbe Virus mit jeweils der gleichen genetischen Zusammensetzung. Influenza-C scheint keine ernsthafte Erkrankung hervorzurufen. Die weniger variablen Influenza B-Viren befallen ausschließlich den Menschen, zumeist im Kindesalter, und erzeugen eine lebenslange Immunität. Sie verursachten bis jetzt nur regional beschränkte Grippewellen. Aufgrund ihrer Vielfalt in HA und NA befallen die Influenza A-Viren sowohl Geflügel wie Menschen und einige andere Säuger (Schweine, Pferde, Wale). Dabei hat jeder Subtyp sein eigenes Wirtsspektrum, aber die schon erwähnten genetischen Änderungen können dazu führen, dass ein Subtyp auf eine andere Spezies übertragen wird („genetic shift“). Alle Grippe-Pandemien des 20. Jahrhunderts gehen auf solche sprunghaften Veränderungen der Influenza A-Viren zurück.

Diese Variabilität des Virus fordert stets das Immunsystem heraus, denn auch kleine genetische Änderungen werden möglicherweise von dem bestehenden Immunschutz nicht erfaßt und können damit eine erneute Krankheit verursachen. Deswegen müssen Influenza-Vakzinen jedes Jahr anhand der gerade zirkulierenden Subtypen neu hergestellt werden. Diese Vielfalt beruht auf zwei Eigenschaften des Influenza A-Virus: die Fähigkeit zum „Antigen-Shift“ und zum „Antigen-Drift“ (Kilbourne, 1979; Kilbourne, 1987; Webster *et al.*, 1982).

Bei dem „Antigen-Drift“ handelt es sich um spontane Mutationen (Nukleotid-Substitutionen) in den RNA-Segmenten, die auch in Influenza-B vorkommen. Solche Mutationen können insbesondere dazu führen, dass die HA- und NA-Glykoproteine sich in ihrer Oberfläche verändern. Das kann die Infektiosität des betreffenden Virus beeinträchtigen, wenn die neuen Mutationen z.B. beim HA seine Bindung an die Wirtszelle verhindern. Die Sequenzveränderungen können aber auch die Infektiosität erhöhen, wenn die Struktur des Oberflächen-Proteins HA im Einzelfall so stark von dem bisher zirkulierenden Antigenotyp abweicht, dass eine neue Immunabwehrreaktion hervorgerufen werden muß. Das wird jedoch nicht bei jedem Menschen dank der breiteren Spezifität der vorbestehenden Antikörperpopulation der Fall sein, und die Veränderungen dieser Kategorie werden daher zu keiner Pandemie führen. Dennoch führte 1983 eine Antigen-Drift in Pennsylvania zu Riesenverlusten auf den Hühnerfarmen. Es ist bekannt, dass Influenza-Viren bei Säugern die

Atemwege, bei Vögeln hingegen normalerweise den Darmtrakt befallen. In Pennsylvania Fall aber hatten sich die Viren im ganzen Körper der Hühner vermehrt. Webster und seine Arbeitsgruppe stellten fest, dass eine Punktmutation in der HA-Sequenz des Virus stattgefunden hatte. Im Verlauf der Infektion muß das HA-Vorläuferprotein in zwei Fragmente HA₁ und HA₂ gespalten werden, was von bestimmten Serin-Proteasen katalysiert wird. Diese Proteasen kommen nur in den Atemwegen der Säuger und im Darmtrakt der Vögel vor, wo sich deshalb im Regelfall die Infektion ausbreiten kann. Die in Pennsylvania aufgetretene Mutation führte jedoch dazu, dass das HA auch für andere, im Körper weit verbreitete Proteasen spaltbar wurde. Damit erklärt sich die Ausbreitung der Viren im gesamten Hühnerkörper.

Der „Antigen-Shift“ kommt dadurch zustande, dass zwei verschiedene Influenza A-Viren eine Zelle gleichzeitig befallen und ihre Gen-Segmente vermischen und diese teils aus dem einen, teils aus dem anderen Vorläufervirus an die Virus-Nachkommen weitergeben. Viren, die auf diese Weise neue genetische Zusammensetzung der HA und NA Gene aufweisen (Tabelle 1.1), werden von dem Immunsystem der allermeisten Individuen des neuen Wirtes nicht erkannt, so dass die Infektion eine Pandemie auslöst. Bei dem „Antigen-Shift“ von einem Geflügel-Virus auf ein humanpathogenes Virus wird das neu kombinierte Virus nun den Menschen infizieren, wie dies in Singapur 1957 oder in Hong Kong 1968 geschah.

Tabelle 1.1: Die bekanntesten Pandemien des Jahrhunderts, ihr Vorkommen und die Antigenkombination der verantwortlichen Influenza A-Viren

Alle diese Pandemien wurden durch einen Antigen-Shift aus dem aviären Reservoir, vor allem bei der Ente, hervorgerufen (Lamb & Krug, 1996).

Jahr	Grippe	Antigenkombination
1889	Nicht bekannt	H2N2
1900	Nicht bekannt	H3N8
1918	Spanische: Grippe-Pandemie	H1N1
1957	Asiatische: Grippe-Pandemie	H2N2
1968	Hong Kong: Grippe-Pandemie	H3N2
1977	Russische: Grippe-Epidemie	H1N1
1997	Hong Kong	H5N1

1.4 Influenza A-Virus

1.4.1 Aufbau

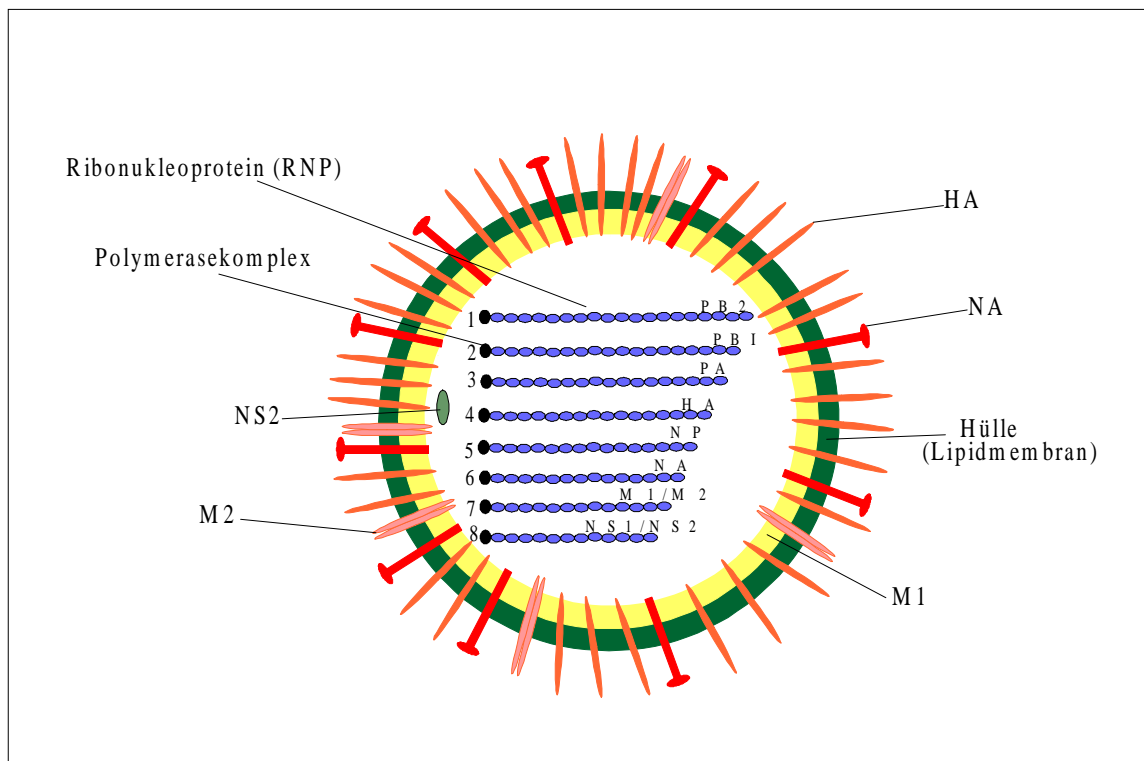


Abb. 1.1: Aufbau eines Influenza A-Virus

Wie schon erwähnt, besitzt das Influenza A-Virus 8 RNA-Segmente, die verbunden mit Nukleoprotein und Polymerase als RNP-Komplex vorliegen, umgeben von der Matrix, die ihrerseits von einer Hülle (Lipidmembran) umgeben ist. Bei den Oberflächenproteinen handelt es sich um Integralproteine: das HA, kodiert von Segment 4, das NA, kodiert von Segment 6, und das M2, kodiert von der gespleißten mRNA des Segmentes 7. Das Matrixprotein M1 wird ebenfalls von Segment 7 kodiert und ist die formgebende Komponente des Influenza-Virus. Die Phospholipidhülle stammt aus der Membran der Wirtszelle, sie ist jedoch frei von zellulären Glykoproteinen.

1.4.2 Die RNA-Segmente

Die Segmente sind ihrer Nukleotidgröße nach von 1 bis 8 durchnummeriert. Jedes Segment kodiert für ein oder zwei Proteine (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Die RNA Genomsegmente und die daraus resultierenden Proteine beim Influenza A-Virus am Beispiel A/PR/8/34 (H1N1) (Lamb & Krug, 1996)

Segment	Anzahl der Nukleotide; Gesamtlänge	Kodiertes Protein	Anzahl der Aminosäuren	Anzahl der Moleküle pro Virion
1	2341	PB2	759	30-60
2	2341	PB1	757	30-60
3	2233	PA	716	30-60
4	1778	HA	566	500
5	1565	NP	498	1000
6	1413	NA	454	100
7	1027	M1	252	3000
		M2	97	20-60
8	890	NS1	230	-
		NS2	121	130-200

Segment 1 kodiert für PB2, 2 für PB1, 3 für PA. Zusammen bilden PB1, PB2 und PA den viralen RNA-Polymerasekomplex. Segment 4 kodiert für das Oberflächenprotein HA, Segment 5 für das Nukleoprotein NP und Segment 6 für das Oberflächenprotein NA. Durch partielles Spleißen entstehen aus den Segmenten 7 und 8 jeweils 2 Proteine, das Matrix-Protein M1 und das Porenprotein M2 bei Segment 7, die nicht-strukturellen Proteine NS1 und NS2 bei Segment 8. Es wurde allerdings gezeigt, dass NS2 doch in geringen Mengen im Virion vorliegt (Richardson *et al.*, 1991; Yasuda *et al.*, 1993), man ist aber bei der NS-Benennung geblieben. Neuerdings ist der Name NEP unter Hinweis auf die Funktion als nukleäres Exportprotein vorgeschlagen worden (O'Neill *et al.*, 1998).

1.4.2.1 Segmente 1-3: Der Polymerasekomplex PB1, PB2 und PA

Die virale RNA-Polymerase setzt sich aus den Untereinheiten PB1, PB2 und PA zusammen, die von den drei größten RNA-Segmenten kodiert werden (Inglis *et al.*, 1976; Lamb & Choppin, 1976). Die drei Proteinketten wurden nach ihrem Verhalten bei der isoelektrischen Gelelektrophorese bzw. Fokussierung benannt: bei den PB-Proteinen nach ihrer Position im basischen Bereich, bei dem PA-Protein nach seiner Position im sauren Bereich (*acidic*) und als P-Proteine zusammengefaßt (Murti *et al.*, 1980; Braam *et al.*, 1983; St. Angelo *et al.*, 1987; Krug *et al.*, 1989). Gemeinsam bilden die drei P-Proteine einen heterotrimeren Polymerase-Komplex. Dieser Komplex läßt sich im Zellkern infizierter Zellen nachweisen (Jones *et al.*, 1986). Nach der Synthese im Cytoplasma werden die P-Proteine in den Zellkern transportiert, hierfür sind bestimmte Kern-Transportsignale identifiziert worden (Jones *et al.*, 1986; Mukaigawa & Nayak, 1991). Der Polymerase-Komplex spielt die zentrale katalytische Rolle bei den Synthese-Reaktionen des Virus. So wird die negativ orientierte virale RNA (vRNA) in mRNA transkribiert (Hay *et al.*, 1977; Plotch *et al.*, 1981). Zur Replikation wird die vRNA in die positiv orientierte komplementäre RNA (cRNA) überführt, die wiederum zur vRNA repliziert wird (Young & Content, 1971; Hay *et al.*, 1982).

Jede der Polymerase-Untereinheiten hat bei diesen Aktivitäten eine eigene Funktion. PB2 erkennt die 5'-cap-Struktur ($m^7GpppNm$) der zellulären mRNA (Ulmanen *et al.*, 1981, 1983; Blaas *et al.*, 1982a, 1982b; Braam *et al.*, 1983; Nakagawa *et al.*, 1995). Durch ihre Endonuklease-Aktivität spaltet PB2, bevorzugt nach einem Purin-Rest (Bouloy *et al.*, 1978; Plotch *et al.*, 1981; Seong & Brownlee, 1992b), 9-15 Nukleotide vom 5'-Ende einer neu synthetisierten mRNA ab. Dieses Oligonukleotid wird dann von der viralen RNA-Polymerase als Primer (Startermolekül) für die virale mRNA-Synthese benutzt. PB1 ist die eigentliche katalytische Untereinheit im Polymerase-Komplex und zeigt eine hohe Affinität für RNA-Moleküle. Sie verlängert (Elongation) die Oligonukleotid-gestartete mRNA durch ihre Syntheseleistung (Braam *et al.*, 1983). Später, bei der Replikation, katalysiert sie die Synthese von cRNA und vRNA. Die Funktion der PA-Untereinheit ist noch nicht genau definiert, aber Beobachtungen von PA-Mutanten lassen vermuten, dass sie indirekt an der vRNA-Synthese beteiligt ist (Krug *et al.*, 1975; Mahy *et al.*, 1983). Fest steht, dass die PA Untereinheit zwar nicht für die Synthese-Aktivität *in vitro* erforderlich ist, dennoch ist sie für die maximale Synthese-Aktivität *in vivo* bedeutsam (Nakagawa *et al.*, 1996). Weiterhin wird vermutet, dass

PA in phosphorylierter Form eine bedeutsame Rolle beim Umschalten von der Transkription zur Replikation spielt (Perales *et al.*, 2000).

1.4.2.2 Segment 4: Hämagglutinin (HA)

Das RNA-Segment 4 kodiert für das Hämagglutinin. Aufgrund seiner Lage an der Oberfläche des Virus kommt HA als erstes, neben NA, mit der Wirtszelle in Kontakt. Es ist das Hauptantigen, gegen das die Mehrzahl der Antikörper gebildet wird, und spielt somit die Hauptrolle in der Infektiosität des Virus. Mutationen im HA können dazu führen, dass dem Immunsystem ständig neue Influenza-Antigene präsentiert werden.

HA hat die Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren und erhielt von daher seinen Namen. Es bindet an Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure)-haltige Glykoproteinrezeptoren an der Oberfläche der Wirtszelle, so dass das Virus sich an die Cytoplasmamembran anheftet. Für diese Aktivität ist zuvor die proteolytische Spaltung des HA-Vorläufermoleküls (HA₀) in zwei kleinere, mit Disulfidbrücken noch verbundene Polypeptide HA₁ und HA₂ erforderlich (Klenk *et al.*, 1975; Segal *et al.*, 1992). Besitzt das HA an der Spaltstelle einen einzigen Argininrest, wie das bei den humanpathogenen Stämmen der Fall ist, so erfolgt diese Spaltung extrazellulär mit Hilfe von Trypsin-ähnlichen Enzymen, gefolgt von der Einwirkung einer Exopeptidase (Dopheide & Ward, 1978; Garten *et al.*, 1981). Liegt dagegen die Sequenz R-X-K/R-R, eine Furin-Erkennungssequenz, in der Spaltstelle vor, so erfolgt die proteolytische Spaltung bereits intrazellulär während der Bildung der Virionen mit Hilfe der membranständigen Protease Furin. Der zweite Fall kommt bei den aviären Influenza-Stämmen vor, was mit einer hohen Virulenz dieser Stämme verbunden ist (Bosch *et al.*, 1981; Kawaoka & Webster, 1988; Nemeroff *et al.*, 1992).

Die proteolytische Spaltung ist mit einer Konformationsänderung des HA verbunden. Nach der Endocytose der Rezeptor-gebundenen Viruspartikel unter Einschluß in die Phagosomen und deren Verschmelzung mit den Lysosomen der Zelle sorgt deren saurer pH-Wert für eine weitere Konformationsänderung des HA, bei der die N-terminalen Enden der HA₂-Polypeptidketten des Trimers als sog. Fusionspeptide exponiert werden. Ihr hydrophober Charakter sorgt für die Verschmelzung der viralen Membranhülle mit der Phagosomen-

Membran, woraufhin die viralen RNP-Komplexe aus dem Inneren des Virions in das Cytoplasma gelangen.

Das während eines Infektionszyklus neu synthetisierte HA-Protein wird posttranslational modifiziert. Diese Modifikation spielt sich in dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ab, in das das HA durch eine „Leaderpeptidsequenz“ eingeschleust wird. Die Glykosylierung mit zumeist sieben Oligosacchariden (Elder *et al.*, 1979) und die Acylierung mit drei Palmitat-Resten (Schmidt, 1982; Naeve *et al.*, 1990; Naim *et al.*, 1993) sind notwendig für die korrekte Faltung des HA im ER und für die Bildung des HA-Trimers. Das Trimer wird dann mit Hilfe von C-terminalen Polypeptid-Transportsignalen über den Golgi-Apparat zur zellulären Plasma-membran transportiert, wo die neu gereiften Virionen beim Ausknospen in Arealen von der Phospholipidmembran, ausschließlich besetzt mit viralen Membranproteinen, umhüllt werden.

Eine HA Rezeptor-Bindestelle ist an jeder der drei Trimer-Untereinheiten lokalisiert. Obwohl die Aminosäuren dieses Areals hochkonserviert und stammspezifisch sind, ist das HA in seinen übrigen Oberflächenbereichen mutationsanfällig. Für deren Entstehung trägt die hohe Fehlerrate der viralen RNA-Polymerase die Verantwortung. Die Selektion in der Antikörperhaltigen Umgebung des Wirtsorganismus begünstigt die HA-Varianten mit veränderter Oberfläche dort, wo keine essentielle Funktion tangiert ist.

1.4.2.3 Segment 5: Das Nukleoprotein (NP)

Das RNA-Segment 5 kodiert für das Nukleoprotein. Es ist ein strukturelles Protein und bildet mit den viralen RNA-Segmenten als Hauptkomponente den Ribonukleoprotein-Komplex (RNP). Pro NP-Untereinheit werden ca. 20 Nukleotide gebunden (Compans *et al.*, 1972; Jennings *et al.*, 1983). Die Bildung von RNP-Komplexen kommt bei den vRNA und cRNA Molekülen vor, jedoch nicht bei der viralen mRNA (Pons, 1971; Hay *et al.*, 1977). Diese Bindung des NP an die virale RNA kommt durch verschiedene Regionen des NP-Polypeptids zustande und ist sowohl für die Transkription als auch die Replikation essentiell (Elton *et al.*, 1999; Medcalf *et al.*, 1999). Bei der mRNA-Synthese kommt es zum vorzeitigen Abbruch durch die virale Polyadenylierungsreaktion, so dass die hochkonservierten Endsequenzen des

5'-Ende nicht vollständig in mRNA transkribiert werden (Lamb & Krug, 1996). NP ist vermutlich für das Umschalten von der mRNA- zur cRNA-Synthese verantwortlich, indem es an die neugebildete RNA bindet und mit der viralen RNA-Polymerase interagiert (Biswas *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 1999). In der frühen Phase der Infektion sind dagegen sehr wenig freie NP-Moleküle vorhanden, der Polymerasekomplex bleibt während des gesamten Transkriptionsvorganges an das 5'-Ende der vRNA gebunden, so dass es nicht möglich wird, die volle Länge der vRNA zu mRNA zu transkribieren (Ishihama & Nagata, 1988; Tiley *et al.*, 1994; Poon *et al.*, 1998). In der späteren Phase der Infektion (ca. 2,5 h nach Infektion) liegt dann eine höhere Konzentration an NP-Molekülen vor, die als „Antiterminator“ fungieren, indem sie die virale RNA-Polymerase von ihrer Bindestelle verdrängen und damit die Transkription bis zum letzten vRNA Nukleotid ermöglicht wird. Es wird die cRNA gebildet (Beaton & Krug, 1986; Hsu *et al.*, 1987; Shapiro & Krug, 1988; Fodor *et al.*, 1994; Klump *et al.*, 1997). Dies gilt auch bei der vRNA-Synthese aus der cRNA (Shapiro & Krug, 1988; Krug *et al.*, 1989), es gibt allerdings Hinweise, dass das NP hier nicht die gleiche Rolle spielt (Thierry & Danos, 1982; Mena *et al.*, 1999).

Des Weiteren ist NP auch das typspezifische Antigen, das die Influenza-Viren A, B und C voneinander unterscheiden läßt. Ein prominentes T-Zell-Epitop des NP gilt auch als Ziel für die zytotoxischen T-Lymphozyten in ihrer Abwehr der Influenza-Infektion (Yewdell *et al.*, 1989). NP wird im Cytoplasma der Wirtszelle synthetisiert und durch sein Kerntransportsignal (NLS) in den Zellkern transportiert. Das NP wird in verschiedener Weise phosphoryliert (Petri & Dimmock, 1981), allerdings ist die genaue Funktion dieser Phosphorylierungen unklar geblieben.

1.4.2.4 Segment 6: Neuraminidase (NA)

Das Segment 6 kodiert für das Oberflächenprotein Neuraminidase. Neuraminidase ist nach HA das zweite Hauptantigen des Virions, das ebenfalls wie HA Mutationen aufweist und damit der vorbestehenden Immunabwehr ausweicht. Bis jetzt sind neun NA-Varianten bekannt. NA ist ein Tetramer und besteht aus vier identischen Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Varghese *et al.*, 1983). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass NA eine pilzähnliche Form bildet, die mit

der Basis, der hydrophoben Region am N-Terminus des NA-Polypeptids, in der Lipidmembran des Virus sowie im Matrixprotein M1 verankert ist. NA ist sehr wichtig für die biologische Aktivität des Virions. Durch seine enzymatische Aktivität spaltet NA die terminale Sialinsäure von den verschiedenen Glykoproteinen (HA, NA und zelluläre Glykoproteine) ab (Air & Laver, 1989; Hughes *et al.*, 2000). Damit lösen sich die untereinander verklumpten Verbände der freigesetzten Tochterviren zeitverzögert in die einzelnen und erst dann infektiösen Virionen auf. Weiterhin sorgt NA auch für den Transport des Virus durch die Schleimschicht der Atemwege bis zum Ziel, zu den Epithelzellen (Lamb & Krug, 1996). Nach neuen Untersuchungen kann postuliert werden, dass NA eine Rolle in dem viralen Replikationszyklus sowie bei der Morphogenese und Stabilität des Influenza-Virus spielt (Hughes *et al.*, 2000).

Es wurden 4 Antigen-Stellen mit jeweils multiplen Epitopen im NA identifiziert (Webster *et al.*, 1984). Antikörper gegen NA können das Virus nicht neutralisieren, sie können nur die Plaque-Bildung verringern.

1.4.2.5 Segment 7: Das Matrixprotein M1 und das Porenprotein M2

Das Segment 7 besitzt in der kolinearen mRNA ein offenes Leseraster, das für das Protein M1 kodiert, während eine kürzere gespleißte mRNA in ein zweites Protein M2 translatiert wird (Inglis & Brown, 1981; Lamb *et al.*, 1981). Das Proteinraster in der gespleißten M2 mRNA überlappt am N-Terminus mit dem M1-Proteinraster in 14 Codons. Eine zweite, gespleißte mRNA (M3-mRNA) wurde identifiziert, die das 3'-Ende mit der M2 mRNA teilt, allerdings wurde kein Translations-Produkt festgestellt (Lamb *et al.*, 1981). Der Spleißprozeß ist reguliert und bestimmt damit das Verhältnis der produzierten Proteine M1 und M2. Dieses verschiebt sich im Laufe des Infektionszyklus.

M1 ist mengenmäßig das dominierende Protein des Virus. Es bildet eine 6 nm dicke Proteinschicht, die Matrix, (Schulze, 1970; Haslam *et al.*, 1970; Skehel & Schild, 1971) und verleiht damit dem Virus seine Form (Compans & Choppin, 1975). Einige Beobachtungen und Ergebnisse sprechen dafür, dass M1 sowohl mit dem cytoplasmatischen Schwanz der HA-, NA- und M2-Proteine, als auch mit den RNPs interagiert. Aufgereinigte RNPs enthalten

oft einen Anteil an M1-Protein (Rees & Dimmock, 1981). Eine phosphorylierte Spezies von M1 ist für den Austritt der neu synthetisierten RNPs aus dem Zellkern und den Transport zur Plasmamembran erforderlich (Martin & Helenius, 1991; Bui *et al.*, 2000). Ihr Eintritt in den Zellkern und ihre Bindung an die RNPs setzt Kern-Lokalisationssignale (*NLS*) voraus (Watanabe, 1996; Elster *et al.*, 1997; Ruigrok *et al.*, 2000). Als Matrix-Untereinheit steht M1 durch elektrostatische Interaktionen mit der Lipidmembran in Verbindung (Ruigrok *et al.*, 2000). Durch seine vielfältigen Interaktionen spielt das Matrixprotein die entscheidende Rolle bei der Verpackung der RNPs und der Morphogenese der Tochterviren.

M2 ist das dritte integrale Membranprotein nach HA und NA. Es ist ein Homotetramer aus 4 mit Disulfidbrücken gebundenen Untereinheiten und bildet einen Ionenkanal aus. Im Gegensatz zu M1 kommt M2 in den Virionen nur in kleinen Mengen vor und ist an der Virusoberfläche schwach repräsentiert (Lamb *et al.*, 1985; Zebedee & Lamb 1985). Es fungiert als passiver Ionenkanal vor allem für Natrium- und Hydronium-Ionen (Pinto *et al.*, 1992) und reguliert damit den intrazellulären bzw. intra-viralen pH-Wert (Surgrue & Hay, 1991).

1.4.2.6 Segment 8: Die nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2

Das Segment 8 kodiert ebenfalls wie das Segment 7 für zwei Proteine. NS1 wird durch das kolineare mRNA-Transkript kodiert, während eine gespleißte mRNA für NS2 kodiert. Beide NS-Proteine spielen eine Rolle bei der Virus-Replikation.

NS1 ist ein Phosphoprotein, das nur in den infizierten Zellen nachgewiesen wurde, nicht aber im Virion, daher seine Bezeichnung als Nichtstrukturprotein (Skehel, 1972; Compans, 1973a; Krug & Etkind, 1973; Follett *et al.*, 1974; Stephanson *et al.*, 1974; Lamb & Chopin, 1979). NS1 besitzt Kern-Lokalisationssignale, es verhindert den Export gespleißter viraler und zellulärer mRNAs (Fortes *et al.*, 1994; Qiu & Krug, 1994), das Spleißen von prä-mRNAs (Du *et al.*, 1994; Fortes *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 1998) und die Polyadenylierung von WirtsmRNA, was zum Abstellen der Wirt-Proteinsynthese führt (Nemeroff *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999). NS1 reguliert die Translation des M1-Proteins, nicht aber seine Transkription (Enami *et al.*, 1994). Weiterhin gilt NS1 als virulenter Faktor, der eine entscheidende Rolle

bei der Inhibition der Interferon-vermittelten antiviralen Immunantwort des Wirts spielt (Lu *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1999). Es wurden NS1-modifizierte, attenuierte Influenza-Viren als Lebendimpfstoff gegen Influenza vorgestellt (Palese *et al.*, 1999).

NS2 wurde früher auch für ein Nichtstrukturprotein gehalten, bis es 1991 im Virion nachgewiesen wurde (Richardson & Akkina, 1991), wo es mit dem M1-Protein assoziiert vorliegt (Richardson & Akkina, 1991; Yasuda, 1993; O'Neill *et al.*, 1998). 1998 wurde festgestellt, dass NS2 den Zellkern-Export viraler RNPs vermittelt, es wurde von diesen Autoren in *nuclear export protein* (NEP) umbenannt (O'Neill *et al.*, 1998).

1.4.3 Der genomische Aufbau der RNA-Segmente

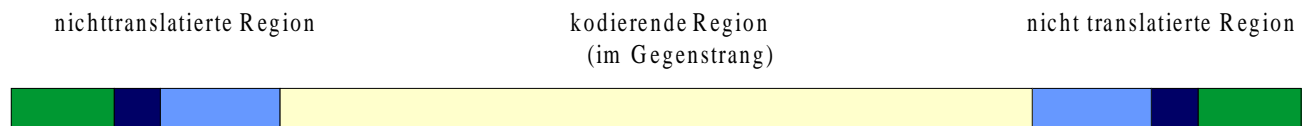
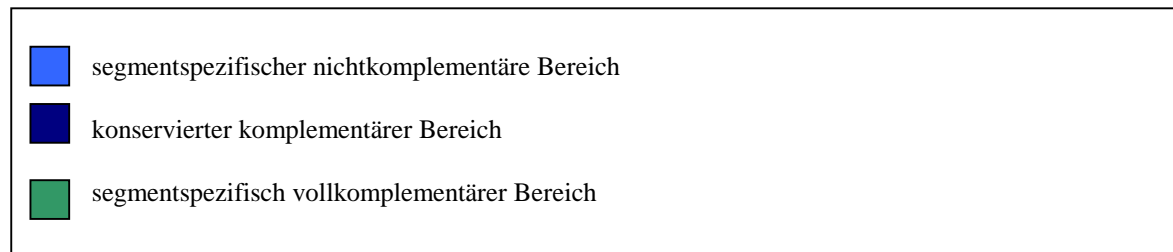


Abb. 1.2: Aufbau eines vRNA-Segmentes



Jedes Segment besteht aus der zentral gelegenen kodierenden Region und zwei nichttranslatierten Regionen an den beiden Enden (5'- und 3'-) der RNA-Moleküle. In dieser Flankenregion befindet sich ein hochkonservierter Bereich (Parvin *et al.*, 1989; Yamanaka *et al.*, 1991). Die ersten 13 Nukleotide des 5'-Endes und die letzten 12 Nukleotide des 3'-Endes der viralen RNA (vRNA)-Moleküle sind für alle acht Segmente bis auf seltene Ausnahmen identisch. Aus jedem vRNA-Molekül wird mit Hilfe der viruseigenen Polymerase eine mRNA gebildet, aus der ein oder zwei Proteine exprimiert werden. Ebenfalls mit Hilfe der viralen RNA-Polymerase wird aus der vRNA eine komplementäre RNA (cRNA) gebildet. Die cRNA weist den gleichen genetischen Aufbau auf wie die vRNA, bei der cRNA sind die ersten 12 Nukleotide am 5'-Ende und die letzten 13 Nukleotide am 3'-Ende konserviert.

Des Weiteren bestehen die nichttranslatierten Regionen aus einem segmentspezifisch komplementären Bereich (2-4 Basen) und anschließend aus einem segmentspezifischen, nicht komplementären Bereich.

1.4.3.1 Der vRNA-Promotor

Die konservierten Sequenzen der 5'- und 3'-Enden der vRNA-Moleküle sind zueinander partiell komplementär. Lange Zeit galt die Bindung der viralen RNA-Polymerase an das 3'-Ende als ausreichend, um die Synthese-Aktivität entlang der vRNA-Matrize in 3'→5' Richtung zu initiieren (Luytjes *et al.*, 1989; Parvin *et al.*, 1989; Luo *et al.*, 1991; Piccone *et*

al., 1993). Später wurde gezeigt, dass die Nukleotide 9-11 am 3'-Ende von der viralen RNA-Polymerase gebunden werden (Seong & Brownlee, 1992a, b; Fodor *et al.*, 1993) und dass auch die Bindung der viralen RNA-Polymerase an das 5'-Ende für ihre Funktion wichtig ist (Hagen *et al.*, 1994; Flick *et al.*, 1996). Die 5'- und 3'-Enden fungieren gemeinsam als vRNA-Promotorregion; es kommt zu einer Doppelstrangbildung zwischen den komplementären Nukleotiden, d.h. der Ausbildung einer Sekundärstruktur. Es handelt sich um die aktive Promotorstruktur, die für die Aktivität der viralen RNA-Polymerase essentiell ist. Nacheinander sind drei Modelle für diese Sekundärstruktur postuliert bzw. nachgewiesen worden:

- Das sog. „*panhandle*“: Diesem Modell nach liegt die Basenpaarung sowohl in dem proximalen (Nukleotid 1-10 am 5'-Ende bzw. 1-9 am 3'-Ende) als auch im distalen Promotorabschnitt (Nukleotid 11-16 am 5'-Ende bzw. 10-15 am 3'-Ende) vor (Hsu *et al.*, 1987; Honda *et al.*, 1988; Fodor *et al.*, 1994).
- Das „*RNA-fork*“ Modell: Nach diesem Modell wird eine Basenpaarung nur im distalen Promotorabschnitt postuliert (Fodor *et al.*, 1994, 1995).
- Das „*corkscrew*“ Modell (Abb.1.3) ist dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu den Basenpaarungen im distalen Promotorabschnitt auch innerhalb des 5'- und des 3'-Endes im proximalen Promotorabschnitt je zwei Basenpaare vorliegen (Flick *et al.*, 1996). Dieses Modell konnte in vorangehenden Arbeiten aus unserem Labor durch die Konstruktion von zahlreichen Promotorvarianten bewiesen werden. Es zeigt ein gleichzeitiges Zusammenwirken von 5'- und 3'-Ende in der aktiven Promotorkonformation (Neumann und Hobom, 1995; Flick *et al.*, 1996; Flick & Hobom, 1999a, 1999b).

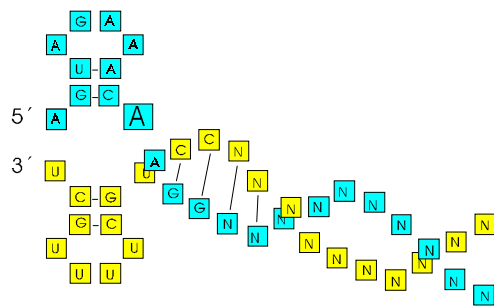


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der aktiven Sekundärstruktur des vRNA-Promotors: das „corkscrew“-Modell.

Der proximale vRNA-Promotorabschnitt besteht aus den Nucleotiden 1-9 am 5'- und am 3'-Ende, das überzählige A10 am 5'-Ende bleibt ungepaart. Der distale Abschnitt besteht aus den Nucleotiden 11-16 am 5'- und 10-15 am 3'-Ende. Das vRNA-„corkscrew“-Modell zeigt eine stranginterne Basenpaarung innerhalb des 5'- und des 3'-Endes.

1.4.3.2 Der cRNA-Promotor

Über den cRNA-Promotor ist wenig bekannt. Da die cRNA eine Hauptrolle in der Replikation spielt, lässt sich aus der Asymmetrie für die Replikationsprodukte ableiten, dass der cRNA-Promotor eine größere Aktivität aufweisen sollte als der vRNA-Promotor, denn zur Zeit der Replikation wurde für alle Segmente ein Konzentrationsverhältnis von 10:1 (vRNA zu cRNA) gefunden (Parvin *et al.*, 1989; Yamanaka *et al.*, 1991; Seong und Brownlee, 1992a; Pritlove *et al.*, 1995). Ein „panhandle“-Modell für die aktive cRNA-Promotorstruktur wurde 1995 von Pritlove *et al.* vorgeschlagen. Aufgrund seiner Komplementarität zu der vRNA-Promotorsequenz und anhand der Kenntnisse aus der vRNA-Promotor-Analyse wurde in dieser Arbeit der cRNA-Promotor in ähnlicher Weise untersucht. Dabei konnte auch für den cRNA-Promotor eine „corkscrew“-Struktur nachgewiesen werden (Abb. 1.4b).

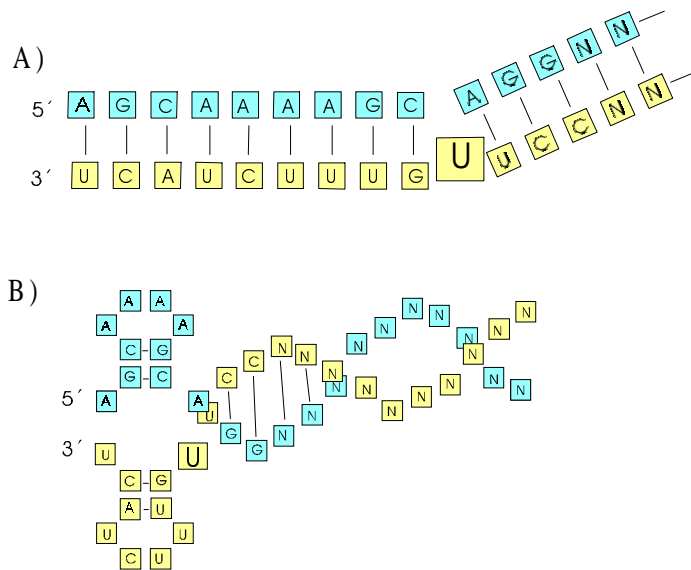


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der aktiven Sekundärstruktur des cRNA-Promotors

Der proximale cRNA-Promotorabschnitt besteht aus den Nukleotiden 1-9 am 5'- und am 3'-Ende, das überzählige U10 am 3'-Ende bleibt ungepaart. Der distale Abschnitt besteht aus den Nukleotiden 10-15 am 5'- und 11-16 am 3'-Ende.

A) Das cRNA-„panhandle“-Modell zeigt eine einfache Doppelstrang-Bildung zwischen den gesamten 5'- und 3'-Endsequenzen (Pritlove *et al.*, 1995).

B) Das von dem vRNA- abgeleitete cRNA-„corkscrew“-Modell, das in dieser Arbeit als die aktive cRNA-Promotorkonformation vorgeschlagen wird.

1.5 Infektionszyklus

1.5.1 Rezeptor-Bindung und Virus-Endocytose

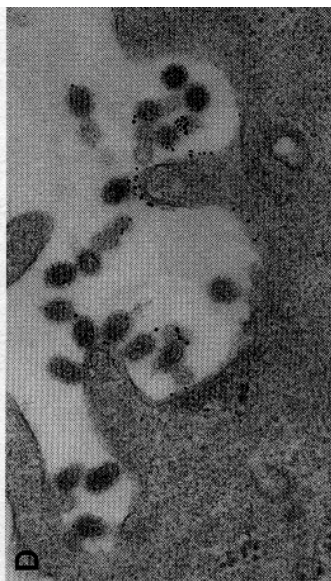


Abb. 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenza-Viren bei der Endocytose von infizierten MDCK-Zellen

Es handelt sich um ein Influenza A/Udorn/72/ -Virus mit goldmarkiertem M2-Protein. Aufnahme bei 40,600x, *Courtesy of Georg Leser, Northwestern University, Evanston, IL* (Lamb & Krug, 1996).

Der erste Schritt einer Virus-Infektion ist die Bindung von HA an die N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) verschiedener Glykoprotein-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Durch eine Rezeptor-vermittelte Endocytose tritt das Virus in die Wirtszelle ein, von einem Vesikel, dem Endosom, umschlossen. Nach Fusion des Endosoms mit einem Lysosom sinkt der pH-Wert im Phago-Lysosom auf 5-5,4. Dadurch wird der Ionenfluß in dem M2-Ionenkanal in das Innere des Virions fortgeleitet. Bei diesem pH-Wert nimmt das Trimere HA eine neue Konformation ein, so dass das HA₂-Fusionsprotein aktiviert wird und sich mit seiner hydrophoben Fusionspeptidsequenz in die Endosomenmembran einlagert, was zur Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran führt. Durch den auch im Virus-Innenen erniedrigten pH-Wert können sich die RNPs vom M1-Protein ablösen und damit ins Cytosol eindringen. Die Kerntransportsignale auf dem NP und den Polymerasemolekülen stimulieren dann den Transport der RNP-Komplexe durch das zelluläre Importin-System in den Zellkern (Adam, 1995; Neumann *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997).

1.5.2 Transkription und Replikation

Alle RNA-Synthese-Prozesse des Influenza-Virus laufen im Zellkern der Wirtszelle ab und werden von der viralen RNA-Polymerase katalysiert. Hierfür ist die obengenannte Sekundärstruktur des vRNA-Promotors erforderlich, die als Erkennungssignal für die Bindung der viralen RNA-Polymerase dient.

Die Transkription wird von der PB2-Untereinheit der viralen Polymerase initiiert. In einem sog. *cap-snatching*-Prozeß erkennt das PB2 die *cap*-Struktur einer von der zellulären RNA-Polymerase II neu synthetisierten zellulären mRNA und spaltet davon ein Fragment ab, das als Startermolekül für die virale mRNA dient. Mit Hilfe der PB1-Untereinheit der viralen RNA-Polymerase läuft dann die mRNA-Synthese entlang der vRNA-Matrize bis zum Polyadenylierungssignal ab. Hierbei handelt es sich um 5-6 Uridinreste, 15-22 Nukleotide vor dem 5'-Ende der vRNA gelegen, das selbst jedoch von der RNA-Polymerase bedeckt ist. An dieser Stelle wird wahrscheinlich in wiederholten Synthesezyklen anhand dieser Matrizensequenz eine Poly-A-Serie an das 3'-Ende der mRNA synthetisiert und damit in anderer Weise als bei der zellulären mRNA eine Polyadenylierung bewerkstelligt. Die

Synthese kommt anschließend zum Abbruch, ohne dass die Gesamtlänge der vRNA transkribiert worden ist.

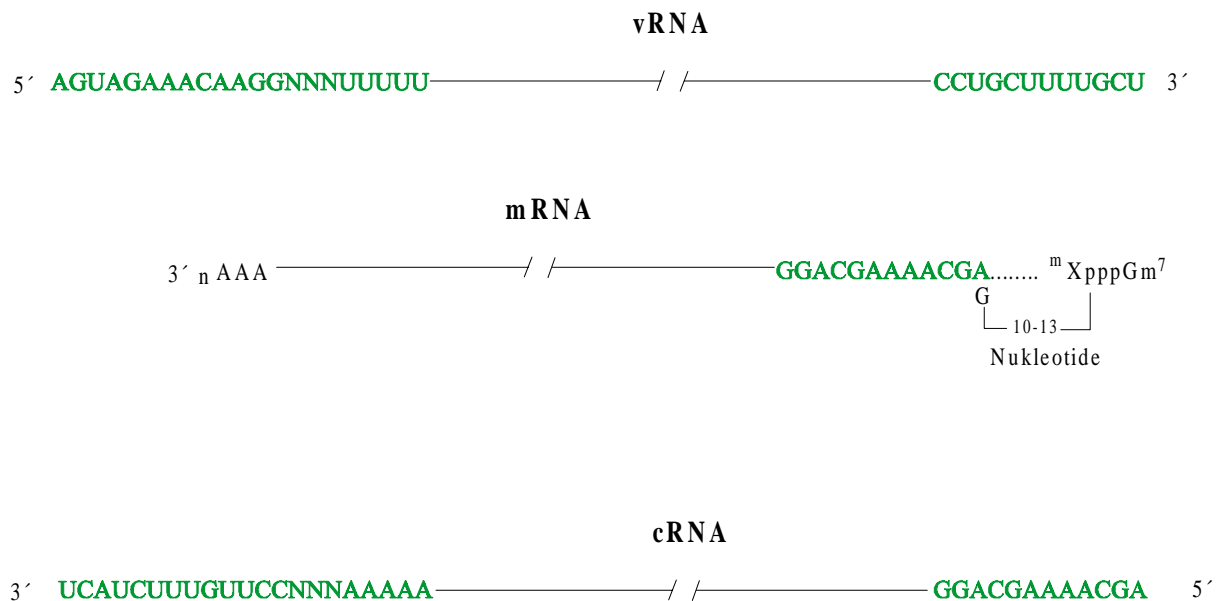


Abb. 1.6: Schema der Transkription und Replikation der Influenza A-Virus

Bei den gezeigten **Nukleotiden** handelt es sich um die hochkonservierten Promotorsequenzen (wie sie im Wildtyp vorkommen), die bei allen Segmenten gleich sind. Bei der Transkription wird die virale mRNA synthetisiert, dabei kommt es entlang einer Uridin-reichen Sequenz, 15-22 Nukleotide vor dem 5'-Ende der vRNA, zur Polyadenylierungs-Reaktion. Durch Replikation der Gesamtlänge der vRNA wird die cRNA gebildet.

Die Replikation läuft in zwei Schritten ab und benötigt weder ein Startermolekül, noch wird die Synthese vorzeitig abgebrochen. Im ersten Schritt wird aus der vRNA mit Hilfe der viralen RNA-Polymerase ein komplementäres RNA-Molekül ganzer Länge gebildet, die cRNA. In einem zweiten Schritt wird aus der cRNA, ebenfalls ohne Startermolekül, eine vRNA synthetisiert. Es wird postuliert, dass der Replikation eine andere Zusammensetzung der Polymerase-Untereinheiten, nämlich ein Replikase-Komplex aus PB1, NP und PA (Lamb & Krug, 1996; Nakagawa *et al.*, 1996) unterliegen könnte. Alternativ könnte PB2 weiterhin im Komplex vorhanden sein, jedoch in inaktivierter Form durch Interaktion mit PA oder NP, evtl. in Phosphorylierungs-abhängiger Reaktion. PB1 und NP sind sowohl an der cRNA-, als auch an der vRNA-Synthese beteiligt, PA scheint nur bei der vRNA-Synthese eine bedeutsame Rolle zu spielen. Es fungiert nach dieser Vorstellung als allosterischer Modulator, der die Untereinheit PB1 von ihrer cRNA- in die vRNA-synthetisierende Form verändert

(Nakagawa *et al.*, 1996), denn das PB1-Proteins bindet mit unterschiedlichen Aminosäureresten an die vRNA- bzw. cRNA-Moleküle (Gonzalez & Ortin, 1999).

1.5.3 Verpackung und Ausknospung

In der frühen Phase der Infektion werden vor allem NP- und NS1- Proteine reichlich exprimiert, die wiederum in den Zellkern einwandern. NS1 ist für den Export der viralen mRNAs in das Cytosol, wo die Protein-Expression abläuft, verantwortlich. NP sorgt nach entsprechender Akkumulation für das Umschalten von der Transkription in die Replikation. Damit werden die Tochter vRNA-Moleküle gebildet, während die Expression der Proteine noch weitergeführt wird. In dieser späteren Phase der Infektion wird die Synthese der Oberflächenproteine HA, NA und M2 dominierend. Sie wandern von ihrem Bildungsort, dem endoplasmatischen Retikulum, anschließend zur Zellmembran. Schließlich setzt mit der späten Bildung von M1-Protein auch der Transport der vRNP-Komplexe aus dem Kern heraus ein. Dieser Transport wird durch Assoziation der vRNPs mit dem M1-Protein bewirkt, an das seinerseits noch das NS2-Protein (NEP) gebunden ist. M1 verhindert gleichzeitig den Rücktransport der vRNP in den Zellkern, indem es die Stelle der Kernlokalisations-Signale des NP durch seine Bindung bedeckt. Diese Stellen werden sonst von den zellulären Importinen, die für den Import der vRNPs in den Zellkern sorgen, erkannt (Adam, 1995; Whittacker *et al.*, 1996).

Damit das Virus lebensfähig und infektiös bleibt, braucht es alle seine acht Segmente. Dafür muß es in der Lage sein, diese in seiner Virus-Nachkommenschaft zu verpacken. Das Signal für die Verpackung muß innerhalb der nichtkodierenden Sequenz des vRNA-Moleküls liegen, da vRNA-Moleküle, die ein fremdes Reportergen anstelle eines viralen Gens haben, vom Influenza-Virus ebenfalls verpackt werden (Enami *et al.*, 1992; Zobel *et al.*, 1993; Neumann *et al.*, 1994; Neumann *et al.*, 1999; Hoffmann *et al.*, 2000). Es werden aber nur vRNA-Moleküle, keine cRNA-Moleküle, verpackt, bedingt durch das überzählige Nukleotid A10 am 5'-Ende des vRNA-Promotors (Tchatalbashev, 2000). Hier spielt die Affinität des M1-Proteins zu den vRNPs gegenüber cRNPs eine Rolle. Es wird postuliert, dass die Affinität des M1-Proteins zu den vRNPs durch eine Konformationsänderung der viralen Polymerase in der Bindung an diesen Promotor bewirkt wird (Tchatalbashev, 2000). Eine zweite

Konformationsänderung kann durch die Interaktion des RNP-gebundenen M1 mit der Phospholipidmembran (Ruigrok *et al.*, 2000) oder/ und mit den cytoplasmatischen Anteilen der Glykoproteine HA, NA und M2 (Zhou *et al.*, 1998; Mitnaul *et al.*, 1996) zustande kommen. Die Ausknospung wird getragen von einer Wechselwirkung zwischen den M1-Untereinheiten, die dabei einen weiteren Konformationswandel erfahren.

1.6 Protektives und therapeutisches Vorgehen bei der Influenza-Infektion

Influenza Tot-Impfstoffe und chemisch hergestellte Mittel dienen der Prävention bzw. der Therapie von Influenza-Infektionen. Bei den Impfstoffen handelt es sich um tote bzw. inaktivierte Influenza-Viren. Der Impfstoff muß aus den sich aktuell ausbreitenden Influenza-Varianten jährlich neu hergestellt werden. Die Injektion dieses Impfstoffes ist nicht optimal und hat bedeutende Nachteile, es gibt aber leider noch keine Alternative zu dieser Art der Vakzinierung. Wegen der jährlichen Variabilität muß das Impfvirus-Gemisch jährlich neu zusammengestellt und produziert werden, in einer Prozedur, die mindestens drei Monate dauert, bis der Impfstoff hergestellt und geprüft ist und ausgeliefert werden kann. Er wird nutzlos, wenn eine neue Influenza-Variante auftritt, die im Impfstoff-„cocktail“ nicht enthalten war.

Die Herstellung eines Lebendimpfstoffes wurde bis jetzt als nutzlos und zugleich für gefährlich angesehen. Um einen erfolgreichen Lebendimpfstoff zu erzeugen, müssten alle möglicherweise auftretenden Influenza Antigen-Variationen, die durch Antigen-drift oder Antigen-shift entstehen können, betrachtet werden, was unmöglich ist. Dennoch gibt es neue Versuche, rekombinante Influenza-Viren zu erzeugen, die das Problem teilweise lösen können. Angestrebt wird ein abgeschwächtes, reassortiertes Virus, dessen HA- und NA-Gene aus einem virulenten aktiven Virus stammen, während die restlichen Gene aus einem abgeschwächten Donor-Virus, besonders einer Kälte-sensitiven Variante stammen (Keitel & Piedra, 1998). Die Herstellung dieses Kälte-adaptierten Impfstoffes könnte effizienter werden, wenn er statt durch Kreuzungs- und Selektionsschritte mit dem von Neumann *et al.* kürzlich etablierten reversen Genetik-System direkt erzeugt wird (Neumann *et al.*, 1999). Hierbei kann das gesamte Influenza-Virus aus cDNA-Molekülen, die für die viralen Proteine kodieren, mit verschiedenen attenuierten Mutationen hergestellt werden.

Bei den chemischen Mitteln sind die Oberflächenproteine der Angriffspunkt. Das bekannte Amantadin (ursprünglich gegen die Parkinson-Krankheit entwickelt) und das verwandte Rimantadin sind gegen das M2-Membranprotein gerichtet. Sie blockieren den Ionenkanal und verhindern damit das Ansäuern des Endosoms, so dass das HA in einer Fusions-inaktiven Form verharrt. Weiterhin führt die fehlende pH-Verschiebung im Virion dazu, dass die RNP-Komplexe an das M1-Protein gebunden bleiben, was in der Folge deren Transport in den Zellkern verhindert. Es erfolgt jedoch keine 100%-ige Hemmung des Virus durch Amantadin, und sehr schnell werden durch M2-Substitutionsmutanten resistente Viren selektiert, die auf diese Therapie nicht mehr ansprechen. Außerdem ist eine Therapie in einer höheren Dosis von Nebenwirkungen im Zentralnervensystem begleitet.

Zanamivir und das verwandte GS 4071 bzw. seine modifizierte Form GS 4101 sind Sialinsäure-Derivate. Sie blockieren die Neuraminidase und damit die Ausbreitung des Virus im Körper. Solche Mittel müssen innerhalb von 36 Stunden nach Auftreten einer Influenza-Infektion eingenommen werden, sonst ist keine Wirkung zu erwarten. Diese Mittel haben kaum Nebenwirkungen. Sie sorgen ebenfalls wie Amantadin und Rimantadin nicht für eine 100%-ige Hemmung der viralen Infektion, verkürzen aber die Infektionszeit um bis zu 3 Tage und lindern die Symptome.

1.7 Reverse Genetik von Influenza-Viren

Mit Hilfe von Techniken der Reversen Genetik ist die Analyse der RNA-Segmente des Influenza-Virus und deren Funktion möglich. Für die Synthese der Influenza-vRNA-Segmente sind *in vitro* und *in vivo* Transkriptionssysteme entwickelt worden.

1989 stellte Luytjes das erste Reverse Genetik-System bei Influenza vor. Es handelte sich um ein T7-RNA-Polymerase Transkriptionssystem. Hierbei werden rekombinante vRNAs durch *in vitro*-Synthese hergestellt und dann mit aus Viren aufgereinigten Polymerase-Proteinen (PB1, PB2 und PA) und Nukleoprotein (NP) zur „Rekonstitution“ inkubiert (Luytjes *et al.*, 1989). Die rekombinanten RNPs werden schließlich in mit Helfer-Virus infizierte Zellen transfiziert. Dieses System wurde später verbessert (Enami *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 1992; De la Luna *et al.*, 1993).

Reverse Genetik-Systeme für die Erzeugung von vRNA-Molekülen *in vivo* beruhen auf der Transkription von Plasmid-DNA-Konstrukten durch die zelluläre RNA-Polymerase I (Neumann *et al.*, 1994; Pleschka *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde das 1994 von Neumann *et al.* etablierte Polymerase I-Transkriptionssystem verwendet.

1.7.1 Das *in vivo* Polymerase I-Transkriptionssystem

Die RNA-Polymerase I transkribiert die rRNA-Gene, dabei beginnt die Transkription am rDNA-Promotor und setzt sich ohne Unterbrechung bis zum (ersten) Terminator am Gen-Ende fort. Das Transkript ist eine 45S-Vorläufer-rRNA, die anschließend zu den ribosomalen RNAs: 18S, 4,5S und 28S prozessiert wird. Im Gegensatz zu den RNA-Polymerase II-Transkripten enthält die prä-rRNA weder einen 3′ Poly-A-Schwanz noch eine 5′ cap-Struktur. Am 5′-Ende weist das RNA-Polymerase I-Transkript eine Triphosphat-Gruppe und am 3′-Ende einen OH-Rest auf, ebenso wie das bei der Influenza-vRNA der Fall ist.

Um die vRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase I zu ermöglichen, wurde die cDNA eines HA-Gens nukleotidgenau in inverser Orientierung zwischen den rDNA-Promotor und den rDNA-Terminator eingesetzt (Zobel *et al.*, 1993). Der rDNA-Promotor umfasst die Region

von -254 bis -1 des Polymerase I-Promotors der Maus und als rDNA-Terminator wurde der Bereich von +571 bis +745 verwendet, bezogen auf das 3'-Ende der 28S rDNA der Maus (La Volpa *et al.*, 1985; Bartsch *et al.*, 1987). Das 5'-Ende des hier gebildeten Vorläufer-RNA-Transkripts stimmt mit dem ersten Hämagglutinin-Nukleotid überein (Zobel *et al.*, 1993). Die Termination läuft am Terminatorbereich ab. Dieser Bereich enthält zwei hoch konservierte 18 bp lange Sequenzen, die nach der darin enthaltenen Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SalI* als „*Sal*-Boxen“ bezeichnet werden (Grummt *et al.*, 1986) und als Bindungsstellen für den Terminationsfaktor TTF I dienen (Smid *et al.*, 1992). An dem fest gebundenen Terminationsfaktor findet die primäre Terminationsreaktion (Platt, 1986; Kuhn & Grummt, 1989) 12 bp stromaufwärts von den „*Sal*-Boxen“ statt. In einer nachfolgenden Prozessierungs-Reaktion (Kuhn & Grummt, 1989) werden jedoch einige Nukleotide vom primären 3'-Ende entfernt, es entsteht in Sequenz-bestimmter Weise ein spezifisches sekundäres 3'-Ende weiter stromaufwärts von dem zuvor gebildeten 3'-Ende des Primär-Transkriptes (Zobel *et al.*, 1993).

Für die *in vivo* Analyse der von dem RNA-Polymerase I-System gebildeten vRNA und ihren Bildungsprozessen wurde die HA-kodierende Region nukleotidgenau durch das Reportergen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) ersetzt. Die DNA-Transkription solcher Plasmidkonstrukte in Mäusefibroblasten-Zellen mit anschließender Superinfektion durch Influenza-Helferviren führt zur Expression des CAT-Reportergens (Neumann *et al.*, 1994). Die Passage-Experimente zeigen, dass die von dem Polymerase I-System gebildeten CAT-vRNA-Moleküle in die Tochter-Viren verpackt und dort amplifiziert werden (Neumann & Hobom, 1995).

Durch gezielte Mutationen in den konservierten, nichtkodierenden Regionen des HA-Moleküls konnte anhand der CAT-Expression die aktive Promotorstruktur des vRNA-Moleküls als „*corkscrew*“-Konformation bestimmt werden (Flick *et al.*, 1996; Flick & Hobom, 1999).

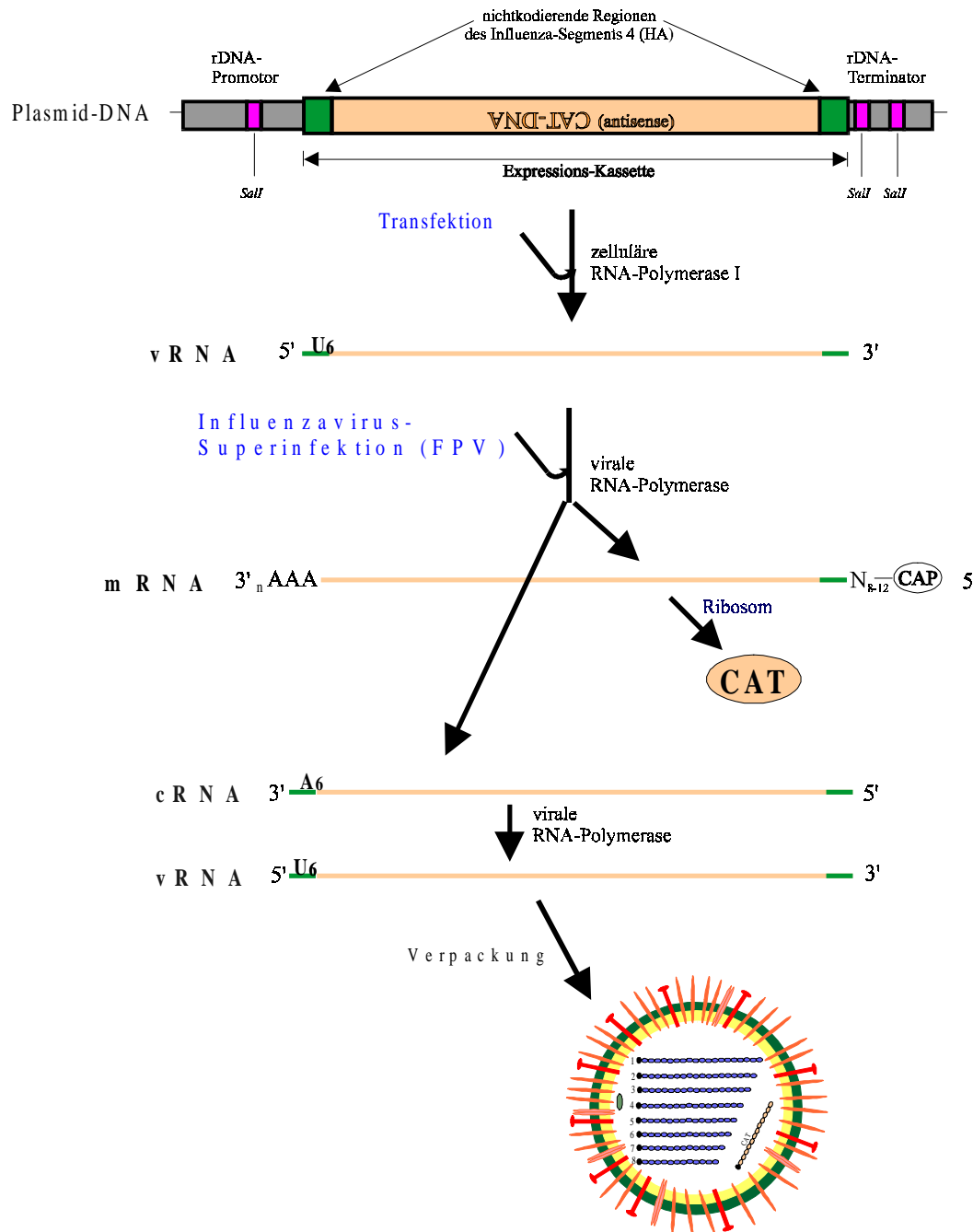


Abb. 1.7: Das vRNA Polymerase I-Transkriptionssystem zur *in vivo* Erzeugung von vRNA-Molekülen

Durch die zelluläre RNA-Polymerase I entsteht die vRNA-Matrize, die von der viralen RNA-Polymerase in mRNA transkribiert wird. Die mRNA führt zur CAT-Expression. Die vRNA wird über die komplementäre cRNA repliziert. Aber nur die vRNA wird in die Tochter-Virionen verpackt.

1.8 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll zuerst die Längenabhängigkeit der Inkorporation von rekombinanten vRNA-Molekülen in Influenza A-Viren weiter untersucht und zu größeren als authentischen Längen der Virus-RNA ausgedehnt werden. Die Segmentlänge soll deshalb schrittweise auf 3000 und 4000 Nukleotide verlängert werden. Anhand der CAT-Expression soll untersucht werden, ob auch Segmente dieser Länge von dem Influenza-Virus transkribiert bzw. verpackt werden können.

Hauptziel dieser Arbeit ist es, die funktionsfähige Promotorstruktur der cRNA durch gezielte Mutagenese zu untersuchen. Darüberhinaus soll die Frage beantwortet, ob diese neben der Replikation auch eine invers orientierte Transkriptionsreaktion starten kann, die in direkter Weise (statt über die vRNA-Replikation und deren Transkription) auf die Aktivität des cRNA-Promotors zurück geführt werden kann. Für die aktive Promotor-Konformation selbst standen die Ergebnisse aus der vRNA-Promotor-Analyse als Modell zur Verfügung. Für diesen Zweck muß ein cRNA-Konstrukt hergestellt werden, das im Gegensatz zu der natürlich im Virus vorkommenden cRNA ein invers eingesetztes CAT-Gen besitzt. Weiter müssen am 5'-Ende des cRNA-Promotors (Position 16-21) zusätzlich 6 Uridinreste inseriert werden, die bei der Polyadenylierung der "inversen" mRNA als Matrize dienen sollen. Dagegen werden die störenden 6 Uridinreste am 5'-Ende der vRNA (= 6 Adenin Nukleotide am 3'-Ende der cRNA) entfernt. Die Promotorsequenz wird zur Aktivitätssteigerung mit den Mutationen der 1104 Mutante ausgerüstet (Neumann & Hobom, 1995). Läßt sich so im Ausgangskonstrukt eine CAT-Expression nachweisen, so sollten weitere Mutationen im Promotor-Bereich, vor allem die für den Nachweis der „corkscrew“-Struktur entscheidenden Einzel- und Doppelsubstitutionen eingeführt und der Einfluß dieser Mutationen auf die cRNA-Promotor-Aktivität anhand der CAT-Expressionsrate getestet werden. Schließlich ist die mRNA selbst zuzuweisen, die entlang der cRNA transkribiert wird und die CAT-Expression liefert. Außerdem müssen die 5'- und 3'-Enden dieser mRNA bestimmt werden.

Nach erfolgreicher Etablierung der cRNA-Transkription soll dann weiter versucht werden, diese mit der vRNA-Transkription zu einem *Ambisense*-Expressionssystem zu kombinieren. Hier laufen dann am gleichen RNA-Segment zwei Transkriptionen ab, eine ausgehend von dem cRNA-Promotor und die zweite ausgehend von dem vRNA-Promotor. Die

Transkriptionsreaktionen laufen daran in zwei Schritten ab und ermöglichen die Expression zweier Gene (CAT und GFP), ausgehend von einem einzigen rekombinanten Influenza RNA-Segment.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienkulturen

2.1.1 Bakterienstämme

Die bei den Arbeiten verwendeten Stämme sind sämtlich Derivate des 1922 in Stanford/Kalifornien isolierten, anerkannten Sicherheitsstammes *Escherichia coli* K12.

XL-I Blue: Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^qZΔM15* Tn10(*tet^r*)] (Stratagene[®], Heidelberg).

SCS110 (Dam-): Genotyp: *rpsL(Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44Δ, (lac-proAB)* [F'*traD36 proAB lacI^qZΔM15*] (Stratagene[®]).

2.1.2 Nährmedien und Nährböden für *E. coli*

Sowohl als Flüssig- wie auch als Festmedium auf den Agar-Platten diente Luria-Bertani-(LB)-Medium (Miller, 1972). Zum Festmedium setzt man 8 g Agar/l (Bacteriological Grade; Gibco/BRL, Eggenstein) zu.

LB-MEDIUM:

- 10 g NaCl
- 10 g Casein-Hydrolysat (Peptone 140; Gibco/BRL, Eggenstein)
- 5 g Hefeextrakt (Gibco/BRL)
- 1000 ml destilliertes Wasser

Zur Selektion auf resistente Bakterien sind sowohl Flüssig- als auch Festmedien mit dem Antibiotikum Ampicillin (Binotal[®]; Bayer, Leverkusen) auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Bei den Antibiotika Kanamycin und Tetrazyklin beträgt die Endkonzentration 30µg/ml.

2.1.3 Anlegen von stabilisierten Glycerinkulturen (*stabs*)

Die langfristige Aufbewahrung von Bakterienklonen erfolgt bei -70°C tiefgefroren in einer Glycerinlösung. Hierzu werden 0,85 ml einer Übernacht-Kultur des gewünschten Klones mit 0,15 ml sterilem 89%-igem Glycerin versetzt, gut gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Sdp. -196°C). Unter diesen Aufbewahrungsbedingungen bleiben die Bakterien mehrere Jahre lang lebensfähig.

2.2 Klonierung und Analyse von DNA-Molekülen

2.2.1 Plasmide und Vektoren

Als Klonierungsvektoren und Referenz-Plasmide dienen sowohl Standard-Plasmide als auch in unserem Labor hergestellte Konstrukte (Tabelle 1.1).

Tabelle 2.1: Verwendete Ausgangsplasmide

Vektor	Verwendung	Herkunft
pHH21	Klonierungsvektor	E.Hoffman (unveröff.)
pBluescript II KS (+)	Klonierungs- und Sequenzierungsvektor	Stratagene [®]
pRSgfpC1	GFP-Reportergen-Plasmid	Clontech [®]
pcDNA3CAT	CAT-Reportergen-Plasmid	Stratagene [®]
pHK732	LacZ-Klonierung	M.Kröger
pZeoSVlacZ	LacZ-Grundvektor und Referenz	Invitrogen [®]

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA nach der Miniprep-Methode

Für die schnelle DNA-Gewinnung ist diese Methode, auch Minipräparation genannt, gut geeignet. Allerdings ist die hier gewonnene DNA-Menge gering und deswegen für mehrere Verwendungen nicht ausreichend, dazu auch nicht sehr rein. Die Quantität und Qualität der DNA nach der

Minilysatmethode ist nicht so gut, jedoch für Charakterisierung der Klone z.B. durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und auch der Sequenzierung ausreichend.

Das Verfahren beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen unter gleichzeitiger Komplexierung der zellulären Proteine durch die Zugabe von SDS. Es werden 1 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt und in einer Heraeus-Biofuge abzentrifugiert (5 min bei 5000 rpm). Das Bakterienzellsediment ist in 100 µl gekühlter Lösung I zu resuspendieren und anschließend 5 min auf Eis zu stellen.

Lösung I:

- 25 mM Tris-HCl, PH 8,0
- 50 mM Glucose (steril filtriert)
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A

Nach der Zugabe von 200 µl Lösung II wird gut gemischt. Es kommt hierbei zur alkalischen Denaturierung der DNA.

Lösung II:

- 200 mM NaOH
- 1% SDS

Nach anschließender Inkubation für 5 min auf Eis werden dem Ansatz 150 µl Lösung III hinzugefügt. Es wird erneut gemischt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert.

Lösung III:

- 3 M Natriumacetat (pH 4,8)

Durch eine 15-minütige Zentrifugation in der Biofuge Heraeus bei 12000 rpm werden die Zelltrümmer, die genomische DNA und die denaturierten Proteine abzentrifugiert. Der entstandene Überstand, in dem sich die Plasmid-DNA befindet, wird in ein zweites Eppendorf-Gefäß dekantiert und mit 1 ml 96%-igem EtOH (bzw. 300 µl Isopropanol) versetzt. Der Fällungsansatz wird gründlich gemischt und erneut zentrifugiert (15 min bei 12000 rpm in der Biofuge Heraeus). Hierbei tritt die Fällung der Plasmid-DNA ein. Die sedimentierte Plasmid-

DNA wird mit eiskaltem 70%igem EtOH gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Abschließend wird das trockene Sediment in 50 µl sterilem dest. Wasser aufgenommen.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Qiagen® Midipräparation

Diese von der Firma Qiagen® entwickelte Methode ermöglicht die Aufarbeitung größerer Mengen an Zellen mit einer hohen Ausbeute an hochreiner DNA (wenig störende Salze). Die so gewonnene DNA ist vor allem bei Transfektionen erforderlich, weiterhin ist es für große Spaltungsansätze und für die Sequenzierung gut geeignet. Wie auch die Minipräparation beruht diese Methode auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der stufenweisen Beseitigung von Zelltrümmern, Proteinen und RNA.

Die Bakterienkulturen (100 ml), die sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden sollten, werden unter Kühlung 10 min bei 5000 rpm (GSA-Rotor, Sorvall/RC-5B von DUPONT®) abzentrifugiert. Das erhaltene Sediment wird in 4 ml gekühlter Lösung P1 möglichst homogen suspendiert.

Lösung P1:

- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A

Danach werden 4 ml Lösung P2 zugegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Lösung P2:

- 0,2 M NaOH
- 1% SDS

Um das Natriumhydroxid zu neutralisieren und das Detergens SDS zu entfernen, werden 4 ml Lösung P3 zu dem Ansatz gegeben, gut gemischt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert.

Lösung P3

- 3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Die anschließende 30-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm (4°C) entfernt die Zelltrümmer und die chromosomale DNA.

Der Überstand wird über eine zuvor bereits mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen® tip 100-Säule gegeben.

Puffer QBT:

- 0,75 M NaCl
- 0,05 M MOPS (pH 7,0)
- 15% EtOH
- 0,15% Triton

Die Plasmid-DNA bindet aufgrund ihrer negativen Ladung an das Säulenmaterial, die ungebundenen RNA- und Proteinrückstände werden durch zweimaliges Waschen der Säule mit 10 ml QC-Waschpuffer entfernt.

Puffer QC:

- 0,1 M NaCl
- 0,05 M MOPS (pH 7,0)
- 15% EtOH

Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird nun durch die Zugabe von 5 ml Elutionspuffer QF eluiert.

Elutionspuffer QF:

- 1,25 M NaCl
- 0,05 M Tris-HCl (pH 8,5)
- 15% EtOH

Das Eluat wird mit 0,7 Volumina Isopropanol versetzt. Es erfolgt die Präzipitation der Plasmid-DNA, die nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10000 rpm sedimentiert. Das Sediment wird mit 5 ml 70%igem EtOH gewaschen und an der Luft oder im Vakuum getrocknet. Anschließend wird das Sediment in 200 µl dest. Wasser aufgenommen.

Bei Mini- und Maxipräparation geht man von 3 ml bzw. 400 ml Bakterienkultur aus.

2.2.4 RNase A-Behandlung

In manchen Fällen kann die Anwesenheit von RNA-Molekülen in einer DNA-Lösung nach erfolgter Präparation störend sein. Durch 5-minütige Inkubation mit 100 µg/ml RNase A (Serva/Heidelberg bzw. Qiagen/Hilden) werden selbst größere Mengen an RNA degradiert.

10 mg RNase A werden in 1 ml 10 mM Tris-HCl und 15 mM NaCl gelöst und durch 15 min Kochen DNase-Frei gemacht.

2.2.5 Aufreinigung von DNA-Molekülen

Die Reinigungsmethoden machen sich die chemischen Eigenschaften der DNA zunutze. Die DNA löst sich gut im Wasser, aber kaum in organischen Lösungsmitteln.

2.2.5.1 Alkoholfällung

Diese Methode wird durchgeführt, um die Konzentration einer DNA-Lösung zu verändern oder störende anorganische Ionen zu beseitigen. Die Desoxyribonukleinsäuremoleküle überschreiten dabei in wässrigen Lösungen, bei Anwesenheit hoher Konzentrationen von einwertigen Kationen (durch Zugabe entsprechender Volumina an EtOH bzw. Isopropanol) ihr Löslichkeitsprodukt.

Fällungsansatz:

- DNA-Lösung
- 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4)
- 2 bis 3 Volumina EtOH 96% (1 Volumen Isopropanol)

Der Ansatz wird gut gemischt. Dieser kann bei -20°C aufbewahrt werden, dadurch wird die Fällungsausbeute jedoch nicht erhöht. Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm wird die Plasmid-DNA sedimentiert.

Um die Reste des eingesetzten Natriumacetats zu beseitigen, ist nach der Fällung die Plasmid-DNA noch einmal mit 1 ml 70 %igem EtOH zu waschen.

2.2.5.2 Phenolextraktion

Zelluläre Proteine, eingesetzte Enzyme (z.B. Klenow-Fragment) und andere störende Enzymaktivitäten werden mittels einer Phenolextraktion aus der wässrigen DNA-Lösung entfernt. Hierfür wird die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol (Rotiphenol[®], äquilibriert gegen TE-Puffer, pH 7,6; Roth, Karlsruhe) versetzt, für 5 min geschüttelt und bei 5000 rpm zentrifugiert. Der größte Teil der jetzt denaturierten Proteine sammelt sich in der Interphase. Die obere, wässrige Phase enthält die DNA und wird sorgfältig abgezogen, anschließend mit einem Chloroform/Isoamylalkoholgemisch (24:1) vermischt, um die Phenolreste zu entfernen. Danach wird erneut zentrifugiert, der wässrige Überstand abgenommen und durch Alkohol-fällung die DNA aus der Lösung isoliert.

2.2.5.3 Adsorption an Glasmilch (*gene clean*-Verfahren)

Mit dem *gene clean*-Verfahren lassen sich die aus Agarosegelen ausgeschnittenen DNA-Fragmente (über 300 bp) reinigen (nach Vogelstein und Gillespie, 1979; abgeändert). Die zunächst zerkleinerten Gel-Stücke werden in ein oder mehrere Eppendorf-Gefäße überführt, mit einer gesättigten Kaliumjodid- bzw. Natriumjodid-Lösung (6 M) überschichtet und bei 60°C inkubiert. Je nach Dicke und Menge der Agarose-Stücke dauert es 10-20 min bis zu ihrer Aufschmelzung, wonach die DNA jetzt in Lösung vorliegt. Durch Zugabe von 5 µl Silikamatrix (eigene Herstellung von J. Hirzmann) mit anschließendem Schütteln kommt es durch die vorliegenden Hochsalzbedingungen zur Adhäsion der DNA an die Silikapartikel. Um den nun vorliegenden DNA-Silikapartikel-Komplex von KJ- bzw. NaJ- und Agaroseresten zu befreien, schließt sich ein dreifaches Waschen mit einem niedermolaren Waschpuffer an. Der DNA-Silikapartikel-Komplex wird DNA in nachfolgenden Schritten, einmal in 20 µl, einmal in 10 µl dest. Wasser aufgenommen und daher jedes mal für 5 min bei 60°C inkubiert, wodurch sich die DNA unter den nun vorliegenden Niedersalzbedingungen von der Silikamatrix löst und in die wässrige Lösung übergeht. Durch eine einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm trennt sich die wässrige DNA-Lösung von den Silikapartikel. Die DNA-Lösung aus den zwei Schritten wird vereinigt und erneut für 5 min abzentrifugiert. Dieser Schritt ist sehr wichtig, denn die Kontamination mit Silikapartikel-Resten kann die folgenden Reaktionen mit dieser DNA stören.

Anschließend wird 1/10 Volumen der DNA-Lösung zur Reinheits- und Konzentrationskontrolle auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

gene- clean-Waschpuffer:

- 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
- 10 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- in 70% EtOH

2.2.5.4 Aufreinigung von amplifizierten DNA-Molekülen

Die Aufreinigung von DNA-Amplifikaten erfolgt mit dem *PCR-Purification-Kit* (Qiagen). Dabei werden die Startermoleküle, Nukleotide (dNTPs), Polymerasen und Salze entfernt. Hierfür wird der PCR-Reaktionsansatz mit Fünffacher Volumen PB-Puffer versetzt, gut gemischt und auf die Qiaquick-Säule gegeben. Es folgt die selektive Bindung der amplifizierten DNA an das Säulenmaterial, die dNTPs werden durch zweimaliges Waschen mit 750 µl PE-Puffer entfernt. Anschließend wird die amplifizierte DNA mit dem gewünschten Wasservolumen eluiert, am besten mit dem gleichen Volumen wie beim Ausgangsmaterial des PCR-Reaktionsansatzes.

2.2.6 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die in dieser Arbeit im wesentlichen eingesetzten Restriktionsendonukleasen gehören der Typ II an. Sie erkennen 4-8 bp lange, meist palindromische Sequenzen und schneiden innerhalb dieser bzw. in einem definierten Abstand davon den DNA-Doppelstrang, unter Hydrolyse je einer Phosphodiesterbindung pro Einzelstrang. Danach tragen die 3'-Enden des DNA-Moleküls eine Hydroxyl- und die 5'-Enden eine Phosphatgruppe. Enzymspezifisch entstehen dabei entweder glatte (*blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'- überstehende Molekülenden (*sticky ends*).

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammen von den Herstellern AGS, New England Biolabs oder Fermentas.

2.2.6.1 Analytische Spaltung mittels Restriktionsenzymen

Diese Art der DNA-Spaltung wird zur Charakterisierung von Einzelklonen nach einer Transformation eingesetzt. Hierfür verwendet man die durch Minipräparation gewonnene DNA (ca. 100 ng/ μ l), die erforderlichen Spaltungspuffer stellt der Hersteller zusammen mit dem gelieferten Enzym zur Verfügung.

Analytischer Spaltungsansatz:

- 3 μ l DNA
- 2 μ l 10x Spaltungspuffer
- 2,5-5 U Restriktionsenzym
- auf 20 μ l Volumen mit dest.Wasser auffüllen

Die Spaltungsreaktion läuft je nach Restriktionsenzym bei 25-55°C für 1-2 h ab. Zur Analyse werden die Fragmente in einem Agarose- oder Polyacrylamidgel parallel zu einem Längenstandard (2.2.8) elektrophoretisch aufgetrennt. Handelt es sich um eine Doppelspaltung, so wird dem Ansatz zuerst ein Enzym zugegeben. Nach einer Stunde trägt man ein Aliquot auf ein entsprechendes Gel auf, ist die Spaltung erfolgt, so kann das zweite Enzym zugegeben werden. Spaltet das zweite Enzym nicht im gleichen Spaltungspuffer, so ist zuerst eine Alkoholfällung erforderlich.

2.2.6.2 Präparative Spaltung mittels Restriktionsenzymen

Die für Ligationsansätze zum Zweck der Klonierung benötigten DNA-Fragmente werden in größeren Mengen gebraucht. Hierfür wird bevorzugt die durch die Qiagen-Methode gewonnene DNA benutzt.

Präparativer Spaltungsansatz:

- 5 μ g DNA
- 20 μ l Spaltungspuffer
- 20 U Restriktionsenzyme
- auf 200 μ l Volumen mit dest. Wasser auffüllen

Die Reaktion läuft bei der für das Enzym optimalen Temperatur ab. Hierbei ist die vollständige Spaltung des Fragmentes sehr wichtig, deswegen inkubiert man die Reaktion über 4-12 h. Handelt es sich bei der Restriktion um eine DNA-Linearisierung, DNA werden dem Spaltungsansatz weitere 2 U des linearisierenden Enzyms zugegeben und für weitere 4-12 h inkubiert. Für Doppel-Spaltungen siehe 2.2.6.1.

2.2.6.3 Partielle Spaltung mittels Restriktionsenzymen

Weist ein Plasmid neben der gewünschten Schnittstelle eines bestimmten Restriktionsenzymen noch weitere Schnittstellen auf, so ist es erforderlich, eine partielle (teilweise) Spaltung des Moleküls durchzuführen.

Hierzu wird ein präparativer Spaltungsansatz mit 1 U Enzym vorbereitet. Ein Teil wird in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit der anderen Teil wird die Zeitabhängigkeit der Spaltungsreaktion ermittelt. Dazu wird in bestimmten Zeitabstände eine kleine Menge entnommen, dabei wird die Reaktion durch Ladeblau (siehe 2.2.7.1) unterbrochen. Danach wird die Länge der DNA-Fragmente in den Aliquots durch Agarose-Gelelektrophorese ermittelt. Durch dieses Experiment lässt sich die Zeit bestimmen, die notwendig ist, um das gewünschte Fragment in größter Menge zu erhalten. Der tiefgefrorene Hauptansatz ist anschließend, entsprechend der festgestellten Inkubationszeit, zu spalten.

2.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Ein Gemisch von DNA-Molekülen mit unterschiedlicher Länge lässt sich mittels Gelelektrophorese auftrennen. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern zur Anode eines elektrischen Feldes, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb bestimmter Molmassenbereiche umgekehrt proportional zum Logarithmus der Masse und somit auch der Länge ist.

2.2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente zu trennen, die größer als 200 bp sind, werden Agarosegele verwendet, die Konzentrationen zwischen 0,4 und 2 % aufweisen.

Die Agarose (Roth) wird in gewünschter Konzentration in 1x Agarosepuffer gelöst und in einem Mikrowellengerät bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgeköcht. Die Lösung wird anschließend in eine abgedichtete Flachgelkammer aus Plexiglas gegossen.

Die DNA-Proben werden mit 1/10 Volumen Ladeblau vermischt (50 % v/v Glycerin; 50 mM EDTA; 0,005 % w/v BPB [Merck, Darmstadt] und 0,005 % Xylencyanol) und in die Geltaschen pipettiert, die durch einem Kamm erzeugt werden.

Die Elektrophorese erfolgt horizontal bei einer konstanten Spannung von 80-140 V, je nach Gelgröße bzw. Elektrodenabstand, in 1x Agarosepuffer als Laufpuffer.

1x Agarosepuffer:

- 40 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- 5 mM Natriumacetat
- 1 mM EDTA

2.2.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um kleinere Fragmente (50-200 bp) aufzutrennen und voneinander zu unterscheiden werden 7,5-10%ige Polyacrylamidgele verwendet.

7,5% Polyacrylamidgel-Lösung:

- 0,94 ml 40%iger Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (Roth, Karlsruhe)
- 0,5 ml 10x TBE-Puffer (400 mM Tris-HCl, pH 8,3; 200 mM Na-acetat, 20 mM EDTA)
- 0,25 ml 1% AMPS
- 10 µl TEMED
- 3,33 ml dest. Wasser

Diese Mischung wird zur Polymerisation (ca. 10-20 min) zwischen gut gereinigte, vertikale Glasplatten gegeben, die in Vertikalapparaturen (Keutz[®], Reiskirchen bzw. BioRad[®], München) eingespannt sind. Das Gel wird in 1x TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 140 V gefahren.

2.2.8 Fragmentgrößenstandard

Als Längenstandards werden folgende DNA-Fragmenten verwendet:

- (1) lambda dv21 Octamer-DNA (partielle *EcoRI*-Spaltung) mit 25224, 22071, 18918, 15765, 12612, 9459, 6306, 3153 bp großen Fragmenten gemeinsam mit Lambda dv1-DNA (*HaeIII*-Spaltung) mit 1713, 1310, 890, 534, 460, 362, 352, 272, 223, 213, 212, 178, 142, 131, 83, 40, 36, 18 und 13 bp großen Fragmenten.
- (2) pAT153/*PvuII*/8/PB1-DNA (*PstI*, *PstI/BamHI*-, *HindIII*-Spaltung) gemeinsam mit Lambda dv1-DNA (*HaeIII*-Spaltung) mit 5664, 4133, 3136, 2528, 1713, 1310, 890, 845, 686, 534, 460, 362, 272, 223, 213, 212, 178, 142, 131, 83, 40, 36, 18 und 13 bp großen Fragmenten.

2.2.9 Färben und Fotografieren der Gele

Das Färben und Fotografieren der Gele erfolgt bei Agarose und Polyacrylamidgelen in der gleichen Art und Weise.

Nach Beendigung des Gellaufs werden die Gele aus den Kammern genommen und 5-10 min in einem Ethidiumbromid-Tauchbad [0,3 ml EB-Stammlösung (8mg/ml) auf 1 l Wasser] gefärbt. Eine anschließende Entfärbung in Wasser für 5 min bereinigt die entstandenen EB-Flecken.

Die DNA-Fragmente werden unter UV-Licht (254 nm) sichtbar und können fotografiert werden (Mitsubishi[®]-Videoprinter-Anlage). Der Größenbestimmung erfolgt durch Vergleich des verwendeten Fragmentgrößenstandards (2.2.8).

2.2.10 Isolierung von DNA-Molekülen aus Gelen

Analytische Gele werden wie oben beschrieben ausgewertet. Das Ausschneiden der gewünschten DNA-Banden erfolgt unter längerwelliger Beleuchtung (310 nm bzw. 366 nm) um DNA-Verluste bzw. -Defekte zu vermeiden.

Je nach Gelmaterial wird die DNA aus den ausgeschnittenen Banden unterschiedlich isoliert (siehe 2.10.1 und 2.10.2).

2.2.10.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wird aus dem Gel geschnitten, zerkleinert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA-Aufreinigung erfolgt nach der *gene clean*-Methode (siehe 2.2.5.3).

2.2.10.2 Diffusion von DNA-Molekülen aus Polyacrylamidgelen

70-400 bp lange Fragmente können aus Polyacrylamidgelen durch Diffusion eluiert werden. Hierzu wird das ausgeschnittene Gelstück zerkleinert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit einem Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8; 500 mM NaCl; 5 mM EDTA) überschichtet. Das Eppendorf-Gefäß wird mit einem Stück Parafilm abgedichtet und Übernacht bei 37°C geschüttelt. Der Puffer wird abgezogen und die darin vorliegende DNA mit Alkohol gefällt.

2.2.11 DNA-Modifikation und -Ligation

2.2.11.1 Ligationsreaktion

In einer Ligasereaktion werden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase sowohl komplementäre überstehende, sog. *sticky ends* als auch stumpfe Enden, sog. *blunt ends*, doppelsträngiger DNA-Moleküle kovalent miteinander verknüpft.

Hierbei werden wechselseitig die 5'-Phosphat- und die 3'-Hydroxylgruppen der Partnermoleküle unter ATP-Verbrauch einer Veresterung unterzogen. Die Vektor-DNA und das zu klonierende DNA-Fragment sollten in einem molaren Verhältnis von 1:3 vorliegen.

Ligationsansatz:

- 1-5 µl Vektor-DNA
- 3-15 µl Insert-DNA
- 4µl 5x T4-Ligationspuffer (0,25 M Tris-HCl, pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25 % [w/v] PEG 8.000, Gibco/BRL)
- 1 U T4-Ligase (Gibco/BRL)
- auf 20 µl Volumen mit dest. Wasser auffüllen

Der Ligationsansatz wird bei RT für 2-4 h inkubiert. Ein Aliquot kann hier auf ein Gel aufgetragen werden, um den Erfolg der Ligation zu überprüfen. Der Rest wird anschließend zur Transformation eingesetzt.

2.2.11.2 Phosphatase-Reaktion

Ist das für eine Ligationsreaktion vorgesehene Vektorfragment nur mit einem einzigen Restriktionsenzym als lineares Molekül hergestellt worden, ist es nötig die 5'-Phosphatgruppe der Vektor-DNA abzuspalten, damit die bevorzugte monomolekulare Rückligation verhindert werden kann. Als alkalische Phosphatase dient hier die *shrimp alkaline* phosphatase (USB), die gegenüber der CIP (*calf intestine* phosphatase, Boehringer, Mannheim) leichter zu inaktivieren ist.

Phosphatase-Reaktionsansatz:

- 5 µg Vektor-DNA
- 3µl SAP-Puffer (200 mM TrisHCl, pH 8,8)
- 1 U alkalische Phosphatase
- auf 30 µl mit dest. Wasser auffüllen

Der Reaktion läuft für 1 h bei 37°C und wird zur anschließenden Inaktivierung der Phosphatase für 10 min bei 65°C gestoppt. Man kann stattdessen hier auch eine Phenolextraktion (2.2.5.2) durchführen.

2.2.11.3 Auffüllreaktion mit Hilfe der Klenow-Polymerase (*fill-in*-Reaktion)

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes, dem großen Fragment der DNA-Polymerase I von *E.coli*, kann man den Gegenstrang zu 5'-überhängenden Enden partiell oder vollständig mit desoxy-Nukleotiden auffüllen. Dem Klenow-Fragment fehlt die 5' → 3'- Exonukleaseaktivität und kann demzufolge nur an einzelsträngiger DNA als Matrize den komplementären Strang synthetisieren.

Klenow-Reaktionsansatz:

- 5 µg DNA
- 1 µl der gewünschten dNTPs (2 mM-Lösung)
- 2,5 µl 10x Nick-Translationspuffer [0,5 M Tris-HCl (pH 7,2); 0,1 M MgSO₄; 1 mM DTT; 2 U Klenow-Fragment; Stratagene, Heidelberg] oder 5 µl T4-Ligasepuffer
- 2 U Klenow-Fragment (Stratagene, Heidelberg)
- auf 25 µl Volumen mit dest. Wasser auffüllen

Der Ansatz wird für 30 min bei RT inkubiert und zur Inaktivierung des Klenow-Fragmentes 10 min bei 70°C gestoppt. Für eine anschließende Ligationsreaktion (2.2.11.1) wird dem Klenow-Reaktionsansatz folgendes zugegeben:

- 1 µl T4-Ligationspuffer
- 2 U T4-Ligase
- 1 µl dest. Wasser (Gesamtvolumen = 30 µl)

Die Ligase-Reaktion läuft ab wie in Abschnitt 2.2.11.1 beschrieben.

2.2.11.4 T4-DNA-Polymerase

Mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase werden 3'-überhängende Enden exonukleolytisch zu stumpfen Enden abgebaut.

T4-DNA-Polymerase Reaktionsansatz:

- 5 µg DNA
- 5 µl T4-Ligasepuffer
- 1 U T4-DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim)
- auf 25 µl Volumen mit dest. Wasser auffüllen

Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen der Auffüllreaktion (2.2.11.3), das gleiche gilt für eine anschließende Ligation.

2.2.11.5 Tailing-Reaktion

Mit Hilfe der Terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) können 3'-DNA-Enden mit Cordycepin-Triphosphaten markiert bzw. homopolymere Segmente an das 3'-Hydroxylende von DNA-Molekülen angefügt werden. Für diese Reaktion ist die Gegenwart von divalenten Kationen notwendig, wobei beim Einfügen von Purinen Mg^{2+} -Ionen und beim Einfügen von Pyrimidinen Co^{2+} -Ionen bevorzugt sind. Die reaktivsten Substrate für diese Reaktion sind DNA-Moleküle mit 3'-Überhang, aber auch an stumpfen Enden bzw. an Enden mit 5'-Überhang ist beim Einsatz entsprechender Puffer und Enzymmengen eine Addition von dNTPs möglich.

In dieser Arbeit wurden dG-*Tailing*-Reaktionen durchgeführt. Bei der so behandelten DNA handelt es sich um cDNA-Moleküle, die von einer mRNA stammen, deren Transkriptionsstart zu bestimmen ist. Hierfür ist es sehr wichtig, dass die cDNA durch Aufreinigung (2.2.5.4, PCR-*Purification kit*) von den dNTPs befreit ist, um eine effiziente Kettenverlängerung ausschließlich mit dem gewünschten Nukleotid zu ermöglichen.

dG-*Tailing*-Reaktion:

- 50 µl aufgereinigte cDNA
- 13 µl 5x rTdT-Puffer [0,5 M Kaliumkacodylat (pH 7,2), 10 mM $CoCl_2$, 1 mM DTT]
- 10 mM dGTP (10mM)
- 15 U rTdT (Gibco/BRL)

Die *Tailing*-Reaktion läuft für 30 min bei 37°C ab, anschließend wird die Transferase bei 75°C für 10 min inaktiviert und der Reaktionsansatz für die folgende PCR-Reaktion auf 4°C abgekühlt.

Die Überprüfung des Einbaus der Nukleotide in der *Tailing*-Reaktion ist durch die Zugabe von Tritium-markierten Nukleosidtriphosphaten ($[^3\text{H}]\text{dNTP}$) möglich.

2.2.12 Bakterientransformation

Als Transformation bezeichnet man die Einführung von nackter DNA (Plasmid-DNA) in Bakterienzellen, die nach deren Replikation und Expression häufig neue, selektionierbare Eigenschaften aufweisen, wie z. B. bestimmte Antibiotika-Resistenzen oder β -Galaktosidase-Aktivität.

Für die Transformation muß die Zellwand der Bakterien für das einzubringende Plasmid durchlässig gemacht werden. Dies erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der CaCl_2 -Methode.

2.2.12.1 Klassische CaCl_2 -Methode (Cohen, 1972)

Durch die Behandlung der Bakterienzellen mit einem Überschuß von Ca^{2+} -Ionen werden die Zellwände destabilisiert. Dadurch wird die Aufnahme von Fremd-DNA in die nun „kompetenten“ Zellen möglich gemacht. Hierfür müssen sich die Bakterien in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befinden. Aus einer Übernacht-Kultur werden 100 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37°C geschüttelt bis eine OD_{578} von 0,2 bis 0,3 erreicht ist. Danach werden die Zellen für 5 min unter Kühlung abzentrifugiert (5000 rpm, GSA-Rotor in der Sorvall RC-5B). Das Bakteriensediment wird in 20 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) sind die Zellen in 1ml CaCl_2 -Lösung aufzunehmen und auf Eis aufzubewahren. Die kompetente Zellen sollten innerhalb von 24 h verwendet werden.

Für eine Transformation werden 100 μl kompetente Zellen zu der zu transformierenden DNA oder dem Ligationsansatz in ein Eppendorf-Gefäß gegeben, dabei wird durch mehrere schnelle Temperaturwechsel die Aufnahme der DNA ermöglicht:

Auf eine 15-minütige Inkubation auf Eis folgt ein 5-minütiger Temperaturschock bei 37°C . Dieser Temperaturzyklus wird nochmals wiederholt. Anschließend werden die Bakterien in 300 μl LB-Medium aufgenommen und für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. In diesem Schritt erfolgt die

Etablierung des Plasmids und die Expression der Selektionsmarker. Anschließend wird der Ansatz auf einer oder zwei Agar-Platten, die zur Selektion der transformierten *E.coli*-Zellen z.B. Ampicillin enthalten, ausgestrichen und für 12-16 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Transformationseffizienz beträgt zwischen 10^6 und 10^7 Transformanten pro μg Supercoil-DNA. Um einen immer gleichbleibenden Standard für die Transformationseffizienz zu haben, wird ein Ansatz immer mit der gleichen Menge Supercoil-Plasmid-DNA transformiert (positive Kontrolle). Ferner ist eine negative Kontrolle durchzuführen, bei der die Reinheit der benutzten Komponenten überprüft wird (Ansatz mit der Vektor-DNA, jedoch ohne Fragment-DNA).

2.2.12.2 Transformation nach der RbCl_2 -Methode

Ein bedeutender Nachteil der CaCl_2 -Methode besteht in der Notwendigkeit, kompetente Zellen bei Bedarf jedesmal frisch herstellen zu müssen. Dies entfällt bei der RbCl_2 -Methode, da die Zellen hierbei ohne Beeinträchtigung der Transformationseffizienz bei -70°C über mehrere Monate aufbewahrt werden können.

Das Prinzip dieser Methode entspricht dem der CaCl_2 -Methode, aber die Verwendung von Glycerin erlaubt die längere Aufbewahrung der kompetenten Zellen. Hierfür werden 500 ml Bakterienkultur (OD_{578} von 0,2 bis 0,3) benötigt. Nach der ersten Zentrifugation werden die Zellen in 50 ml TBFI-Puffer aufgenommen. Nach 1-stündiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation sind die Zellen in 5 ml TBFI-Puffer zu resuspendieren und für 2 h auf Eis zu inkubieren. Die nun kompetenten Zellen werden auf vorgekühlte Eppendorf-Gefäße (50-100 μl Aliquots) verteilt und friert sie sofort bei -70°C ein. Zur Kontrolle werden diese kompetenten Zellen durch Transformation überprüft (positive Kontrolle mit Plasmid-DNA und negative Kontrolle ohne DNA). Jetzt können nach Bedarf die Zellen auf Eis aufgetaut und gleich transformiert werden. Aufgetaute Zellen sollen nicht nochmal eingefroren und eingesetzt werden.

TBFI-Puffer:

- 100 mM RbCl_2
- 50 mM MnCl_2
- 30 mM KAc
- 10 mM CaCl_2
- auf pH 5,8 einstellen

TBFII-Puffer:

- 10 mM MOPS
- 10 mM RbCl₂
- 75 mM CaCl₂
- 15% Glycerin
- auf pH 7,7 einstellen

2.2.13 DNA-Sequenzierung

Für die Bestimmung der Abfolge von Basen in einem DNA-Abschnitt (Sequenzierung) gibt es verschiedene Methoden. In dieser Arbeit wurde zuerst nach Sanger sequenziert, später wurde die automatische Sequenzierung eingesetzt.

2.2.13.1 Sequenzierung nach Sanger

Das Plasmid, auf dem sich die gesuchte Sequenz befindet, wird zu Einzelsträngen denaturiert. Durch Zugabe eines Starter-Oligonukleotids, das spezifisch in der Nähe der 5'-Region der Sequenz bindet, wird der Startpunkt der Gegenstrangsynthese festgelegt. Das daran beteiligte Enzym Sequenase[™] (United States Biochemical), eine modifizierte T7-DNA-Polymerase, baut neben den normalen, im Reaktionsansatz enthaltenen vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) auch das in geringerer Konzentration jeweils vorhandene einzelne Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) ein. Durch den Einbau jeweils eines solchen ddNTPs in einer der vier parallelen Synthesereaktionen, wird aufgrund der DNA fehlenden 3'-Hydroxylgruppe, eine weitere Verlängerung des synthetisierten Gegenstranges unterbunden. Damit kommt es zum Syntheseabbruch an dieser Stelle und zwar in einer Serie von basenspezifischen Kettenlängen. Aufgrund der im Gegenstrang verteilten Positionen der komplementären Nukleotide entstehen DNA-Fragmente aller zugehörigen Kettenlängen, ebenso in den drei parallelen Synthesereaktionen mit einem der übrigen ddNTPs, die anschließend alle elektrophoretisch in vier Spuren auftrennbar sind.

2.2.13.1.1 Denaturierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

1-2 µg Plasmid-DNA sind in 81 µl dest. H₂O zu lösen und 9 µl NaOH (2 N) zur Denaturierung zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz präzipitiert, wobei ein gründliches Waschen des erhaltenen DNA-Sediments mit eiskaltem 80%igem Ethanol wichtig für die nachfolgenden Sequenzreaktionen ist. Das Sediment ist mit 2 µl 5x Sequenase-Puffer, 1 µl Oligonukleotid (1 pM/µl) und, wenn notwendig, mit 2 µl Mn-Puffer¹ zu versetzen, schließlich mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufzufüllen. Während der anschließenden 30-minütigen Inkubation im 37°C-Wasserbad kommt es zum Hybridisieren des Starter-Oligonukleotids an die DNA („*primer annealing*“).

Sequenasepuffer:

- 200 mM Tris/HCL (pH 7,5)
- 100 mM MgCl₂
- 250 mM NaCl

2.2.13.1.2 Sequenzierungsreaktion

Für die Sequenzierungsreaktion dem Hybridisierungsansatz zugesetzte Reagentien:

- 1,0 µl DTT (0,1 M)
- 2,0 µl Markierungsgemisch (1:5 verdünnt)
- 0,5 µl [α -³⁵S] dATP
- 2 µl SequenaseTM (13 U/µl, United States Biochemical), (1:8 mit Enzymverdünnungspuffer verdünnt)

Während der nachfolgenden 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur findet die Synthese des Gegenstranges statt, wobei durch den Einbau des radioaktiv markierten dATPs, die Markierung der synthetisierten DNA erfolgt. Anschließend werden jeweils 3,5 µl des Markierungsansatzes zu 2,5 µl der vier verschiedenen Terminationsgemische gegeben. Eine erneute 5-minütige Inkubation bei 37°C führt zu den statistisch verteilten Abbruchreaktionen der Gegenstrangsynthese. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 4 µl Stop-Puffer beendet, die Ansätze werden bei 80-90°C

¹ Eine Sequenzreaktion in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen ermöglicht eine Bestimmung der Nukleotidsequenz bis nahe an das 3'-Ende des eingesetzten Startfragments.

denaturiert und anschließend auf ein 6%iges, denaturierendes Sequenzgel aufgetragen. Nach dem Laden der Proben findet der Hauptlauf für 2-5 h bei 30-50 W bzw. 1300-1600 V statt. Das Gel wird danach in einem 10%igen Essigsäurebad fixiert (15 min), unter fließendem Wasser von Harnstoffresten befreit und anschließend getrocknet (45 min mit einem Warmluftfön oder 2 h im 70°C-Brutschrank). Die anschließende Autoradiographie erfolgt für 16-24 h bei 4°C (Fuji Medical X-ray-Film RX, 30 x 40; Kodak Scientific Imaging Film X-omat AR).

Markierungsgemisch-Stammlösung:

- 7,5 μ M dATP
- 7,5 μ M dTTP
- 7,5 μ M dGTP
- 7,5 μ M dCTP

Terminationsgemische:

- 80 μ M dATP
- 80 μ M dTTP
- 80 μ M dGTP
- 80 μ M dCTP
- 8 μ M des jeweiligen ddNTP

Sequenase-Verdünnungspuffer:

- 10 mM Tris/HCl; pH 7,5
- 5 mM DTT
- 0,5 mg/ml BSA

Stop-Puffer:

- 95% Formamid
- 20 mM EDTA
- 0,005 % (w/v) Xylencyanol FF

2.2.13.1.3 Herstellung eines Sequenzgels

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsansätze erfolgt über ein denaturierendes, vertikales Polyacrylamidgel. Zur Herstellung des Gels wird die Gellösung zwischen zwei Glasplatten (BRL, Eggenstein) gegossen. Zuvor müssen die Glasplatten vorbehandelt werden, um ein besseres Ablösen des Gels nach der Elektrophorese zu gewährleisten. Beide Platten werden zunächst mit Wasser, Ethanol und Aceton gesäubert. Die größere Platte, an der das Gel nach Trennung der Platten haften bleibt, wird mit Binde-Silan-Lösung, und die kleinere Platte, von der sich das Gel lösen muß, mit Acrylase behandelt. Anschließend muß man die beiden Glasplatten aufeinander legen, wobei ein Abstandhalter von 0,4 mm Dicke einen Spalt zwischen den Platten freihält, in den die Gellösung einzutragen ist. Nach 1-3 h ist das Gel auspolymerisiert, es kann in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1x TBE als Laufpuffer einem einstündigen Vorlauf unterzogen werden.

Gellösung:

- 70 ml Stammlösung
- 370 µl AMPS (10% w/v)
- 37 µl TEMED

Stammlösung:

- 50,4 ml 10x TBE
- 150,4 ml 20x Rotiphorese-Sequenziergelkonzentrat (237,5 g Acrylamid, 12,5 g Methylenbisacrylamid, 500 g Harnstoff)
- 150,4 g Harnstoff (im Endansatz: 8 M)
- mit dest. H₂O auf 500 ml auffüllen

TBE-Puffer:

- 0,5 M Tris/Borsäure; pH 8,3
- 10 mM EDTA

2.2.13.2 Automatische DNA-Sequenzierung

In dieser Arbeit wurde vorwiegend die automatische Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzier-Technik beruht ebenfalls auf der Kettenabbruchmethode nach SANGER. Anstelle von Radioisotopen werden hier Fluoreszenzfarbstoffe benutzt. Die sog. Multicolor-Systeme von PE Biosystems sind in der Lage, blaue, grüne, gelbe und rote Farbstoffe (Rhodamin- und Fluoreszein-Derivate) simultan anzuregen und zu detektieren, wodurch es möglich wird, für jede Base eine eigene Farbe zu verwenden.

Bei der hier verwendeten Sequenziermaschine handelt es sich um das Modell 373 A (PE Biosystems, Weiterstadt). Dieses Modell basiert auf der *Dye Terminator* Chemie, wobei das Einbringen der Farbstoffmoleküle in die DNA durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden (FddNTPs) erfolgt. In einer PCR-Reaktion (2.2.14), ausgehend von der zu sequenzierenden DNA-Matrize und einem unmarkierten Startermolekül, werden mit Hilfe einer speziellen Taq DNA-Polymerase [die Ampli-TaqFS (FS= Fluorescent sequencing)] die FddNTPs eingebaut. Die FddNTPs sorgen somit sowohl für die Abbruchreaktion der Sanger-Sequenzierung als auch für die Farbmarkierung der Fragmente.

Sequenzier PCR-Reaktion:

- 1 µg Plasmid-DNA (bei PCR-Fragmenten gilt z.B. 100 ng/500 Nukleotide)
- 3-5 pmol Startermolekül (PCR-Primer, möglichst eine T_m von 55°C)
- 4 µl Dye Terminator *ready-mix* (FddNTPs-Ampli-TaqFS-Gemisch)
- auf 20 µl mit dest. Wasser auffüllen

Die PCR-Reaktion [25x (15 sec. bei 94°C, 15 sec. bei 50°C, 4 min bei 60°C)] wird mit Alkohol gefällt und in 4 µl Ladepuffer aufgenommen. Nun werden die Proben für 3 min bei 95°C denaturiert, abzentrifugiert, und auf ein vertikales Polyacrylamidgel (34 cm lang, mit 24 parallelen Spuren versehen) aufgetragen.

Nach Anregung durch einen Argon-Laserstrahl bei 488 nm emittieren die Farbstoffe Licht verschiedener Wellenlängen zwischen 525 nm und 605 nm, das über ein Gitter, einen sog. Spektrographen, in seine Spektralfarben zerlegt wird. Anschließend erfolgt die zeitgleiche Detektion der Spektralfarben mit Hilfe des hochauflösenden Pixelfeldes einer CCD-Kamera. Die Erfassung der Daten erfolgt mit Hilfe eines Computers (Macintosh Quadra/650 MacIICx Apple Share) und der entsprechenden Auswerte-Software (PE Biosystems, Weiterstadt).

Sequenzgel:

- 30 g Harnstoff (Sigma)
- 21,5 ml dest. H₂O
- 6 ml 10x TBE

Das Gemisch wird in einem Weithalskolben bei 50°C auf dem Heizblock gelöst und folgendes zugegeben:

- 9 ml 40% Bisacrylamid (filtriert)
- 180 µl 10% APS
- 24 µl Temed

2.2.14 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR-Methode nach K.B. Mullis)

Die PCR (*Polymerase chain reaction*)-Methode (Mullis, K.B. & Faloona, F., 1987) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung und Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz, ggf. aus einem Gemisch von längeren DNA-Molekülen heraus. Hierfür werden die hitzestabilen DNA-Polymerasen ausgenutzt, die aus thermophilen Bakterien isoliert wurden. Solche Polymerasen sind in der Lage bei hohen Temperaturen über 70°C zu arbeiten und selbst bei 95°C sind sie für eine kurze Zeit stabil. Die Funktion der DNA-Polymerasen liegt prinzipiell darin, in Anwesenheit von Nukleotidgemisch (dNTPs) und zwei Startermolekülen (Primer), einen einzelsträngigen DNA-Bereich zum Doppelstrang zu polymerisieren. Bei den Startermolekülen handelt es sich um synthetische Oligonukleotide (ca. 20-30 Nukleotide lang), deren Sequenz jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist. Durch Anlagerung der Starter-Oligonukleotide kommt es zur Doppelstrang-Bildung in dem komplementären Bereich, der als Startpunkt für die DNA-Polymerase dient. In einem PCR-Zyklus laufen drei Reaktionen ab: die Denaturierung der DNA-Stränge, die Hybridisierung der Startermoleküle (*annealing*) und die Verlängerung (*extension*) der Polynukleotidkette. Nach jedem Zyklus kommt es zur Verdopplung der DNA und bei mehreren Wiederholungen zu einer exponentiellen selektiven Anreicherung des durch die Oligonukleotide begrenzten DNA-Bereichs. Mit Hilfe der PCR können auch gezielte Mutationen eingeführt werden, indem die ausgewählten Starter-Oligonukleotide neben komplementären Bereiche auch eine veränderten Sequenz, z.B. mit einer Schnittstelle, versehen wird.

Die verwendeten PCR-Maschinen, die als extrem exakte Temperaturwechsler (*thermal cycler*) bezeichnet werden können, stammen von der Firma Perkin Elmer Cetus®.

2.2.14.1 Hot-Start-PCR

Für eine erfolgreiche PCR-Reaktion sind folgende Parameter zu berücksichtigen: die Konzentration der eingesetzten Komponenten sowie die Reaktionsbedingungen: die Temperaturen und Zeiten.

In dieser Arbeit wurden folgende DNA-Polymerasen vorwiegend benutzt:

- Taq (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase (rekombinant, Gibco/BRL) und 10x PCR-Puffer [200 mM Tris/HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]
- Tfl (*Thermus flavus*) DNA-Polymerase (Master Amp™, Biozym, Oldendorf) und 20x PCR Puffer [20 mM (NH)₂SO₄, 1M Tris/HCl (pH9,0)]

PCR-Reaktionsansatz:

PCR-Komponenten	Menge
DNA-Matrize	10-100 ng
Startermolekül 1	25 µM
Startermolekül 2	25 µM
Nukleotidgemisch (dNTPs)	20 mM (aus einem Gemisch mit je 10 mM dNTP)
DNA-Polymerase Puffer	1x: 5,0 µl bei Taq DNA-Polymerase Puffer 2,5 µl bei Tfl DNA-Polymerase Puffer
MgCl ₂	75 mM
DNA-Polymerase	2 U bei Taq DNA-Polymerase 1 U bei Tfl DNA-Polymerase
dest. H ₂ O	auf ein Gesamtvolumen von 50 µl auffüllen

Hierbei gilt: 1U katalysiert den Umbau von 10 nM Desoxyribonukleosid-Triphosphaten bei 74°C innerhalb von 30 min in ein säureunlösliches DNA-Produkt.

Die PCR-Reaktion fängt normalerweise mit dem sog. *Hot-start* an: Erst wird der Ansatz ohne die Polymerase bei 94°C inkubiert, um die erste Denaturierung der DNA zu ermöglichen. Nach

Erreichen einer Temperatur von 80°C wird die DNA-Polymerase zum Ansatz zugegeben, um eine unspezifische Amplifikation bei noch niedriger Temperatur zu vermeiden. Danach läuft die eigentliche PCR- Reaktion über 25-35 Zyklen ab.

Für jeden Zyklus gelten folgende **Reaktionsbedingungen**:

Reaktion	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	30-60 sec
Hybridisierung (<i>anealing</i>)	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30-60 sec
Verlängerung (<i>extension</i>)	72°C	1 min/1kb

Schließlich wird noch bei 72°C über 10 min die Kettenverlängerung durchgeführt und schließlich abgekühlt.

Sowohl bei der Zusammensetzung als auch bei den Reaktionsbedingungen gibt es Parameter, die zu berücksichtigen sind, wie die Schmelztemperatur der Oligonukleotide und die Magnesiumchlorid-Konzentration.

Bei T_m ($m = \text{melting}$) handelt es sich um die Schmelztemperatur der DNA, bei der die Hälfte der Nukleinsäure-Moleküle in einer Lösung in der doppelsträngigen Form, die andere als Einzelstrang-Moleküle vorliegt. Für die Errechnung der T_m gilt:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 (G + C)$$

Für den Reaktionsverlauf ist es deshalb günstig, wenn beide Startermoleküle (*primer*) die gleiche T_m aufweisen. Dies kann aber nicht immer verwirklicht werden. Durch den Einbau von einer zur DNA-Matrize nichtkomplementären Sequenz zuerst an den 5'-Enden der Oligonukleotide (z.B. von Restriktionsschnittstellen zur anschließenden Klonierung der Reaktionsprodukte) werden oft zwei verschiedene T_m -Werte erhalten. Daher ist es oftmals zweckmäßig, zuerst einige Zyklen bei einer geringeren als der errechneten Temperatur durchzuführen und DNA die Temperatur zu steigern. Die synthetisierten Matrizen-Stränge sind DNA um die vollständige Oligonukleotid-Sequenz (*primer*) verlängert und erlauben somit für die weiteren Zyklen die Verwendung der höheren (errechneten) Temperatur.

Bei der Amplifikation von größeren DNA-Fragmenten ist es empfehlenswert, die Konzentration von MgCl_2 zu erhöhen, damit die Ausbeute besser und spezifischer wird. Dafür gibt es jedoch keine Regel, es gilt das Ausprobieren. Im Allgemeinen lassen sich Probleme bei der PCR durch

eigene Erfahrung und die Hilfe anderer lösen. Gute Tipps enthält ein von der Firma Qiagen herausgegebener Ordner mit „Problemstellung und Problemlösung in Sachen PCR“, der sehr nützlich ist.

Neben der erwähnten *Hot-start*-PCR wurden in dieser Arbeit außerdem die RT (Reverse-Transkriptase)-PCR, die *nested primer*-PCR und die RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-PCR durchgeführt. Bei der RT-PCR wird der PCR-Reaktion ein Reverser Transkriptionsschritt vorgeschaltet (2.3.4). Im Falle der *nested*-PCR werden zwei PCR-Reaktionen mit verschiedenen Starternukleotidpaaren - das zweite innerhalb der ersten gelegen- hintereinandergeschaltet, um die Spezifität und Ausbeute des zu amplifizierenden Fragmentes zu erhöhen. Mit der RACE-PCR lassen sich 5'- oder 3'- terminale Sequenzen, z.B. einer cDNA-Matrize bzw. indirekt für die zugehörige mRNA, bestimmen (siehe 3.4).

2.2.15 Synthetische Oligonukleotide (*Primer*)

Diese kurzkettigen Nukleinsäure-Moleküle sind in der Molekularbiologie von großer Bedeutung. Sie dienen als Startermoleküle bei allen PCR-Reaktionsvarianten und werden auch bei der Neukombination von Nukleinsäuremolekülen verwendet, ohne dass eine PCR-Reaktion benötigt wird. Im zweiten Fall werden die Oligonukleotide so hergestellt, dass sie nicht nur mit internen, sondern auch mit terminalen Schnittstellen versehen sind. Die terminalen Schnittstellen sind DNA in der zu mutagenisierenden Plasmid-DNA vorhanden. Nach Spaltung und Aufreinigung des Vektor-Plasmids, kann das Oligonukleotid mit Hilfe der Ligation inkloniert werden. Hierzu muß das Oligonukleotid als Paar vorliegen, was durch einen einfachen Hybridisierungsschritt erfolgt:

Die Oligonukleotid-Paare werden in gleicher Menge je 10 µM in einem Eppendorf-Gefäß zusammengegeben, mit 0,01 M NaCl und 0,05 M TRIS/HCl (pH 7,5) versetzt und das Volumen wird mit dest. Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Das Gemisch wird 10 min lang bei 70°C inkubiert und anschließend in einem Gefäß mit 70°C heißem Wasser langsam bis zur RT abgekühlt. Zur Kontrolle wird das Oligonukleotid-Paar auf ein Agarosegel (sehr kurzer Lauf) aufgetragen.

Die in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide wurden zuerst von Frau S. Heck am Institut für Mikro- und Molekularbiologie in Gießen mit einem Gerät der Firma Applied Biosystems (380B DNA Synthesizer) synthetisiert. Später wurden die Oligonukleotide von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, erhalten.

2.3 RNA-Methoden

2.3.1 Präparation von RNA-Molekülen aus eukaryoten Zellen

Die Isolierung von RNA-Molekülen erfolgt ausschließlich mit Hilfe von Qiagen RNA-Isolierungskits.

2.3.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Alle Zentrifugationsschritte laufen bei 13000 rpm und 16°C ab.

10^6 - 10^7 Zellen werden mit 600 µl Lysispuffer (100 RLT-Puffer:1 Mercaptoethanol) lysiert. Das Zelllysate wird auf eine QiaSchredder-Säule gegeben und für 2 min abzentrifugiert. Das Eluat wird mit 600 µl 70% Ethanol versetzt, gut gemischt, DNA auf eine RNAeasy *mini Spin*-Säule gegeben und für 15 sec zentrifugiert (es erfolgt die RNA-Bindung an die Silica-Matrix). Die Säule wird dreimal gewaschen (einmal mit 700 µl RW1 Puffer und zweimal mit 500 µl RPE Puffer). Anschließend wird die Säule in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA wird mit 15 µl dest. H₂O eluiert. Die durchschnittliche Konzentration der auf diese Weise gewonnenen Gesamt-RNA beträgt 1 µg/µl.

2.3.1.2 Isolierung von mRNA-Molekülen

Die direkte Isolierung von mRNA erfolgt mit dem Qiagen Oligotex Direkt mRNA-Isolierungskit.

Alle Zentrifugationsschritte laufen bei 13000 rpm und 16°C ab.

10^6 - 10^7 Zellen werden mit 600 µl Lysis Puffer (1 ml QII: 33 µl Mercaptoethanol) lysiert. Das Zelllysate wird auf eine Qiaschredder-Säule gegeben und für 2 min abzentrifugiert. Das Eluat wird mit 2400 µl Verdünnungspuffer gemischt und für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 35 µl Oligotex versetzt, gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Hier erfolgt die Bindung der mRNA an die Oligo-dT-haltige Silica-Matrix. Der entstandene mRNA-Matrix-Komplex muß nun abzentrifugiert und in 350 µl OW1 resuspendiert werden. Um die gebundene mRNA zu isolieren, wird das Gemisch auf eine weitere Säule

gegeben. Nach zwei Waschschritten mit OW2-Puffer wird die mRNA mit 20 µl dest. Wasser eluiert. Die durchschnittliche Konzentration der hier gewonnenen RNA beträgt 0,2 µg/µl.

2.3.2 Präparation viraler RNA-Molekülen

Die Viren werden durch Hämadsorptionsverfahren (2.4.9) aufgereinigt und konzentriert. 140 µl Virussuspension werden mit 560 µl AVL/*Carrier* RNA gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Es erfolgt die RNA-Bindung an die *Carrier*-Lösung. Durch Zugabe von 560 µl 96%igem Ethanol und eine anschließende Zentrifugation (2 min bei 8000 rpm) werden ungebundene RNA-Moleküle und virale Reste gefällt. Im Überstand befinden sich die gebundenen RNA-Moleküle, die auf eine *QiaAmp-Spin*-Säule gegeben werden. Die Säule wird einmal mit 500 µl AW1-Puffer und zweimal mit je 500 µl AW2-Puffer gewaschen. Beim letzten Waschschrift wird 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird anschließend in ein neues steriles Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA wird mit 60 µl AVE-Puffer eluiert.

2.3.3 Auftrennung von RNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese

Hierbei handelt es sich um ein Formaldehyd-haltiges denaturierendes Agarosegel, das zur Auftrennung von RNA-Fragmenten dient.

Denaturierendes Agarose-Gel:

1 g Agarose

37 ml dest. Wasser

10 ml 10x MOPS (0,2 mM MOPS, 10 mM EDTA, 100mM NaAc)

Das Gemisch wird aufgekocht und auf 60°C abgekühlt.

16 ml 37%iges Formaldehyd

Das Gel muß DNA sofort gegossen werden. Nach dem Erstarren wird es mit RNA-Gel-Laufpuffer in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt. Die RNA wird mit einem speziellen Probenpuffer zusammen aufgetragen. Der RNA-Größenstandard (Gibco/BRL) weist folgende Fragmente auf: 9488, 6225, 3911, 2800, 1898, 872, 562, 363 bp.

RNA-Gel-Laufpuffer:

- 40 ml 10x MOPS (siehe oben)
- 65 ml 37%iges Formaldehyd
- 295 ml dest. Wasser

RNA-Probenpuffer:

- 1-5 µg RNA
- 5 µl RNA-NEW-Puffer (7,5 µl 37%iges Formaldehyd, 4,5 µl 10x MOPS, 25,9 µl Formamid, 7,5 µl dest. Wasser)
- 2 µl Formamid-Farbmarker [50% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,25% (v/v) Bromphenolblau, 0,25% (v/v) Xylencyanol]

Das Gel läuft ca. 3 h bei 80 V. Da es sich in dieser Arbeit ausschließlich um Eukaryonten RNA-Isolate handelt, müssen auf dem Gel die 28S- und 18S-rRNA als dominante Banden sichtbar sein.

2.3.4 Reverse Transkription mit MMLV-RT

Mit Hilfe der reversen Transkriptase kann eine RNA-Matrize in DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Zunächst wird eine Reverse Transkriptions-Reaktion von Gesamt-RNA oder von *messenger*-RNA (mRNA) mit einem Oligo-dT-Molekül oder auch mit einem spezifischen internen Startermolekül durchgeführt. Bei der hier eingesetzten Reverse Transkriptase handelt es sich um die *Moloney murine leukemia virus* Reverse Transkriptase (Stratagene).

Reverse Transkriptase-Ansatz:

- 5 µg RNA
- 100 µM Startermolekül

Die RNA-Präparation und das Startermolekül werden für 10 min bei 75°C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturbildungen in der RNA-Matrize als Störfaktor für die Transkriptase zu vermeiden. Aber auch ohne diesen Schritt erfolgt normalerweise eine Transkriptionsreaktion.

Reverse Transkriptase-Reaktionansatz:

- 28 U RNasin® (Promega)
- 25 mM dNTPs
- 5 µl 10x Reverse Transkriptase-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂]
- 50 U Reverse Transkriptase(StrataScript™, Stratagene)
- auf 50 µl Volumen mit dest. Wasser auffüllen

Für die reverse Transkription wird der Ansatz 15 min bei 42°C und 45 min bei 37°C inkubiert. Eine längere Inkubation bei 42°C für 2 h mit einer 30-sekundigen Unterbrechung bei 55°C ist bei längeren RNA-Matrizen empfehlenswert. Eine anschließende 5-minütige Inkubation des Ansatzes bei 95°C führt zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase, die bei einer darauffolgenden PCR-Reaktion die DNA-Polymerase in ihrer Funktion behindert. Für eine PCR-Reaktion werden dann 5-20 µl des Reversen Transkriptionsansatzes eingesetzt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zelllinien

Bei den benutzten Zelllinien handelt es sich um MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) und 293T (humane, embryonale Nierenzelllinie mit genom-integriertem großen T-Antigen vom Virus SV40).

2.4.2 Kultivierung von Gewebekulturzellen

Die Zellen sind bei 37°C in ca. 96%iger Luftfeuchtigkeit und einer 5%igen CO₂-Konzentration in einem Brutschrank (Heraeus; Labotect: Steri-Cult 200 Inkubator) in einem geeigneten Nährmedium zu züchten. Die gleichen Inkubationsbedingungen gelten auch für infizierte Zellen.

Das Nährmedium:

- DMEM (Dulbecco *Eagle's minimal essential medium*, mit 8 mM L-Glutamin, Gibco/BRL)
- 10% FKS (fötales Kälberserum), 30 min bei 56°C inaktiviert
- 1% 100x PEN./STREP. Antibiotika-Gemisch (Gibco/BRL)

2.4.3 Trypsinbehandlung zur Ausdünnung von Gewebekulturzellen

Die konfluent auf Petrischalen (Ø: 6 cm) als "*Monolayer*" gewachsenen Zellen müssen regelmäßig ausgedünnt werden. Dazu sind die Zellen erst mit PBS [140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)] zu waschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Durch Inkubation (je nach Zelllinie 1-20 min) mit einer Trypsin/EDTA-haltigen [0,2% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/w) EDTA] PBS-Lösung lösen sich die Zellen von der Petrischale ab, eine Reaktion, die durch Zugabe von Nährmedium gestoppt wird. Das Volumen des Nährmediums bestimmt den Verdünnungsgrad. Sollen die Zellen im Verhältnis 1:2 ausgedünnt werden, so wird so viel Medium zugegeben, dass das Volumen anschließend auf zwei Petrischalen verteilt werden kann.

2.4.4 DNA-Transfektion in eukaryoten Zellen

Im Gegensatz zu der Transformation von Bakterien-Zellen, die erst durch eine Vorbehandlung aufnahmefähig gemacht werden müssen, wird die DNA-Aufnahme bei der Transfektion eukaryoter Zellen meist durch einen DNA-Reagens-Komplex verwirklicht. Aus dem umfangreichen Angebot an Reagentien muß zunächst das richtige Reagens ermittelt werden. Denn nicht jede Zelllinie verträgt jedes Reagens, d.h. der Erfolg mit einem Reagens bei einer Zelllinie verspricht nicht das gleiche Ergebnis bei einer anderen.

In unserem Labor wird standardmäßig das LipofectaminTM-Reagens (Gibco/BRL) benutzt. Für die Transfektion werden ausschließlich 293T-Zellen (60-80% Konfluenz) verwendet. Das meinerseits durchgeführte nachträgliche Austesten anderer Transfektionsreagentien (Effectin, Qiagen; FuGENE6, Roche; TransLT1 und -LT2, MO BI Tec) zeigte, dass Lipofectamin immer noch eine gute Wahl ist. Dazu kommt das Lipofectamin-Plus Reagens (Gibco/BRL), mit dem die Transfektion mit Lipofectamin effizienter wird.

Das Prinzip der Transfektion liegt darin, dass das Lipofectamin mit seinen positiv geladenen Komponenten DOSPA (ein polykationisches Lipid) und DOPE (ein Phospholipid) eine Komplexbildung mit der negativ geladenen DNA eingeht (DNA-Lipidkomplex). Der hydrophobe Anteil des Komplexes ist in der Lage, mit der Zellmembran zu fusionieren, und es kommt zur Freisetzung der DNA in der Zelle. Die vorherige Inkubation der DNA mit dem Lipofectamin-Plus Reagens führt zur Bildung eines Vorläufer-Komplexes, was die Wahrscheinlichkeit der DNA-Lipid-Komplexbildung erhöht.

Transfektionsablauf:

Da Lipofectamin an Polypropylenoberflächen bindet, ist es hier erforderlich, spezielle Lipofectamin-Röhrchen (Falcon©) zu benutzen. Die 293T-Zellen adherieren sehr schlecht an die Petrischale und müssen deswegen sehr vorsichtig behandelt werden.

In einem Lipofectamin-Röhrchen werden 8 µl Lipofectamin-Plus Reagens, verdünnt in 92 µl DMEM-Medium, mit 2,5 µg der zu transfizierenden DNA für 15 min inkubiert. Hier bildet sich der DNA-Plus Reagens Vorläufer-Komplex. Mit der Zugabe von 6 µl Lipofectamin Reagens (in 94 µl DMEM-Medium verdünnt) und Inkubation für weitere 15 min erfolgt die Bildung von DNA-Lipidkomplexen. Das Röhrchen wird anschließend auf 4 ml mit DMEM-Medium aufgefüllt und sehr vorsichtig auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach einer

Inkubationszeit von 5 h ist das DMEM-Medium durch Nährmedium zu ersetzen und für weitere 21 h zu inkubieren.

Für eine erfolgreiche Transfektion sind die Mengen an DNA und Reagens sehr wichtig. Bei der gleichzeitigen Transfektion mehrerer Plasmide darf die DNA-Gesamtmenge von 10 µg nicht übersteigen, weil steigende Mengen an Komplex sehr wahrscheinlich zytotoxisch auf die Zellen wirken. Weiterhin muß das DNA-Volumen möglichst gering gehalten werden (maximal 20 µl), denn ein größeres Volumen stört das Reagens-Medium-Volumenverhältnis und damit die Konzentration des Reagens.

2.4.5 Virusvermehrung

Für die Infektionsversuche wird ausschließlich das aviäre Influenza Virus A/FPV/Bratislava benutzt. Das Virus läßt sich auf MDCK-Zellen gut vermehren, schon nach einer 8-stündigen Infektion der Zellen mit FPV ist ein Replikationszyklus abgeschlossen.

2.4.5.1 Herstellung von Virusstammlösung durch Zellinfektion

Bei allen Infektions-Versuchen werden die zu infizierenden Zellen mit PBS⁺ (PBS, 2,5 mM MgCl₂, 3,4 mM CaCl₂) gewaschen, da die zweiwertigen Ionen eine Stabilisierung des Virus bewirken. Deswegen empfiehlt es sich auch, die Viruskonzentrate in PBS⁺ zu verdünnen.

Um eine Virusstammlösung herzustellen, werden 80% konfluente MDCK-zellen mit einer m.o.i. (*multiplicity of infection* = Infektionsmultiplizität) von 0,05 infiziert und 1 h inkubiert. Bei dieser 1-stündigen Inkubation kommt es zur Adsorption der Viren an die Zelloberfläche. Das PBS⁺ mit den darin nicht adsorbierten Viren wird durch Nährmedium ersetzt und die Zellen werden für ca. 24 h inkubiert. Das Nährmedium, in dem sich dann die Virus-Nachkommenschaft befindet (virushaltiger Überstand), kann abgenommen werden. Der Virustiter kann mit Hilfe eines Hämagglutinationstestes oder einer Plaquetitration bestimmt werden.

Bei den Infektionsexperimenten variieren die m.o.i. und die Zeit bis zum Abnehmen des virushaltigen Überstandes.

2.4.6 Hämagglutinationstest

Hierbei werden die Eigenschaft des HA-Oberflächenproteins benutzt, Erythrozyten zu agglutinieren. Der Test ist ein Schnellverfahren zur indirekten Titer-Bestimmung des Influenza-Virus. Der Test hat den Nachteil, dass der Titer nicht nur aktive infektiöse Viren, sondern auch defekte Viren erfaßt.

Zunächst werden in einer Mikrotiterplatte jeweils 50 µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung vorgelegt und die erste Kammer wird dann mit dem gleichen Volumen der zu testenden Virussuspension versetzt. Reines DMEM-Medium dient als negative Kontrolle. Das Gemisch wird fortlaufend von der ersten bis zur letzten Kammer jeweils im Verhältnis 1:2 verdünnt. Nach Zugabe einer 1%igen Hühnererythrozyten-Suspension (50 µl pro Kammer) wird die Platte für 45 min bei 4°C inkubiert. Die einzelnen Kammern zeigen dann entweder sedimentierte Erythrozyten (geringe Virus-Konzentration) oder eine diffuse Lösung (Virus-Agglutination). Der HA-Titer errechnet sich aus dem reziproken Wert der letzten Verdünnung, bei der noch eine Agglutination zu beobachten ist. Ein HA-Titer von 1 entspricht etwa 10^6 Viren/ml.

Vorbereitung von Hühner-Blut:

10 ml frisches Hühnerblut wird für 10 min zentrifugiert (1500 rpm, 4°C). Die untere Phase (Erythrozyten) wird zweimal mit 40 ml PBS⁺ gewaschen. Das Volumen der unteren Phase wird bestimmt und daraus dann eine 10% Erythrozyten-Suspension durch Verdünnung mit PBS⁺ hergestellt.

2.4.7 Plaque-Test

Mit Hilfe des Plaque-Tests erfolgt die quantitative Titer-Bestimmung infektiöser Viren. 1,6%iges Agar (in Wasser suspendiert) wird autoklaviert und nach Abkühlen auf 42°C im Verhältnis 1:1 mit Nährmedium gemischt. Dann werden mehrere Platten mit ca. 10^6 MDCK-Zellen mit jeweils 1 ml verschiedener Virus-Verdünnungen (in PBS⁺) infiziert. Nach 1 h Inkubation wird die Virussuspension durch 4 ml agarhaltiges Nährmedium ersetzt.

Durch das Erstarren der Agarose wird verhindert, dass die Tochter-Viren frei diffundieren können, sie infizieren damit nur Nachbar-Zellen. Die Zellen werden 2-3 Tage lang inkubiert. Durch Lyse der infizierten Zellen entstehen Löcher (Plaques) im Zellrasen. Die Anzahl der gebildeten Plaques entspricht der Zahl der infektiösen Viren in der verdünnten Suspension. Für die Berechnung der

Ausgangskonzentration muß die Virus-Verdünnung berücksichtigt werden. Wegen der Möglichkeit der Komplementation zweier Defektviren bei Doppelinfection wird bei dem Titer von *Plaque forming units* (pfu) gesprochen.

2.4.8 Primärinfektion und Passage

Für die primäre Infektion werden die getesteten Viren (2.4.4) mit dem gewünschten Titer eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die primäre Infektion mit einer Infektionsmultiplizität von 1 durchgeführt, d.h. die Anzahl der verwendeten Viren entspricht der Zahl der zu infizierenden Zellen (ca. 10^7 Viren / 10^7 Zellen).

Hierzu werden die zuvor transfizierten 293T-Zellen mit 1 ml PBS⁺ gewaschen und mit 1 ml Virussuspension (in PBS⁺) infiziert. Nach einstündiger Inkubation wird die Virussuspension durch 4 ml Nährmedium ersetzt und für weitere 10 h inkubiert. Die infizierten Zellen werden für den Nachweis von Reporter genen aufgehoben (siehe 2.5). Der virushaltige Überstand dient für die Passage auf MDCK-Zellen. Bei der Virus-Passage werden zuvor mit PBS⁺ gewaschene MDCK-Zellen (ca. 10^7 Zellen, 70-90% konfluent) standardmäßig mit 1 ml virushaltigem Überstand infiziert. Dabei variiert die m.o.i von 3 bis 8, abhängig davon wie erfolgreich die primäre Infektion oder die vorausgegangene Passage war. Nach 1 h wird die Virussuspension durch 4 ml Nährmedium ersetzt und die Inkubation für weitere 10 h fortgesetzt. Nach 7-8 h kann der cytopathische Effekt (CPE) kontrolliert werden. Die Zellen und der virushaltige Überstand werden wie bei der primären Transfektion behandelt.

2.4.9 Virale RNA aus Hämadsorptions-gereinigten Viren

Eine frisch vorbereitete Erythrozyten-Suspension wird mit dem virushaltigen Überstand zu einer Endkonzentration von 2% vermischt. Das Gemisch wird 60 min lang auf Eis geschüttelt. In diesem Schritt erfolgt die HA-Bindung an die N-Acetylneuraminsäure der Erythrozyten-Oberfläche. Der Erythrozyten-Viren-Komplex wird sedimentiert (5 min, 1200 rpm bei 0°C) und zweimal mit kaltem PBS⁺ gewaschen. 1/10 des Ausgangsvolumens des virushaltigen Überstandes in warmem PBS⁺ wird jetzt zu dem Sediment hinzugegeben und dieses für 60 min bei 37°C leicht geschüttelt. In diesem Schritt erfolgt mit Hilfe von NA die Spaltung der Sialinsäure-HA-Bindung,

so dass die Viren in dem PBS freigesetzt werden. Nach einer kurzen Zentrifugation (5 min, 1200 rpm) wird der virushaltige Überstand für die RNA-Isolierung aufgehoben. Die virale RNA-Isolierung erfolgt mit Hilfe eines Isolierungskits (*viral RNA-Purification Kit*, siehe 2.3.2).

2.5 Reporter-gen-Nachweisverfahren

Mit Hilfe von Enzymreaktionen kann die Proteinexpression von Fremdgenen, die nach einer Transfektion oder Infektion in die Zelle eingebracht wurden, nachgewiesen werden.

2.5.1 Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)

Das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase wird in den Bakterien gebildet, um das Antibiotikum Chloramphenicol zu inaktivieren. Dabei wird Chloramphenicol mit Hilfe von dem Coenzym Acetyl-CoA in das unschädliche 1,3 Diacetyl-Chloramphenicol umgesetzt. CAT kommt in Eukaryoten nicht vor und kann dort als Reporter-gen eingesetzt werden. Das kompakte Proteinmolekül erfährt in diesen Zellen keinen proteolytischen Abbau und wird in guter Proportionalität zur Expression akkumuliert. Für die Verwendung als Reporter-gen wird der kodierende Bereich des CAT-Gens anstelle des Eukaryonten Gens hinter einen zu testenden Promotor kloniert. Die Aktivität des Promotors läßt sich dann anhand der CAT-Enzymaktivität messen.

Nach der Transfektion oder Infektion (siehe 2.4.4 und 2.4.8) werden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte abgelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen werden sedimentiert (10 min, 1600 rpm bei 293T-Zellen und 2000 rpm bei MDCK-Zellen). Das Zellsediment wird in 105 µl Tris/HCl (0,25 mM, pH 7,5) resuspendiert und durch zwei Einfrier- (5 min in flüssigem Stickstoff)/Auftau (5 min bei 37°C)-Schritte lysiert. Eine anschließende Inkubation des Zelllysats für 10 min bei 56°C sorgt für die Inaktivierung von Deacetylasen, die den Abbau von acetylierten Formen (den CAT-Reaktionsprodukten) katalysieren. Durch eine Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm) werden die Zelltrümmer sedimentiert, der Überstand mit den darin freigesetzten Proteinen kann entweder

direkt für die CAT-Reaktion benutzt werden oder er wird bei -20°C für spätere Verwendung aufgehoben.

CAT-Enzymreaktion:

- 50 μl Zelllysate
- 10 μl Acetyl CoA (4 mM, Sigma)
- 8 μl *BODIPY*TM CAM-Substrat-Lösung (Flash CAT-Kit, Stratagene)

Bei *BODIPY*TM handelt es sich um ein fluoreszenzmarkiertes Chloramphenicol-Substrat (Bordipyromethandifluorid-Fluorophore). Das Reaktionsgemisch wird für 4 h bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der Reaktionsprodukte wird das Gemisch mit 500 μl Ethylacetat gut gemischt. Durch Zentrifugation (5 min bei 13000 rpm) kommt es zur Phasentrennung. 450 μl der oberen Phase, in der sich die Reaktionsprodukte befinden, werden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und vakuum-getrocknet, in 10 μl Ethylacetat aufgenommen und auf einer Dünnschicht-Chromatographie-Platte (DC-Platten Kieselgel 60, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm; Merck) aufgetragen. Als Laufmittel für die Chromatographie dient ein Chloroform:Methanol-Gemisch (74:26). Unter UV-Beleuchtung können die Reaktionsprodukte sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

Für die Auswertung der CAT-Reaktion sind einige wichtige Bemerkungen zu machen. Eine längere Inkubationszeit bis zu 7 h führte nicht zu besseren Ergebnissen (CAT-Aktivität). Um genauere Ergebnisse zu erzielen, wurde das Volumen des Zelllysate-Überstandes bestimmt und davon genau die Hälfte minus 5 μl wurde eingesetzt, damit bei einem wiederholten Einsatz das gleiche Volumen benutzt werden kann. Die Volumenbestimmung ist vor allem für Verdünnungsansätze der stark aktiven Proben sehr bedeutsam. Diese Volumenungenauigkeiten kommen bei der ersten Zentrifugation zustande, da das PBS nicht überall in gleicher Weise aus dem Zellsediment entfernt werden kann.

2.5.2 Grün-fluoreszierendes Protein (GFP)

Das GFP-Protein, das ursprünglich aus den beiden Cnidaria *Aequorea victoria* und *Renilla spp.* isoliert wurde, strahlt bei zwei Anregungsmaxima (396 nm und 475 nm) jeweils Licht der

Wellenlänge von 508 nm ab (Morise *et al.*, 1974). Mit geeigneten Filtern ist eine Detektion des exprimierten GFPs in der lebenden Zelle möglich (Zylka & Schnapp, 1996; Chatterjee & Stochaj, 1996).

Der Vorteil gegenüber anderen Reportersystemen ist die direkte Detektierbarkeit der GFP-Expression in den lebenden Zellen oder Geweben (Chalfie *et al.*, 1994; Misteli & Spector, 1997; Presley *et al.*, 1997). Eine so schnelle Detektierbarkeit eignet sich, um eine schnelle Aussage über die Transfektionseffizienz zu machen. Hierbei werden jedoch nur grün-fluoreszierende Zellen gegenüber den nicht fluoreszierenden gezählt. Nachteilig ist dagegen die schlechte Quantifizierbarkeit, die nur bedingt unter Verwendung von FACS-Geräten erfolgen kann.

Verschiedene Mutationen führten zur Verstärkung der Emission des grün-leuchtenden Proteins, zur Verschiebung der Anregungs- und Emissionsmaxima (rote und blaue Varianten) und zur Steigerung der Thermostabilität des C-Terminus (Siemering *et al.*, 1996). Durch Substitution V163A, I167T und S175G konnte die Temperatursensitivität des grün leuchtenden Proteins stark vermindert werden, so dass bei 37°C eine 20-fach stärkere Fluoreszenz gegenüber dem Wildtyp-GFP vorliegt (Siemering *et al.*, 1996). Dies wird durch thermische Stabilisierung der fluoreszierenden Form erreicht. Mit Hilfe des grün leuchtenden Proteins ist es nun möglich, ohne Aufarbeitung von Zellen bzw. Geweben, die Reportergen-Expression nachzuweisen.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Auflicht-Fluoreszenztechnik kommen einerseits der Filtereinsatz Blau 450-490 (487909) mit der Filterkombination für Anregungsfilter BP 450-490 (447722), Farbteiler FT510 (446434) und Sperrfilter LP520 (447737) sowie der neue GFP-Filtersatz 13 (488013) mit dem Anregungsfilter BP 470/20, Farbteiler FT 493 und Emissionsfilter BP505-530 der Firma Zeiss zum Einsatz. Die Dokumentation erfolgt mittels der Mikroskopkamera MC100 auf einem Axioplan Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Diafilm Kodak Elite II 400 ASA; Belichtungseinstellung 400).

2.5.3 β -Galaktosidase

Der Nachweis des Prokaryonten-Reportergens β -Galaktosidase erfolgt durch histochemische X-Gal-Färbung von Zellen und Geweben. Die Spaltung eines chromogenen Substrates (X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-thiogalaktosid) führt zum unlöslichen blauen Indigo in propotionaler Weise zur Expression dieses Proteins.

Zunächst werden die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und mit 2%igem Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen werden anschließend mit 3 ml Färbelösung überschichtet und bei 37°C inkubiert (3-12 h).

X-Gal-Färbelösung:

- 60 µl 1 M MgCl₂
- 150 µl 1 M Kaliumhexacyanoferrat (III)
- 300 µl 0,5 M Kaliumhexacyanoferrat (II)
- 28,74 ml PBS
- 750 µl X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid)

Die X-Gal-Lösung wird eingefroren und vor Verwendung zur Lösung gegeben.

Auf diese Weise gefärbte Zellen sind in PBS-Lösung einige Tage bei 4°C haltbar.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einführung

In dieser Arbeit wurde das für die *in vivo*-Analyse von Influenza A-Viren in unserem Labor etablierte RNA-Polymerase I-Transkriptionssystem (Neumann *et al.*, 1994) verwendet. Alle erzeugten Konstrukte unterliegen damit den Bedingungen für das Polymerase I-Transkriptionssystem. Ausgangsplasmide sind pHH10 und pHH21 und die daraus abgeleiteten pHL-Konstrukte (Hoffmann, 1997), in denen der früher verwendeten murine rDNA-Promotor durch den humanen ersetzt worden ist. Das vRNA-Segment, das jeweils zwischen den humanen rDNA-Promotor und den murinen Terminator eingebaut wird, besitzt in seiner hochkonservierten Region am 3'-Promotorende drei Nukleotidaustausche ($G \bar{3} \rightarrow A \bar{3}$; $U \bar{5} \rightarrow C \bar{3}$ und $C \bar{8} \rightarrow U \bar{8}$)¹. Es handelt sich dabei um die „promotor-up“-Mutation des Plasmids pHL1104 (Neumann und Hobom, 1995). Dabei ist die 3'-Sequenz durch die drei Substitutionen in komplementärer Weise an das 5'-Ende der nichtkodierenden Region angepasst worden. Dies ermöglicht in der vRNA, aufgrund der inversen Nukleotidabfolge ihrer Endbereiche, die Ausbildung eines vollständigen Doppelstranges in den Endabschnitten. Diese Mutationen führen in der Flankensequenz zu dem Reporter gen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) zu einer gegenüber dem Wildtyp pHL926 stark erhöhten CAT-Aktivität. Durch die erhöhte CAT-Aktivität im Konstrukt pHL1104 ist es möglich geworden, auch abgeschwächte Promotorvarianten oder schlecht nachzuweisende Fremdsegmente (z.B. große Fremdsegmente) mit Hilfe des CAT-Reporter gens zu detektieren. Das CAT-Reporter gen wird anstelle der kodierenden Region des Influenza A-Segmentes punktgenau von AUG bis UAA eingesetzt.

Zur *in vivo*-Analyse werden humane 293T-Zellen mit den zu testenden Plasmid-DNA-Konstrukten transfiziert und danach mit dem FPV-Influenza-Virus infiziert. Eine Aussage über den Erfolg der Transfektion bzw. der Infektion läßt sich durch Vergleich mit dem CAT-positiven Plasmid pHL1844 (Hoffmann, 1997) machen. Das zu pHL1104 (mit murinem rDNA-Promotor) analoge pHL1844-Konstrukt (humaner rDNA-Promotor) dient in dieser Arbeit als positive Kontrolle in allen *in vivo*-Experimenten, und nicht pHL1863 (Influenza vRNA-Wildtyp-Promotorsequenz, transkribiert durch den humanen rDNA-Promotor), siehe

¹ Die überstrichenen Nukleotide bzw. Nukleotidpositionen beziehen sich auf das 3'-Promotorende der vRNA bzw. der cRNA, in der Zählung ausgehend von dem 3'-terminalen Nukleotid des vRNA-Promotors.

Abbildung 3.1. Das CAT-Reporter-gen ist hier anstelle der NP-kodierenden Sequenz eingesetzt worden. Als schnellere positive Kontrolle für den Transfektionserfolg dient eine parallele Transfektion mit dem Konstrukt pHL2251, welcher das GFP-Reporter-gen enthält und die optimalen 1104-vRNA-Promotor-Mutationen aufweist.

Die Verpackung des Fremdsegmentes in die Viren-Nachkommenschaft wird durch die Infektion von MDCK-Zellen mit den nun rekombinanten Viren aus der Infektion der 293T-Zellen anhand der CAT-Aktivität detektiert. Durch weitere Passagen in MDCK-Zellen kann verfolgt werden, welcher Anteil der Viren das Fremdsegment jeweils verpackt und ab welcher Passage die Viren dieses zusätzliche Fremdsegment verlieren. Zur negativen Kontrolle (MOCK-Infektion) wird bei allen Versuchen eine Lipofectamin-Behandlung ohne DNA durchgeführt. Als positive Kontrolle wird das Plasmid pHL1844 transfiziert, dessen CAT-Aktivität als Referenz für die anderen Konstrukte als 100% gesetzt wird. Zur Berechnung der CAT-Aktivität wird das Wincam-Programm (Microsoft) verwendet. Die Berechnung basiert auf dem Anteil der CAT-Produkte im Vergleich zum Restsubstrat. Die vergleichende Analyse der CAT-Expression misst die Bildung der Reporter-gen-mRNA, die in Replikation bzw. Amplifikation und Transkription von der Promotorstruktur, aber auch z.B. von der Segmentlänge abhängig ist.

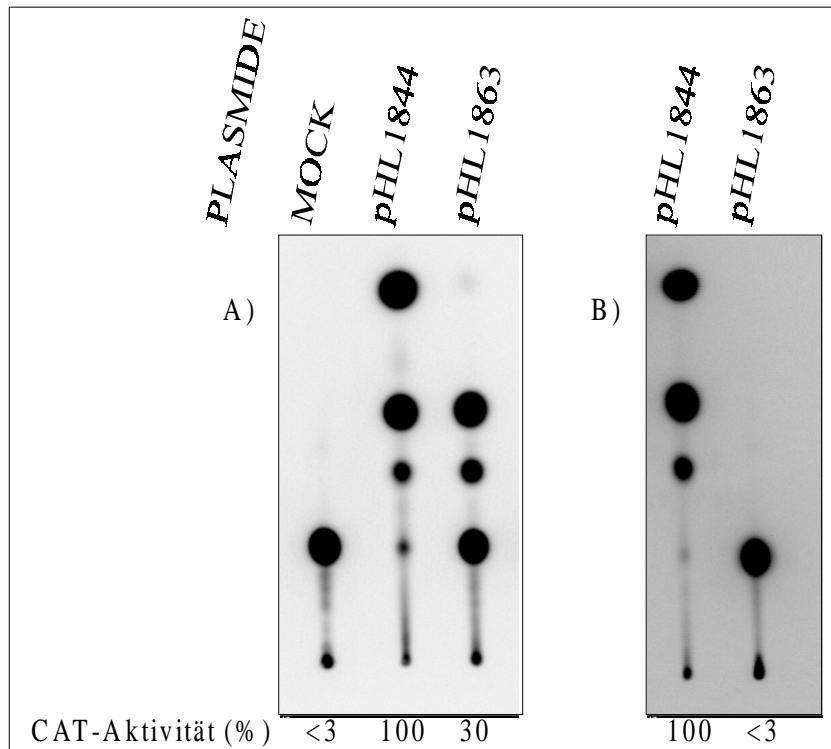


Abb. 3.1: CAT-Analysen des 1104- und des Wildtyp-vRNA-Promotors
Die CAT-Aktivität wird in % ausgedrückt.

A) CAT-Analyse der primär transfizierten 293T-Zellen 20 h nach Transfektion und 8 h nach Infektion.
 B) CAT-Analyse der Passage in MDCK-Zellen 8 h nach Infektion. In dieser Arbeit wird pHL1844 (1104-vRNA-Promotor) als positive Kontrolle bei allen *in vivo*-Versuchen verwendet. Im Vergleich zu dem Wildtyp läßt sich die starke CAT-Aktivität des pHL1844 auch nach der Passage nachweisen und eignet sich daher auch als positive Kontrolle für die Viruspassage in MDCK-Zellen. Die MOCK-Transfektion wird als negative Kontrolle verwendet. Das CAT-Segment mit mutierter Promotorstruktur wird damit ohne Selektionsdruck in die Tochterviren verpackt, das entsprechende Segment mit Wildtyp-Promotorsequenz geht sehr schnell verloren.

3.1.1 CAT-Expressionsrate des positiven Kontrollkonstruktes pHL1844

Eine CAT-Reaktion wird in der Regel mit der Hälfte des Volumens des Zellysates durchgeführt (2.5.1). Bei einer stark positiven CAT-Aktivität, wie sie bei pHL1844 auftritt, ist das Signal von Anfang an so hoch, dass die tatsächliche Steigerung der Expression nicht mehr registriert werden kann. Abbildung 3.2 zeigt die CAT-Expressionsanalyse des pHL1844-Konstruktes bis zur vierten Passage, einmal mit der Hälfte (50%) und einmal mit 5% des Zellysates.

5% der Zellysates zeigen noch eine recht hohe CAT-Expression, jedoch ist jetzt die Verfolgung der Expression möglich. Die CAT-Expression ist in den Zellen der zweiten Passage am höchsten, in der dritten Passage sinkt sie ab und verschwindet in der vierten. In der primären Infektion wird dieses CAT-Segment mit der 1104-Promotormutation ohne Selektionsdruck in die Tochterviren verpackt. Bei der Passage vermehren sich die Viren und damit auch diejenigen, die das CAT-Segment tragen, jedoch verlieren diese Viren das CAT-Segment bei weiteren Passagen, da es für Erhaltung der Viren nicht essentiell ist.

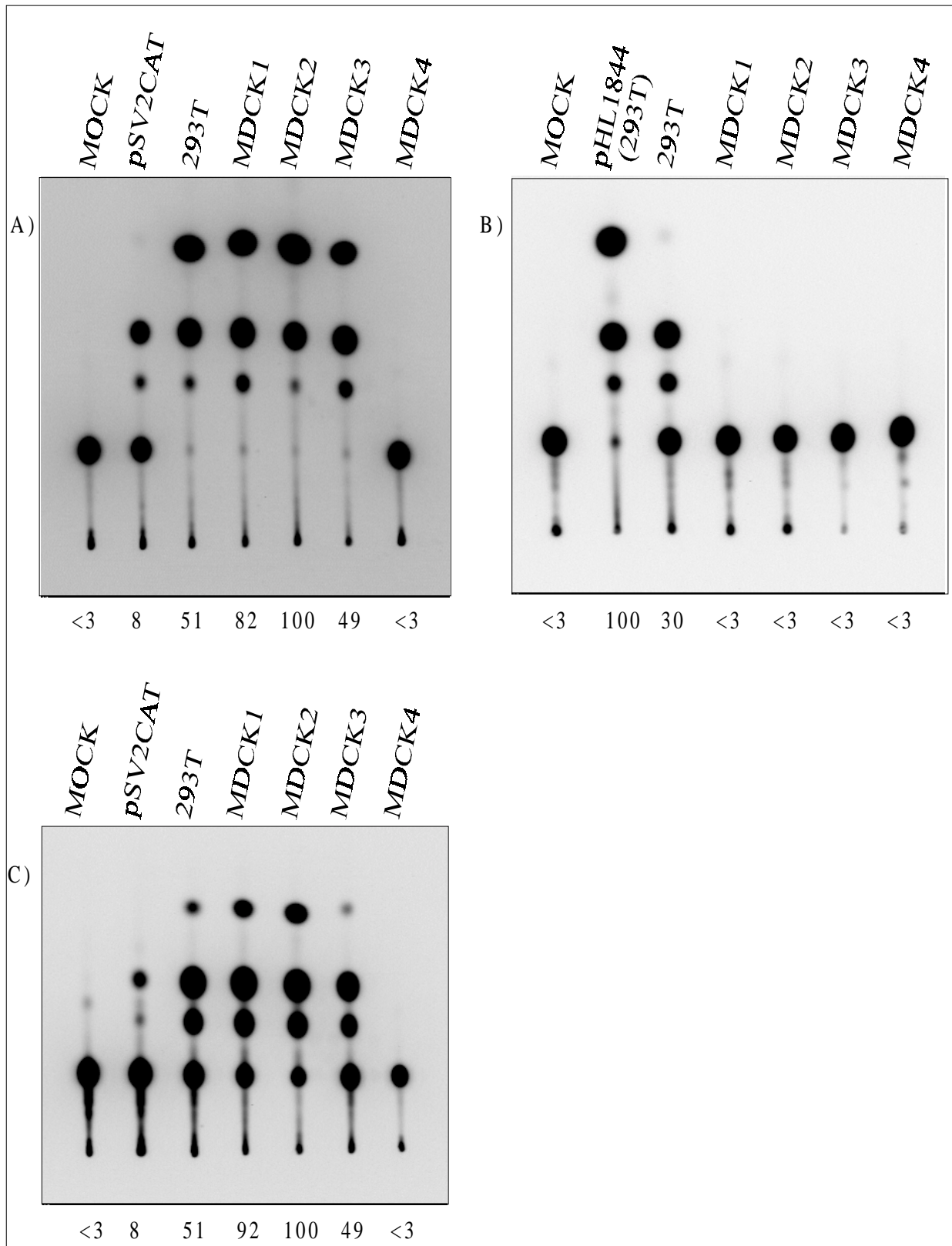


Abb. 3.2: CAT-Analyse der pHL1844- und pHL1863-Konstrukte von der primären DNA-Transfektion und Infektion bis zur vierten Passage der dabei gebildeten rekombinanten Viren. Die CAT-Expression (%) ist unter jeder Abbildung aufgeführt. pSV2CAT ist ein CAT-RNA-Polymerase II-Konstrukt, dessen CAT-Expression zum Vergleich nach der Transfektion in 293T-Zellen dargestellt ist. A) CAT-Analyse von pHL1844 mit 50% des Zelllysätüberstandes, C) mit 5% des Zelllysätüberstandes. B) CAT-Analyse von pHL1863 mit 50% des Zelllysätüberstandes.

3.2 Längenabhängigkeit der Inkorporation von rekombinanten vRNA-Molekülen in Influenza A-Viren

Das mit Hilfe des Polymerase I-Transkriptionssystems in das Influenza A-Virus eingebrachte Fremdgen wird exprimiert und zugleich in die Virus-Nachkommenschaft zusätzlich zu den acht viruseigenen Segmenten verpackt (Neumann *et al.*, 1994). Die Expressionsrate ist jedoch von der Länge des fremden vRNA-Moleküls abhängig. Das längste Segment (PB1) des Influenza A-Virus besteht aus 2341 Nukleotiden, während die eingesetzten Reportergene CAT (659 bp) und GFP (741 bp) kleiner sind als das kürzeste Segment (NS) mit 890 Nukleotiden. Bei der Suche nach dem längsten Fremdsegment, das noch von Influenza A-Viren transkribiert und verpackt werden kann, wird die kodierende Region des NP-Segmentes durch ein 3000 bp bzw. 4000 bp langes Fremdsegment ersetzt. Es besteht aus dem CAT-Reportergen, das am 3'-Ende mit weiteren, nicht translatierten Fremdsequenzen verlängert wird.

Die Expression des verlängerten Fremdgens wird in 293T-Zellen nach Transfektion und nach dreimaliger Passage in MDCK-Zellen anhand der CAT-Aktivität bestimmt. Die *in vivo*-Analyse wurde durch mindestens dreifache Wiederholung des Versuches bestätigt.

3.2.1 Verlängerung des kodierenden Segmentbereichs auf 3000 und 4000 Nukleotide

Als Ausgangsplasmid dient das pHL1844 (Hoffmann, 1997). Hier ist das CAT-Reportergen anstelle der NP-kodierenden Region inseriert worden. Das 3'-Ende des vRNA-Promotors ist mit den 1104-Promotor-Mutationen versehen. Durch den Einbau der E2-Sequenz (Zhou *et al.*, 1998) aus dem CSFV (*classical swine fever virus*) am 3'-Ende des CAT-Reportergens beträgt die Gesamtlänge des vRNA-Moleküls 3110 bp. Hierfür muss ein E2-Fragment zweimal nacheinander in eine *Bam*HI-Schnittstelle inseriert werden, woraus das Plasmidkonstrukt pHL2640 resultiert. Eine dritte Verlängerung mit der DNA-Sequenz aus dem GFP-Gen (ebenfalls am 3'-Ende) erhöht die Gesamtlänge des vRNA-Moleküls in pHL2651 auf 4027 bp (Abb. 3.3).

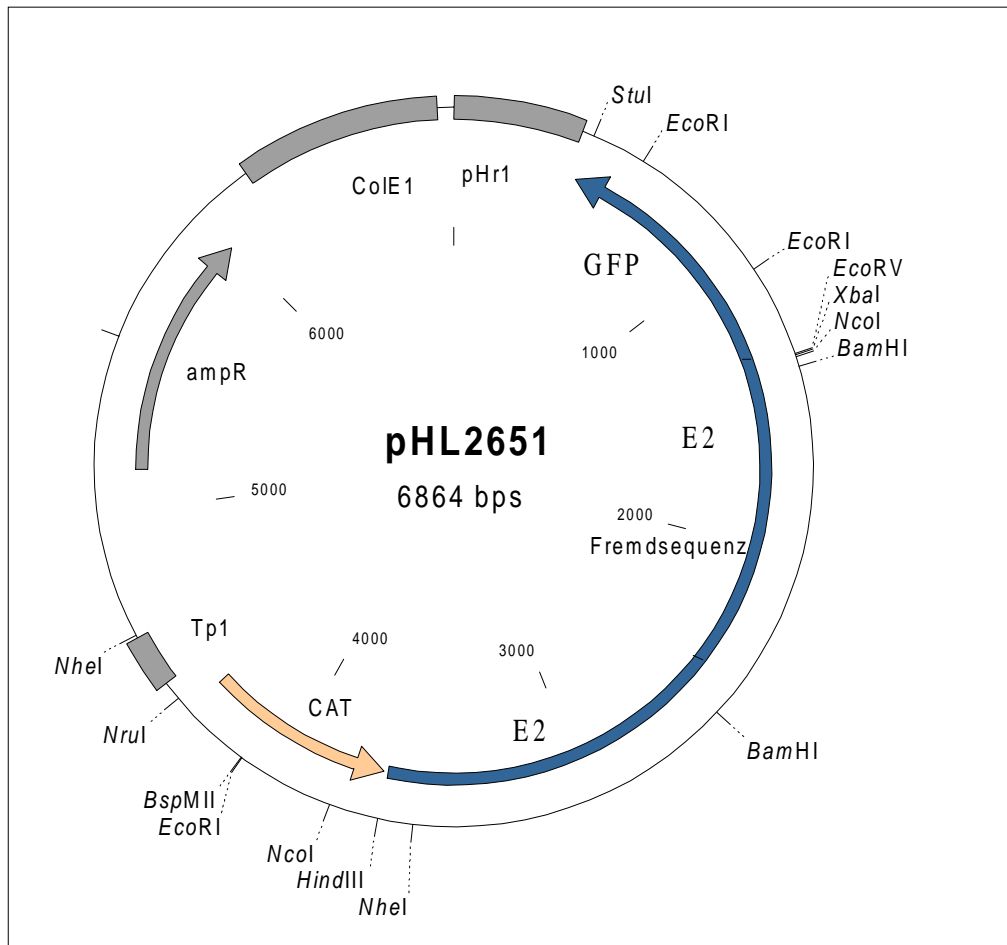


Abb. 3.3: Darstellung des pHL2651-Plasmids

Das vRNA-Molekül ist 4029 bp lang und besteht aus dem CAT-Reportergen und nicht translatierter Sequenz aus den Fremdgenen E2 und GFP. Mittels der CAT-Expression wird der Einfluss einer Verlängerung des vRNA-Moleküls auf die Transkription des Fremdgens detektiert.

Die *in vivo*-Analysen der verlängerten Konstrukte sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Nach der primären Infektion lassen sich nur schwache CAT-Signale in der 293T-Zelle nachweisen, d.h. die Länge des Segmentes beeinflusst seine Transkriptions- bzw. Replikationsrate. Die Passage des virushaltigen Zellkulturüberstandes in MDCK-Zellen liefert eine mittelstarke CAT-Expression. Das beweist, dass die verlängerten CAT-Segmente in die Virusnachkommen-schaft verpackt werden und dass die Verpackung wenig oder gar nicht von der Länge des Segmentes abhängig ist. Die zweite Passage in MDCK-Zellen zeigt, dass diese langen Fremdsegmente weiter repliziert und exprimiert werden und dies erst nach der dritten Passage abnimmt.

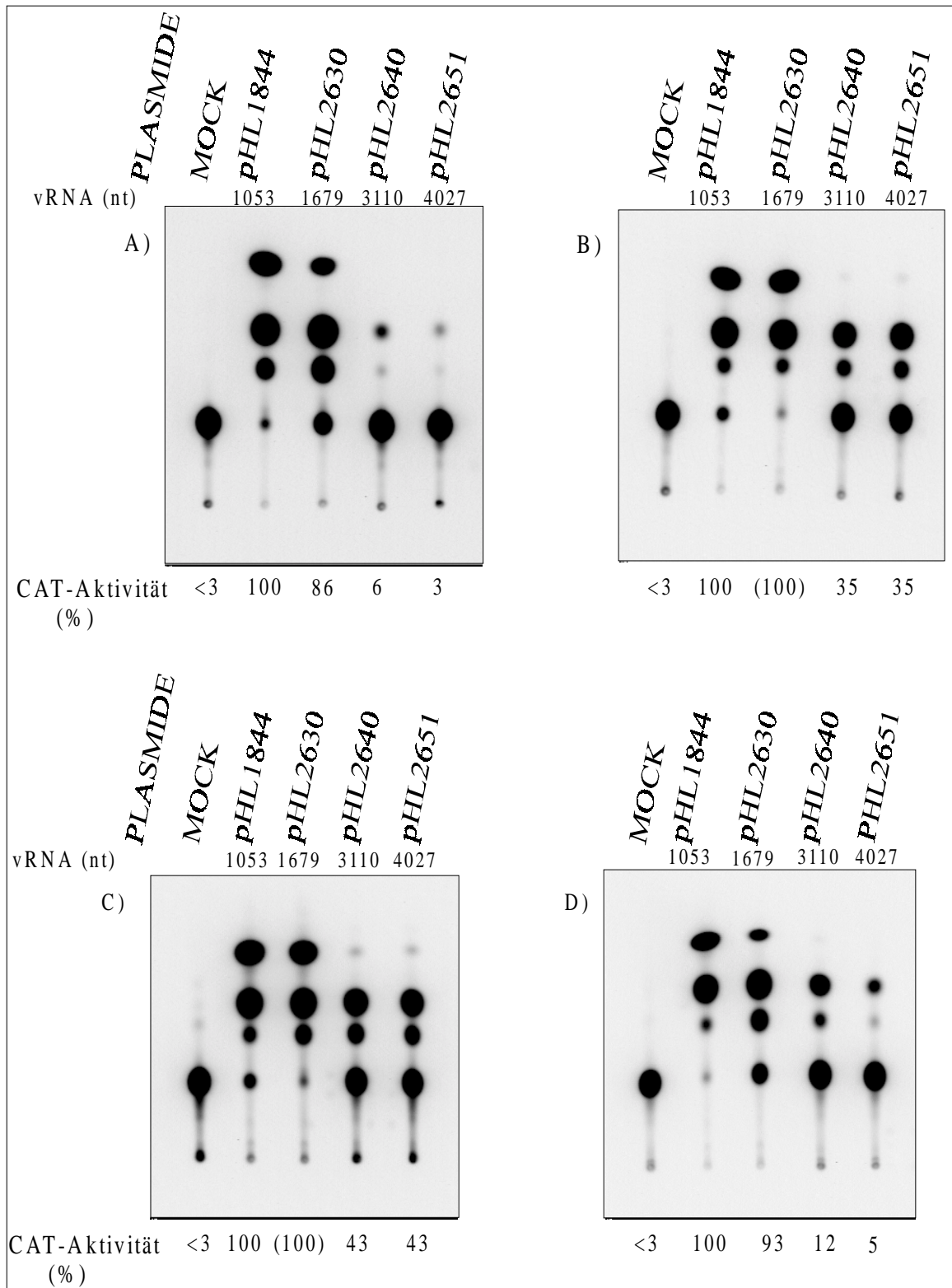


Abb. 3.4: CAT-Expression (%) von 3'-verlängerten vRNA-Segmenten

Die Größe der vRNA ist in nt (Anzahl der Nukleotide) angegeben. A) Analyse der primär transfizierten 293T-Zellen 20 h nach Transfektion und 8 h nach Infektion. B) Analyse der ersten Passage, C) der zweiten Passage und D) der dritten Passage in MDCK-Zellen jeweils 8 h nach Infektion mit dem Kulturüberstand der vorher infizierten Zellen. pHL1844 dient als Vergleichsbasis.

3.2.2 Einfluss der Polymerase-Untereinheiten und des NP-Proteins auf die Transkription der verlängerten Segmente

Erst nach der Infektion der Zellen mit dem FPV Helfer-Virus erfolgt während des Infektionszyklus, also zeitlich begrenzt, die Transkription und die Replikation des transfizierten Fremdsegmentes und die der Virussegmente durch die viralen RNA-Polymerase-Untereinheiten und das NP-Protein. Werden Expressionsplasmide für die Polymerase-Untereinheiten und das NP (transkribiert durch RNA-Polymerase II) zusammen mit dem zu testenden Konstrukt transfiziert, können Transkription und Replikation des Fremdsegmentes sofort beginnen und in längerem Verlauf in NP-Bindung akkumuliert werden, bevor die Zellen infiziert werden. Folglich werden insgesamt mehr Transkripte gebildet und dadurch auch mehr CAT-Protein exprimiert. Es handelt sich hierbei um die sogenannten Booster-Plasmide (Gautier *et al.*, 1989, freundlicherweise von Dr. S. Pleschka zur Verfügung gestellt). Hierfür sind die für die Polymerase-Untereinheiten und das NP kodierenden cDNAs in einen pHMG-Expressionsvektor distal von dem Promotor dieses Human-Gens eingebaut. Nach der Kotransfektion in die 293T-Zellen zusammen mit dem Testkonstrukt werden sie sofort transkribiert und die vier Proteine exprimiert. Sie erfüllen die Funktion der viralen RNA-Polymerase und des NP und amplifizieren und transkribieren die im Zellkern gebildete vRNA des kotransfizierten Fremdsegmentes. Für eine erfolgreiche Transfektion müssen die Booster-Plasmide im Verhältnis 1xPB1:-1xPB2:-1xPA:-2xNP eingesetzt werden. Die Gesamtmenge an transfizierter Plasmid-DNA (Booster-Plasmide und das zu testende Plasmid) ist unter 10 µg pro Ansatz zu halten. Abbildung 3.5 zeigt den Einfluss der Booster-Plasmide auf die Transkription des Fremdsegmentes. Ein Vergleich mit Abbildung 3.4 (Transfektion ohne Booster-Plasmide) zeigt anhand der CAT-Expression, dass sich die Transkription des Fremd-vRNA-Moleküls um den Faktor 4 bei pHL 2640 bzw. 7 bei pHL2651 erhöht hat. Angesichts der bereits in der primären Zelle erreichten Expressionsrate läßt sich im Gegensatz zu den Versuchen ohne Booster-Plasmide keine eindeutige Steigerung der Transkription nach der Passage der rekombinanten Viren nachweisen, die CAT-Aktivität klingt schon nach der ersten Passage ab. Als negative Kontrolle wird hier die Transfektion mit Booster-Plasmiden ohne Konstrukt durchgeführt.

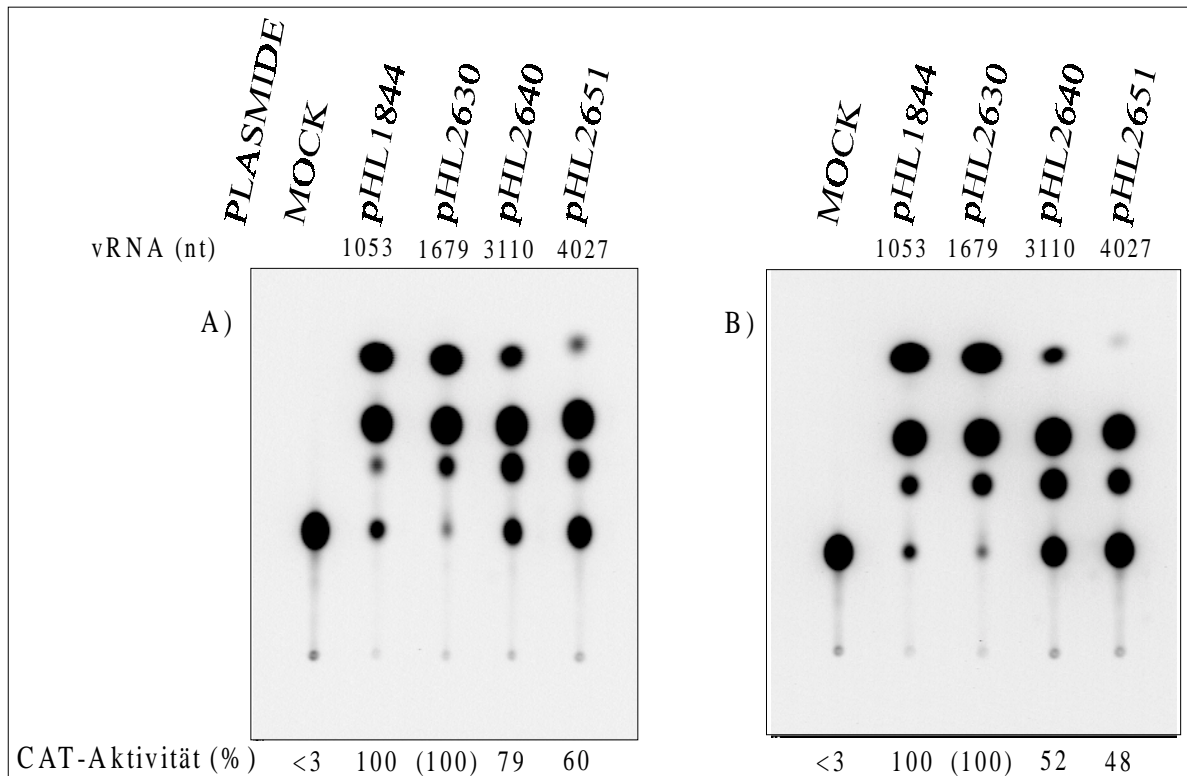


Abb. 3.5: CAT-Analyse der mit Booster-Plasmiden kotransfizierten Konstrukte

A) Analyse der primären Infektion in 293T-Zellen 20 h nach Transfektion (2,5 µg Plasmid-DNA und 5 µg Booster-Plasmid-DNA-Gemisch) und 8 h nach Infektion. B) Analyse der Passage in MDCK-Zellen 8 h nach Infektion.

Der alleinige Einfluss der Polymerase-Untereinheiten bzw. des NPs auf die Transkription und Replikation der viralen Segmente ist in unabhängigen Versuchen getestet worden (Abb. 3.6). Die CAT-Analyse der verlängerten Konstrukte nach der Kotransfektion mit den Polymerase-Untereinheiten oder mit dem NP sind mit der einfachen Transfektion des Konstruktes vergleichbar (Abb. 3.4). Das Ergebnis der CAT-Analyse zeigt, dass die Polymerase ohne NP bzw. NP ohne die Polymerase nicht in der Lage sind, die virale RNA zu transkribieren, beide sind erforderlich, um dies zu ermöglichen.

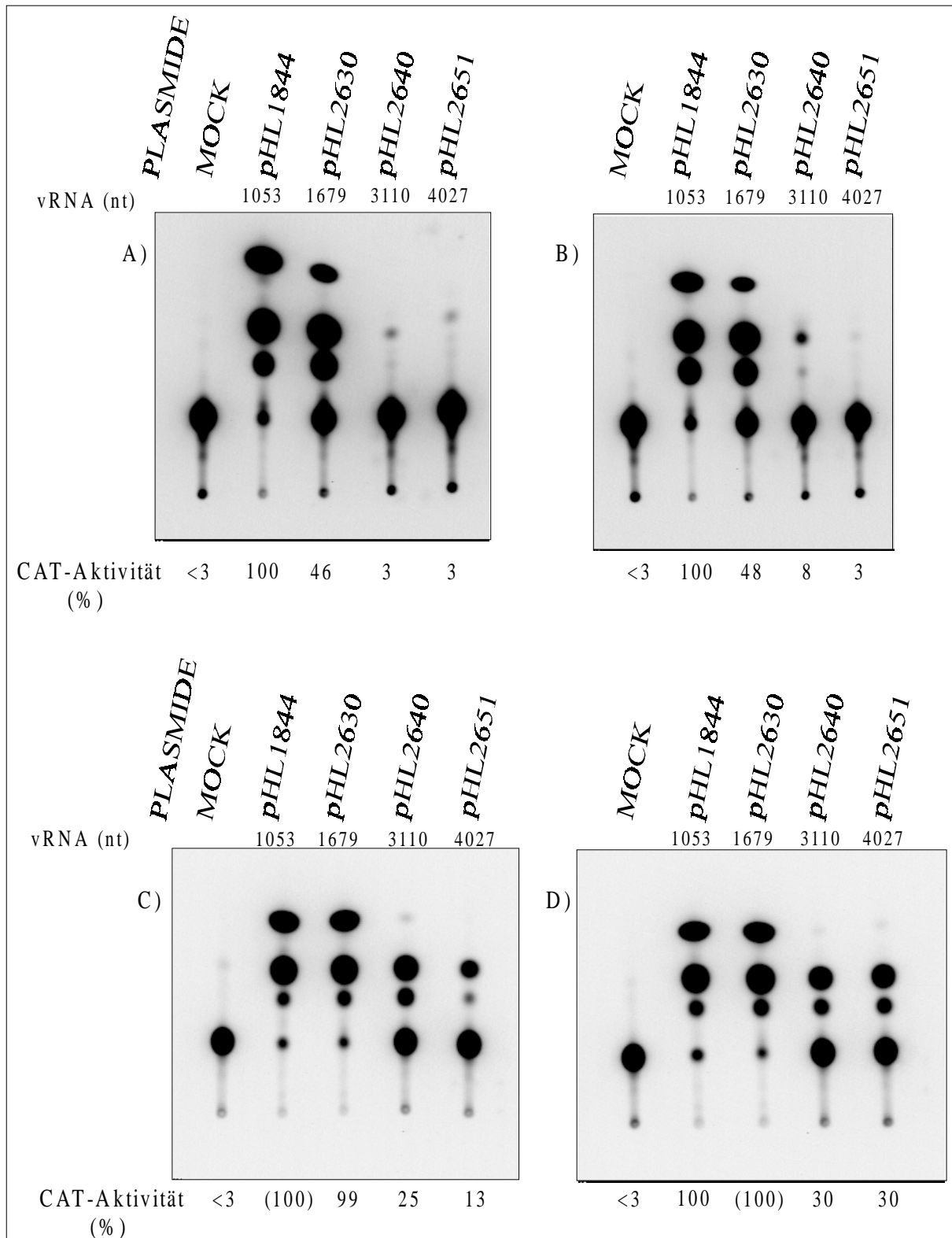


Abb. 3.6: CAT-Analyse der mit NP bzw. Polymerase-Untereinheiten kotransfizierten 3'-verlängerten Konstrukte

A) CAT-Analyse der mit NP kotransfizierten Konstrukte in den Zellen der primären Infektion, C) in den MDCK-Zellen der ersten Passage (jeweils 8 h nach Infektion). B) CAT-Analyse der mit den Polymerase-Untereinheiten kotransfizierten Konstrukte in den Zellen der primären Infektion, D) in den MDCK-Zellen der ersten Passage (jeweils 8 h nach Infektion).

3.2.3 Versuche zur Optimierung des 3'-verlängerten vRNA-Fremdsegmentes

Um die Transkription der verlängerten Fremdsegmente weiter zu verbessern, werden im Plasmid pHL2640 gezielte Sequenz-Optimierungen durchgeführt.

Durch den Einbau des Genfragments pSV40 (*simian virus 40*)-ori vor dem murinen Terminator soll die Expression der verlängerten Segmente verbessert werden. Es handelt sich dabei um ein Genfragment mit einer Länge von 325 Nukleotiden. Die 293T-Zellen exprimieren das T-Antigen, ein Protein des Simian-Virus 40, durch dessen Bindung an das pSV40-ori-Segment dieser aktiviert wird und die Replikation des Plasmids fördert (Borowiec *et al.*, 1990; Gruda & Alwine, 1991; Strayer, 1996). Für die Konstruktion von pHL2641 wird pHL2640 mit *Bam*HI (partiell)-*Eco*RI gespalten und in pHL2630 (*Bam*HI-*Eco*RI-Vektor) einkloniert (Abb. 3.7).

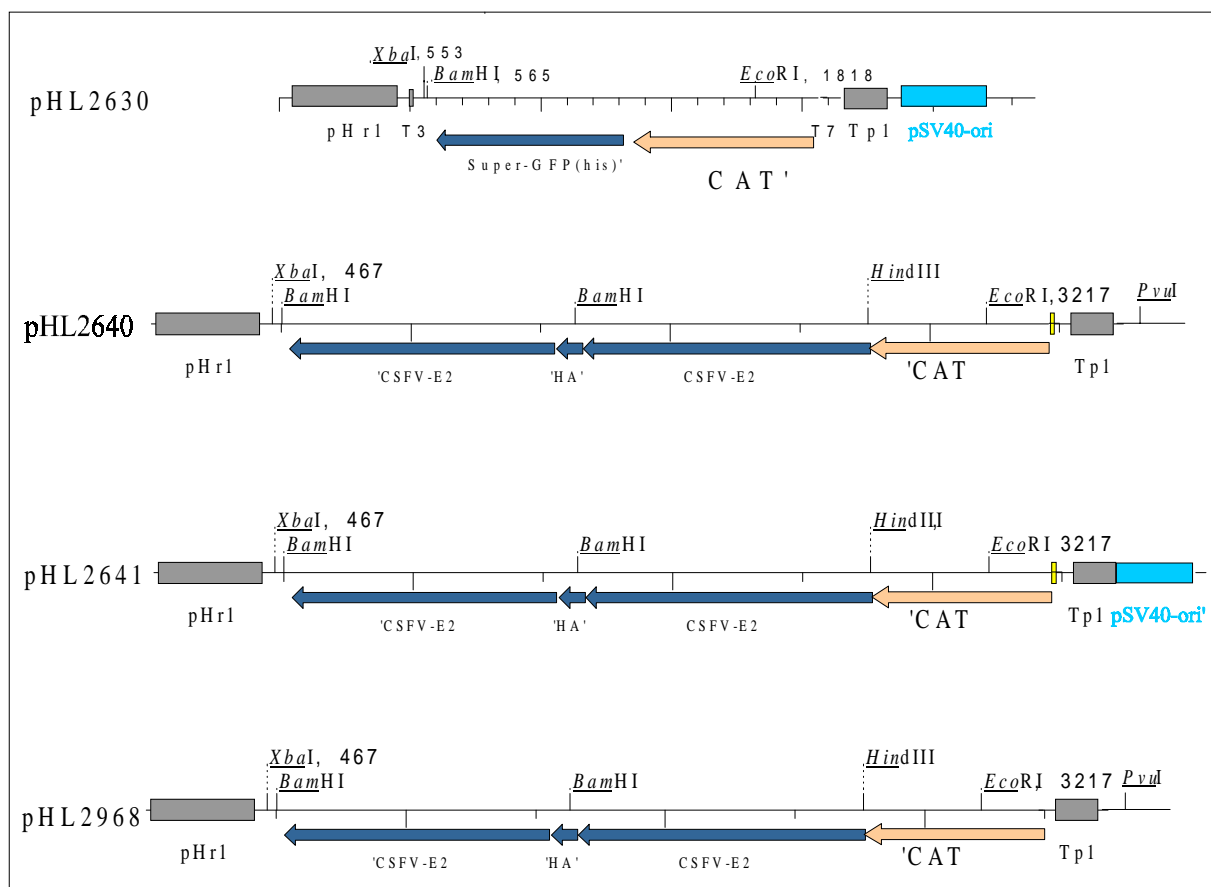


Abb. 3.7: Schematische Darstellung von 3'-verlängerten und davon abgeleiteten Konstrukten

Bei pHL2641 wurde die pSV40-ori-Sequenz eingeführt, während bei pHL2668 die durch Klonierungen entstandenen Sequenzen entfernt wurden.

Eine weitere Optimierung der verlängerten Segmente kann durch die Reduktion der viralen Endsequenzen erfolgen, wobei solche Sequenzen, die erst bei den Klonierungsschritten entstanden sind, entfernt werden. Diese überflüssigen, virusfremden Nukleotide befinden sich zwischen der hochkonservierten Region am 3'-Ende der viralen RNA. Hierfür wird pHL2640 *EcoRI-PvuI* gespalten und das analoge Segment aus pHL1844 inkloniert.

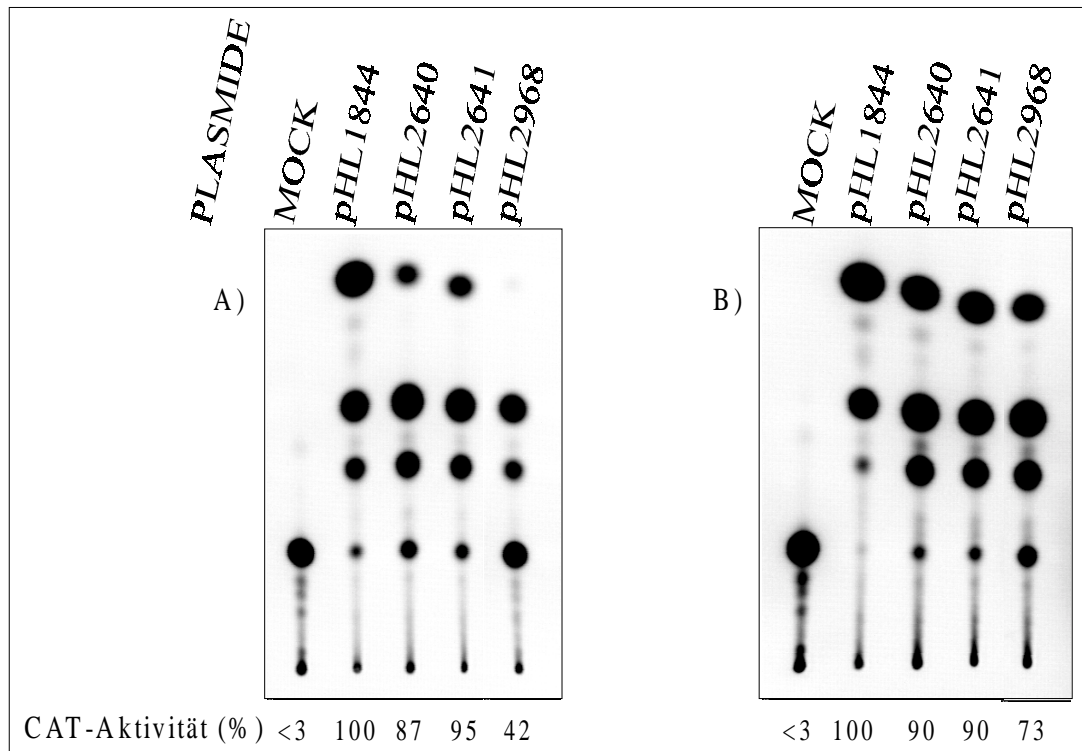


Abb. 3.8: CAT-Analyse der optimierten Verlängerungskonstrukte, abgeleitet von pHL2640
 pHL2641 enthält das SV40-ori-Fragment, in pHL2968 sind die überflüssigen Nukleotide eliminiert worden. A) CAT-Analyse der primär transfizierten 293T-Zellen, B) CAT-Analyse nach Passage in MDCK-Zellen.

Abbildung 3.8 zeigt den Einfluss der Optimierungen auf die CAT-Expression des auf 3000 bp verlängerten Konstruktes. Der Einbau des SV40-ori-Genfragments führt bei pHL2641 zu einer geringfügigen Verstärkung des CAT-Signals, während das Entfernen der überflüssigen Nukleotide bei pHL2968 sogar zu einer Verminderung der CAT-Expression führt. Die CAT-Expression ist allgemein stärker als in den Abbildungen 3.3-3.5, bedingt durch die Verwendung von Lipofektamin Plus-Reagens bei der Transfektion.

3.2.4 Inkorporation langkettiger fremder vRNA-Moleküle am Beispiel des β -Galaktosidase-Gens aus *E.coli*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Fremdsegmente bis zu einer Größe von 4000 Nucleotiden von der viralen RNA-Polymerase transkribiert und repliziert bzw. in die Tochterviren verpackt werden, sollte es auch möglich sein, das Reporter-gen β -Galaktosidase (3083 Nucleotide) in diesem System einzusetzen. Das β -Galaktosidase-Gen wird mit *NcoI/PstI* aus pHK732 ausgeschnitten und in ein Polymerase I-Konstrukt inkloniert. Das neue Plasmid pHL2620 zeigt nach Transfektion, Infektion und anschließender spezifischer Nachweisreaktion (siehe 2.5.3) für die β -Galaktosidase-Aktivität in 293T-Zellen eine positive Färbung. Dies ist eine gute Bestätigung dafür, dass nicht nur die CAT-kodierende Sequenz der ca. 3000 bzw. 4000 nt-Segmente von der viralen RNA-Polymerase transkribiert und repliziert wird, sondern ihre Gesamtlänge. Allerdings lässt sich nach dem Passieren des virushaltigen Überstandes in MDCK- und in 293T-Zellen keine Farbreaktion mehr beobachten. Auch eine Optimierung des Polymerase I- β -Gal-Gens durch Entfernen überflüssiger Nucleotide bzw. dessen Einklonierung in das Konstrukt pHL1844 anstelle des CAT-Reportergens verbesserte das Ergebnis nicht. Eine Detektion des β -Gal-Reportergens nach der Passage ist nicht gelungen.

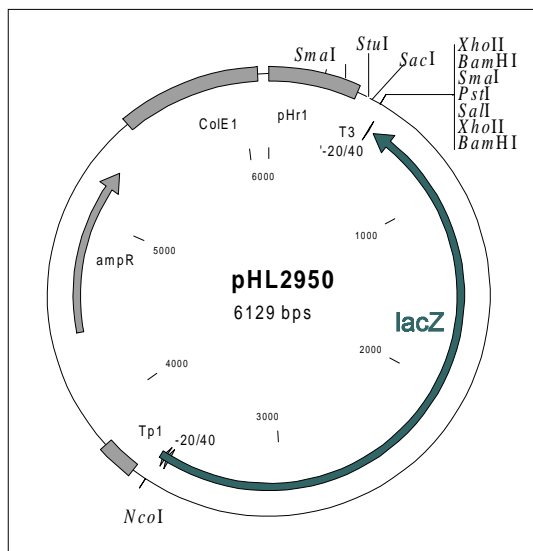


Abb. 3.9: Das LacZ-Konstrukt pHL2950

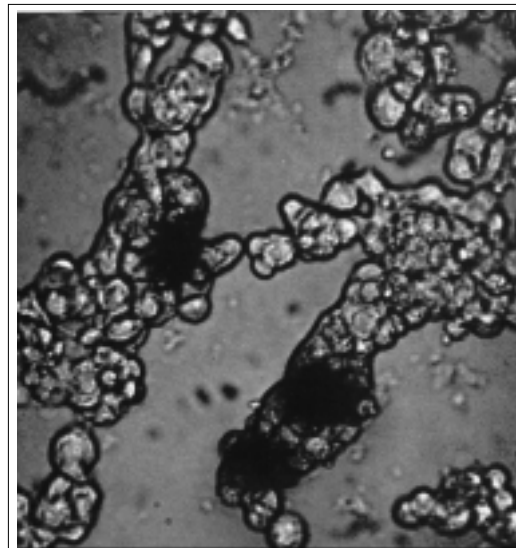


Abb. 3.10: Nachweis der β -Galaktosidase-Expression

Aufnahme bei 32x-Vergrößerung 12 h nach der Färbung mit β -Gal-Färbelösung 20 h nach Transfektion und 8 h nach Infektion in 293T-Zellen.

3.3 Mutationsanalyse des cRNA-Promotors

3.3.1 Einführung

Die aktive Struktur des cRNA-Promotors wurde bis jetzt selten beschrieben. Dennoch muss der cRNA-Promotor ebenfalls, wie der vRNA-Promotor, eine aktive Struktur aufweisen, die von der viralen RNA-Polymerase gegenüber allen anderen RNA-Molekülen diskriminiert und in Bindungs-Interaktion erkannt werden kann. Ohne diese spezifische Bindung wäre es nicht möglich, die vRNA über cRNA zu replizieren, die einzige bisher bekannte Funktion der cRNA (Abbildung 3.11). Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die cRNA nur als Zwischenprodukt für die Replikation der vRNA dient oder vielleicht selbst als Transkriptionsmatrize für die Synthese einer „antisense“-mRNA fungieren kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente über den cRNA-Promotor sollen die wenigen Kenntnisse über die cRNA und den cRNA-Promotor verbessern und bereichern.

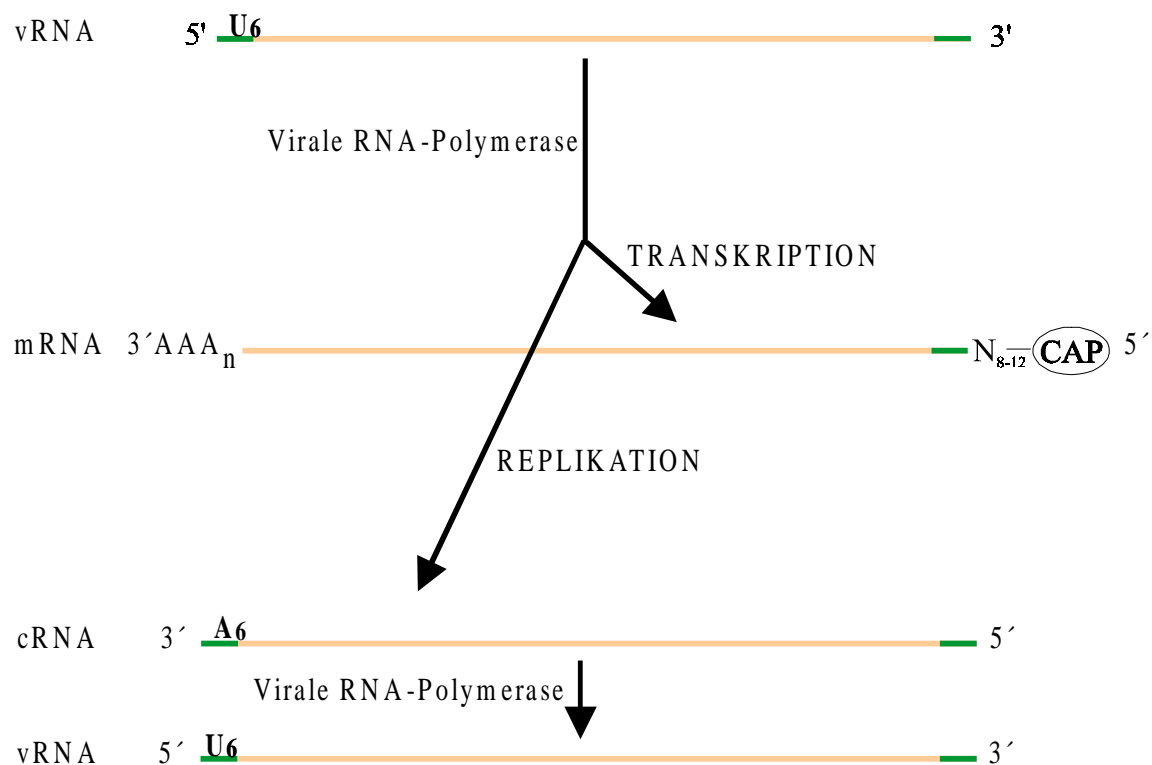


Abb. 3.11: Transkription und Replikation der Influenza A-vRNA

Die grüne Markierung stellt die hochkonservierte 3'- und 5'-Promotorregion eines Influenza A-Segmentes dar.

Aus vRNA-Promotoranalysen sind ausreichend Kenntnisse zu dessen aktiver Struktur vorhanden, auf die hier bei der Untersuchung des cRNA-Promotors zurückgegriffen wird (Flick *et al.*, 1996; Flick und Hobom, 1999a). Zur Expression in dem RNA-Polymerase I-Transkriptionssystem werden cRNA-Konstrukte hergestellt, die anstelle des vRNA-Promotors eine cRNA-Promotorsequenz aufweisen. Als Reportergen wird ebenfalls das CAT-Gen eingesetzt.

Um die Expressionsanalyse des cRNA-Promotors zu ermöglichen, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Erstens muß das CAT-Reportergen in umgekehrter Orientierung, „antisense“ zu den cRNA-Flanken eingesetzt werden, und zweitens müssen 5-6 Uridinreste am 5'-Ende des cRNA-Promotors (Position 16-21) in Transkriptionsrichtung eingeführt werden, um die Polyadenylierung der nachzuweisenden mRNA zu ermöglichen. Für das Erzielen eines hohen Expressionsniveaus werden analog zu der „Promotor-up“-Mutante mit drei Nukleotidaustauschen am 3'-Ende der vRNA, hier am 5'-Ende der cRNA in pHL2583 drei Nukleotide (C 3→U, A 5→G, G 8→A) im Vergleich zum cRNA-Wildtyp-Promotor pHL2708 verändert.

Für die Klonierung einer cRNA mit den genannten Voraussetzungen wird das Grundkonstrukt pHH21 (Hoffmann, 1997) eingesetzt. pHH21 besitzt die Polymerase I-Transkriptionseinheit mit dem humanen rDNA-Promotor und dem murinen Terminator, getrennt von zwei dazwischen liegenden *Bsm*BI-Erkennungssequenzen. *Bsm*BI ist ein Typ IIs-Restriktionsenzym und wird, da es außerhalb seiner Erkennungssequenz spaltet, auch als „Ausleger“-Restriktionsenzym bezeichnet:



Durch diese Spaltung für das anschließende Einklonieren von cDNA-Konstrukten in das RNA-Polymerase I-Transkriptionssystem werden unerwünschte Sequenzen, die bei Verwendung anderer Restriktionsenzyme an den 5'- und 3'-RNA-Enden entstehen würden, vermieden. Die *Bsm*BI-Doppelspaltung ermöglicht die gleichzeitige Klonierung der 3'- und 5'-Promotorsequenzen des Influenza A-Virus. Ein weiterer Vorteil der *Bsm*BI-Doppelspaltung liegt darin, dass die entstandenen Enden nicht komplementär zueinander sind und damit die Wahrscheinlichkeit einer Vektor-Ligation niedrig bleibt. Eine weitere Möglichkeit, eine Vektor-Ligation bei der Klonierung mit pHH21 zu verhindern, ist die nachträgliche Spaltung mit *Kpn*I, dessen Schnittstelle zwischen den 2 *Bsm*BI-Erkennungssequenzen liegt. Zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide mit den

gewünschten cRNA-Promotorsequenzen werden so ausgewählt, dass deren Enden nach der Hybridisierung terminal die *Bsm*BI-Schnittsequenzen aufweisen, und somit in einen mit *Bsm*BI geschnittenen Vektor inkloniert werden können. Die Oligonukleotide 1104 oder Mx[#] werden in den pHH21-Vektor inkloniert. Diese Oligonukleotide besitzen erneut zwei interne *Bsm*BI-Schnittstellen, die jetzt die 3'- von der 5'-Promotorsequenz trennen. Hier wird in gleicher Weise, jedoch Sequenz-varierend, ein weiteres Doppelstrang-Oligonukleotid inkloniert, die PcRNA-Kassette. Sie trägt die restlichen distalen Nukleotide der jeweils gewählten 3'- und 5'- cRNA-Promotorsequenzen gefolgt von *Xba*I- und *Nde*I-Schnittstellen. Durch eine *Xba*I-*Nde*I-Doppelspaltung wird schließlich das CAT-Reportergen im letzten Schritt in Antisense-Orientierung inseriert. Die nachträgliche Verbindung zweier Mutationen in den 3'- und 5'-Promotorenden kann durch den Austausch der *Ban*II-*Eco*RI-Spaltungsprodukte beider Konstrukte erreicht werden.

[#] siehe II (Oligonukleotide-Index, S. 3)

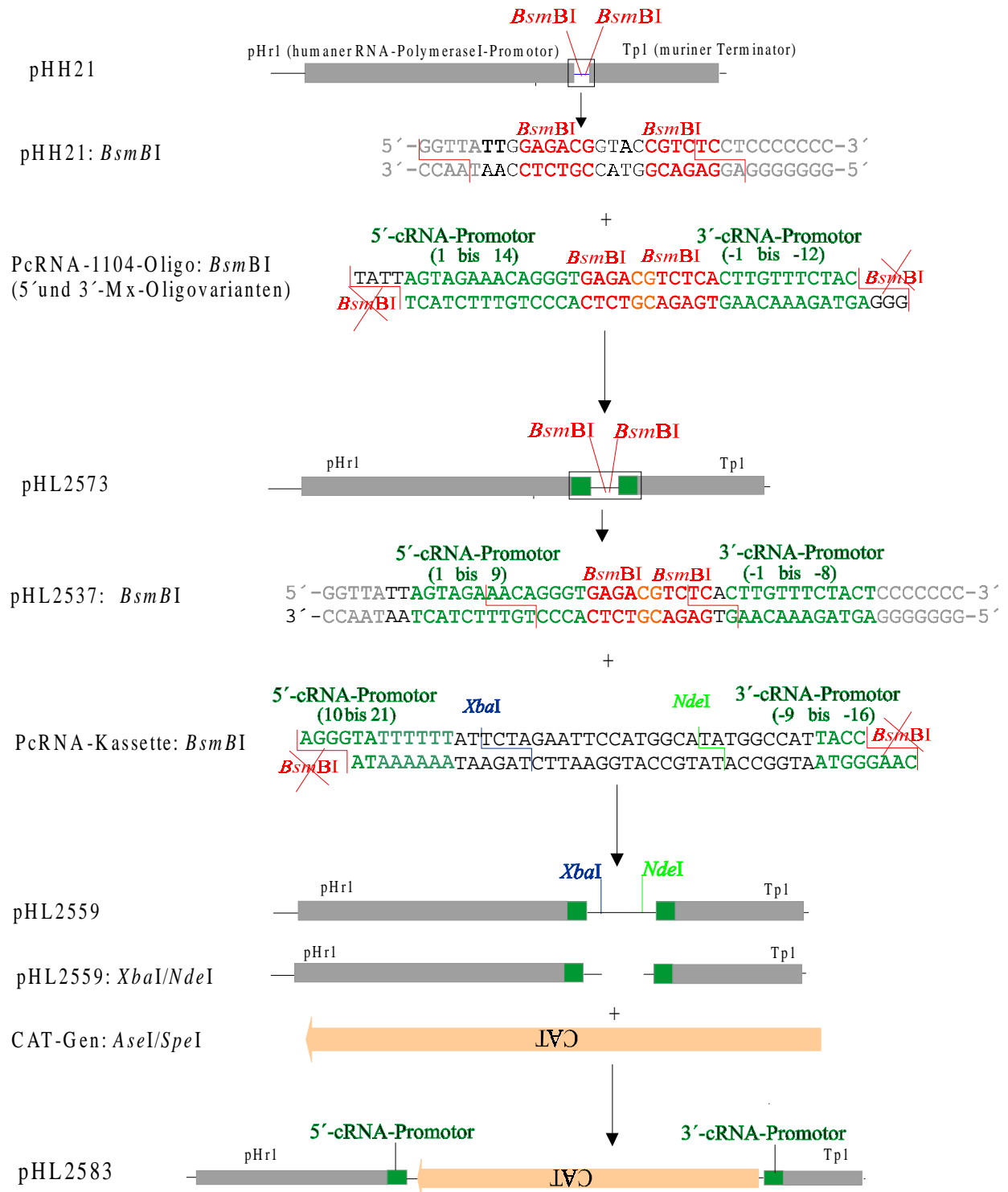


Abb. 3.12: Klonierungsschema der cRNA-Promotorvarianten für die *in vivo*-Analyse mit Hilfe des Polymerase I-Transkriptionssystems. Mittels einer *BsmBI*-Spaltung (rot) in pHH21 wird ein Oligonukleotid mit komplementären Einzelstrang-Enden (1104-oligo), das die cRNA-Promotorsequenzen aufweist (grün), eingeführt. Das Oligonukleotid kann mit den gewünschten Promotormutationen (5'- oder 3'-Mx-Oligo) ausgewählt werden. Weiterhin weist das 1104- bzw. Mx-Oligonukleotid 2 *BsmBI*-Schnittstellen auf, die nun gespalten werden, um die PcRNA-Kassette einzuführen. Die PcRNA-Kassette enthält die restliche Sequenz des distalen cRNA-Promotorbereichs (6 Uridinreste am 5'- und die letzten 4 Nukleotide am 3'-Ende). Die PcRNA-Kassette verfügt außerdem über eine *XbaI*- und eine *NdeI*-Schnittstelle, mit deren Hilfe im letzten Schritt das CAT-Reportergen in negativer Orientierung eingefügt werden kann.

Das Ausgangskonstrukt pHH21 und das 1104-analoge cRNA-Konstrukt pHL2583 sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

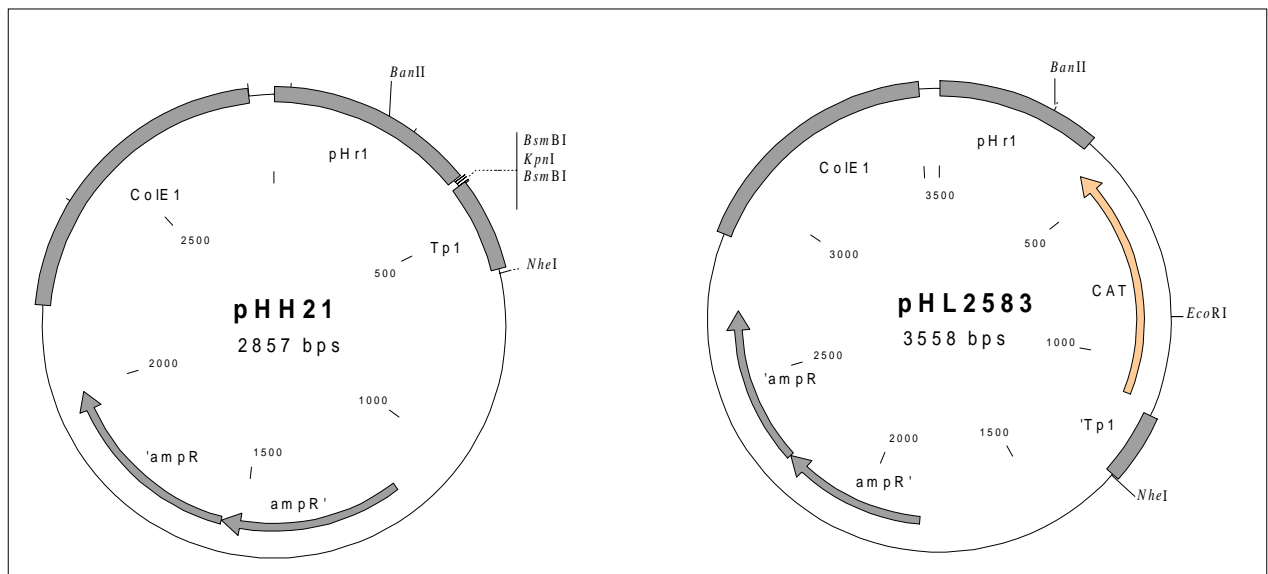


Abb. 3.13: Die Plasmide pHH21- und pHL2583

Über die zwei *BsmBI*-Schnittstellen in pHH21 werden die gewünschten Promotorsequenzen in den pHH21-Vektor eingeführt. Das CAT-Reportergen wird im letzten Schritt mittels *XbaI-NdeI*-Schnittstellen, die in der PcRNA-Kassette enthalten sind, inseriert. Es entsteht pHL2583.

Die resultierenden cRNA-Konstrukte werden in 293T-Zellen transfiziert, nach 26 h infiziert und für weitere 12 h inkubiert. Bei der Passage werden MDCK-Zellen mit 1 ml virushaltigem Kulturüberstand infiziert und für weitere 10 h infiziert. Abbildung 3.14 zeigt, dass pHL2583 eine CAT-Aktivität entwickelt, die durch die Passage verstärkt wird.

Anhand der CAT-Analyse kann der Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Aktivität des cRNA-Promotors detektiert werden. Für weitere Versuche werden pHL2583 (1104-analoger cRNA-Promotor) und pHL1844 (1104-vRNA-Promotor) als positive Referenzen verwendet. Der cRNA-Wildtyp-Promotor (5': C3, A5, und G8) wurde ebenfalls kloniert und getestet. pHL2708 (Abb. 3.12) zeigt bezüglich der CAT-Expression ein ähnliches Verhalten wie der vRNA-Wildtyp-Promotor (Abb. 3.1). Alle Ergebnisse wurden durch mindestens dreimalige Wiederholungsversuche bestätigt.

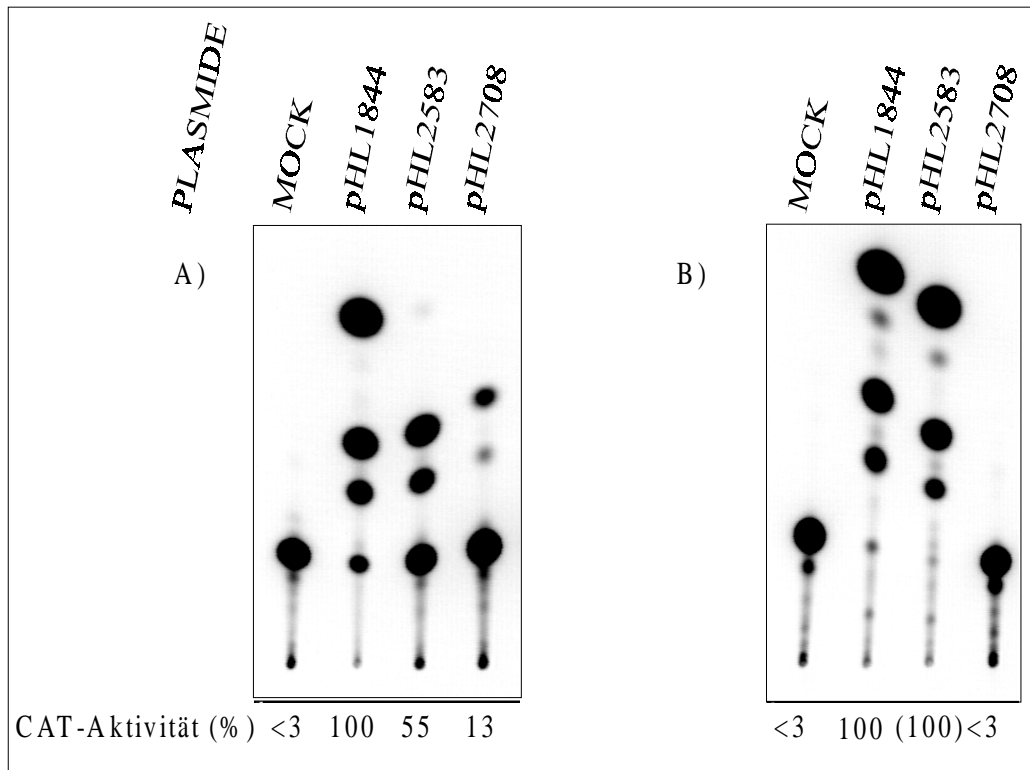


Abb. 3.14: CAT-Analyse des cRNA-Wildtyp-Promotors pHL2708 (5': C3, A5 und G8) und des cRNA-1104-Promotors pHL2583 (5': U3, G5 und A8)

A) CAT-Analyse der primär transfizierten 293T-Zellen, 26 h nach Transfektion und 12 h nach Infektion. B) CAT-Analyse der Passage in MDCK-Zellen, 10 h nach Infektion.

Während die CAT-Aktivität des 1104-analogen cRNA-Promotors (pHL2583) in der Passage steigt, ist bei dem Wildtyp-Promotor eine CAT-Expression nicht mehr nachweisbar.

Sowohl bei dem Konstrukt des 1104-analogen cRNA-Promotors als auch des Wildtyp-Promotors läßt sich eine CAT-Aktivität nach der primären Infektion in 293T-Zellen nachweisen. In den passagierten Zellen läßt sich nur bei dem 1104-analogen cRNA-Promotor-Konstrukt eine CAT-Expression nachweisen. Durch den Selektionsdruck wird das schwach replizierte Wildtyp-Segment mit niedriger Wahrscheinlichkeit in die Tochterviren verpackt. Im Gegensatz dazu wird das cRNA-Segment mit den 1104-analogen Mutationen stark repliziert, so dass im Zellkern so viele Transkripte dieses Segmentes vorliegen, die später als cRNPs ohne Selektionsdruck in die Tochterviren verpackt werden.

3.3.2 Expressionsanalyse des 1104-analogen cRNA-Promotors

Analog zur vRNA-kontrollierten Expression von pHL1844 wird hier die Stärke der CAT-Expression des cRNA-Konstruktes mit den pHL1104-analogen Promotormutationen detektiert. Das Konstrukt pHL2583 wird in 293T-Zellen transfiziert und mit FPV-Helfervirus infiziert, der virushaltige Zellkulturüberstand wird in MDCK-Zellen passagiert. Die CAT-Expression in 50% und 5% des Volumens der Zelllysatsüberstände bis zur dritten Passage ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

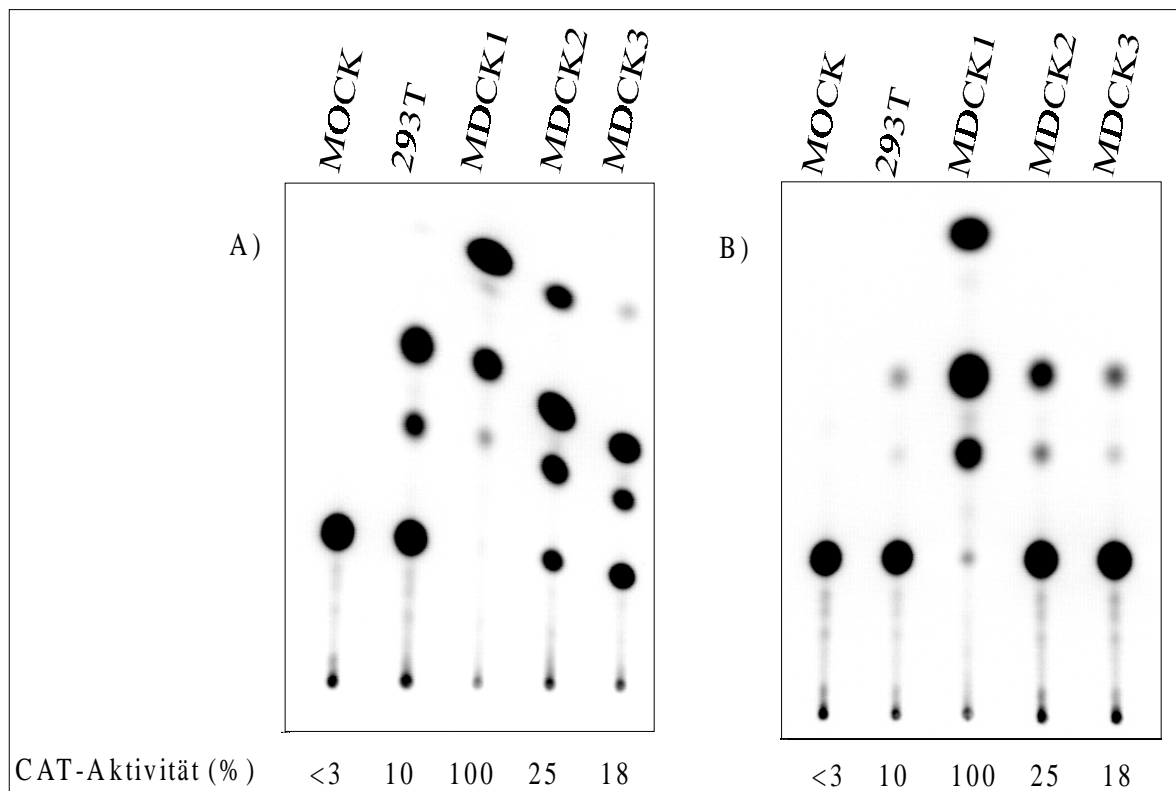


Abb. 3.15: CAT-Analyse des cRNA-Konstruktes pHL2583 von der primären Infektion bis zur dritten Passage

CAT-Analyse A) mit 50% des Zelllysatsüberstandes, B) mit 5% des Zelllysatsüberstandes. Die CAT-Aktivität wurde nach Abbildung B berechnet.

Die CAT-Expression ist bei pHL2583 nach der primären Infektion schwächer als bei pHL1844 (Abb. 3.1, 3.2), in der ersten Passage steigt die CAT-Expression sehr stark an und sinkt ab der zweiten Passage ab. Ebenfalls wie das pHL1844-Konstrukt wird das 1104-analoge cRNA-Segment ohne Selektionsdruck in die Tochterviren verpackt. Im Laufe der weiteren Passagen verlieren die Viren das für sie unessentielle CAT-Segment, was zur Abnahme der CAT-Aktivität führt.

3.3.3 Analyse des proximalen cRNA-Promotorabschnittes

In der „corkscrew“-Konformation des vRNA-Promotors wurde bewiesen, dass die Basenpaarungen innerhalb der 3'- und der 5'- proximalen Nukleotidsequenz für die Bindung der viralen RNA-Polymerase eine entscheidende Rolle spielen (Flick *et al.*, 1996). Aus diesem Grund werden diese Nukleotide auch auf der cRNA-Promotorebene untersucht. Falls die Ergebnisse denen des vRNA-Promotors entsprechen, bildet der aktive cRNA-Promotor ebenfalls eine „corkscrew“-Konformation aus.

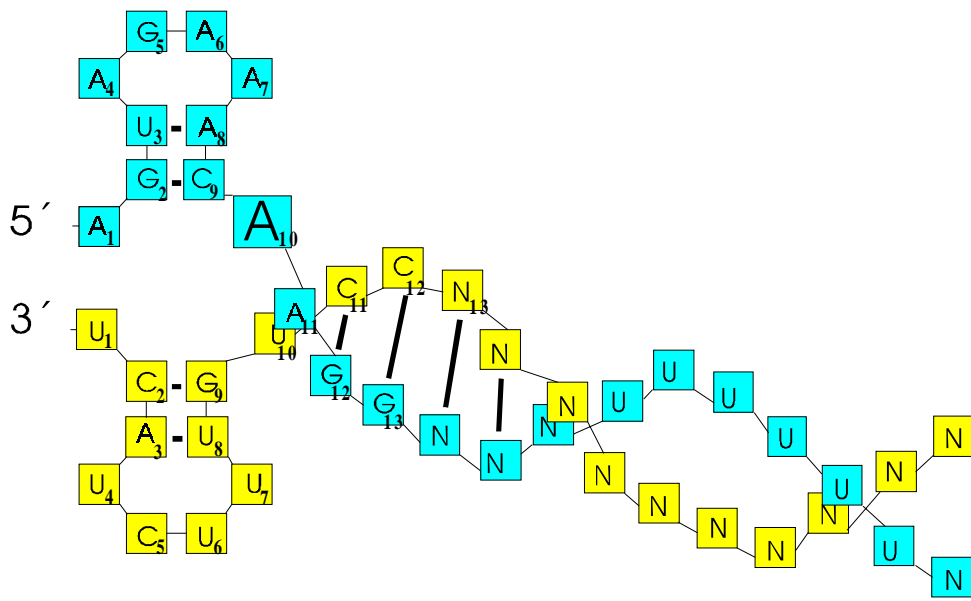


Abb. 3.16: Die „corkscrew“-Konformation des vRNA-Promotors der Influenza A-Viren (Flick *et al.*, 1996)

Die dargestellte Promotorsequenz zeigt die 1104-Mutationen ($G \bar{3} \rightarrow A \bar{3}$; $U \bar{5} \rightarrow C \bar{5}$ und $C \bar{8} \rightarrow U \bar{8}$). Der proximale Bereich (Nukleotid 1-9) innerhalb jedes Stranges bildet die „corkscrew“-Schleifen aus. Das überzählige Nukleotid A10 am 5'-Strang bildet mit dem distalen Bereich einen Winkel nach unten. Die für die Polyadenylierung der viralen mRNA notwendigen Uridinreste befinden sich an den Positionen 17-22.

Die Studien über den vRNA-Promotor durch eine fortschreitende gezielte Mutagenese im gesamten Promotorbereich haben gezeigt, dass nach Aufhebung der Basenpaarung zwischen den Nukleotiden 3 und 8 durch Nukleotidsubstitution in einem der beiden Stränge die Bindung der viralen RNA-Polymerase an den vRNA-Promotor nicht mehr möglich ist. Dies führt zu einer inaktivierten Promotorstruktur, also kein CAT-Signal. Nach Aufhebung der Strang-internen Basenpaarung kann die „corkscrew“-Konformation nicht mehr ausgebildet

werden, und der Promotor verliert damit diese aktive Struktur. Deswegen ist es sinnvoll, gerade diese Nukleotide auch bei dem cRNA-Promotor zu untersuchen.

Gemeinsam mit den Basenpaarungen zwischen 3 und 8 bzw. $\bar{3}$ und $\bar{8}$ ermöglichen die Basenpaarungen zwischen den Nukleotiden 2 und 9 bzw. $\bar{2}$ und $\bar{9}$ zusammen mit den in beiden Strängen ungepaarten Nukleotiden die Schleifenbildung an den 3'- und 5'-Enden (Abbildung 3.16). Das Nukleotid A10 am 5'-Ende ist in charakteristischer Weise überzählig und wird als Winkelnukleotid bezeichnet, die folgenden distalen Nukleotide beider Stränge bilden einen Doppelstrang aus, der wegen des ungepaarten A10 nach unten abgewinkelt ist.

Die cRNA-Promotorsequenz ist der des vRNA-Promotors komplementär. Die aktive Struktur des cRNA-Promotors ist daher als Arbeits-Hypothese ebenfalls in der „corkscrew“-Konformation dargestellt, die wegen des in der cRNA in die 3'-Sequenz verlagerten U 10-Winkelnukleotids nach oben abgewinkelt ist.

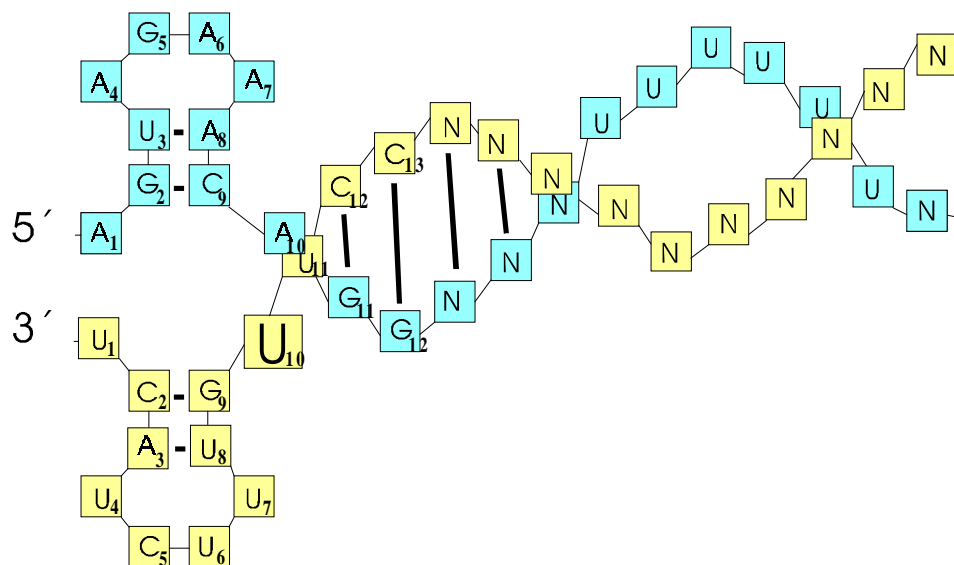


Abb. 3.17: Die „corkscrew“-Darstellung des cRNA-Promotors der Influenza A-Viren.

Die dargestellte cRNA-Promotorsequenz zeigt die zu 1104-analogen Mutationen am 5'-Ende (C 3→U, A 5→G, G 8→A) und die zusätzlich eingefügten 6 Uridinreste am 5'-Ende der cRNA (Position 16-21), die für die Polyadenylierung der möglicherweise in einem cRNA-Transkriptionsvorgang gebildeten viralen mRNA notwendig sind. Das U $\bar{10}$ am 3'-Ende ist überzählig (komplementär zu dem A10 des vRNA-Promotors) und bildet dadurch in dem cRNA-Promotor einen Winkel „nach oben“.

3.3.3.1 Einzelsubstitutionen und nicht kompensierende Doppelsubstitutionen innerhalb des proximalen cRNA-Promotors

Durch Einzelnukleotidaustausch und nicht kompensierende Doppelsubstitutionen an den Positionen 3 und 8 am 5'-Ende und $\bar{3}$ und $\bar{8}$ am 3'-Ende wird die Basenpaarung zwischen diesen Nucleotiden aufgehoben. Der Einfluß solcher Mutationen auf die cRNA-Promotoraktivität läßt sich anhand der CAT-Expression erkennen. Hierfür sind die U 3-A 8 Basen am 5'-Ende und die A $\bar{3}$ -U $\bar{8}$ Basen am 3'-Ende einzeln oder doppelt mit anderen Basen ausgetauscht worden.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.19 und 3.20 aufgeführt, beide stammen aus der gleichen Versuchsreihe. Sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende führen die Substitution einzelner Nucleotide im allgemeinen zur Abnahme der CAT-Aktivität. Diejenigen Konstrukte, die nach der primären Infektion keine CAT-Aktivität zeigen, bleiben auch nach der Passage negativ.

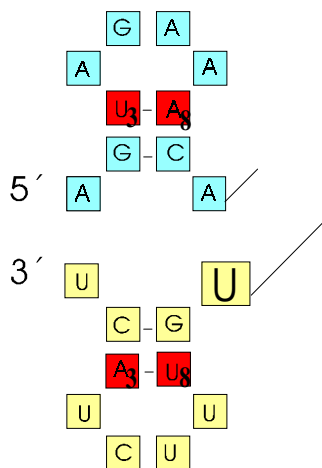


Abb. 3.18: Der proximale cRNA-Promotorabschnitt in der postulierten corkscrew-Sekundärstruktur.

■ Stellt die untersuchten Nucleotide an Position 3 und 8 in beiden Strängen dar.

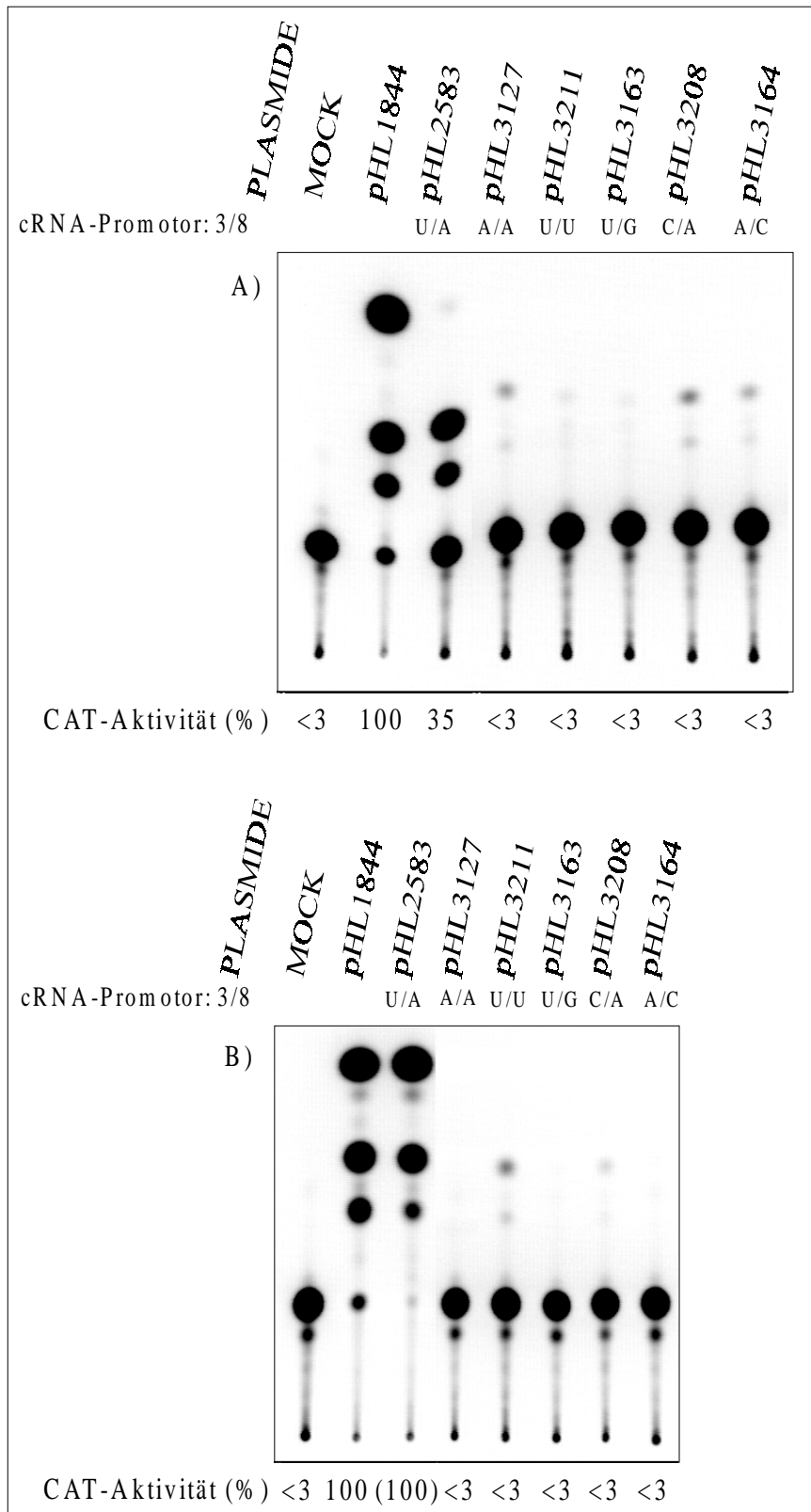


Abb. 3.19: CAT-Analyse der cRNA-Promotorvarianten mit Einzel- und nicht kompensierenden Doppelsubstitutionen in den Positionen 3 und 8 am 5'-Ende

pHL1844 (1104-vRNA-Promotor) dient als positive Kontrolle für das Experiment, pHL2583 (1104-analoger cRNA-Promotor) dient als positive Kontrolle für die Analyse der cRNA-Promotorvarianten.

A) CAT-Analyse der primär transfizierten Zellen 26 h nach Transfektion und 12 h nach Infektion.

B) CAT-Analyse der MDCK-Zellen 10 h nach Infektion mit dem Virusüberstand der 293T-Zellen.

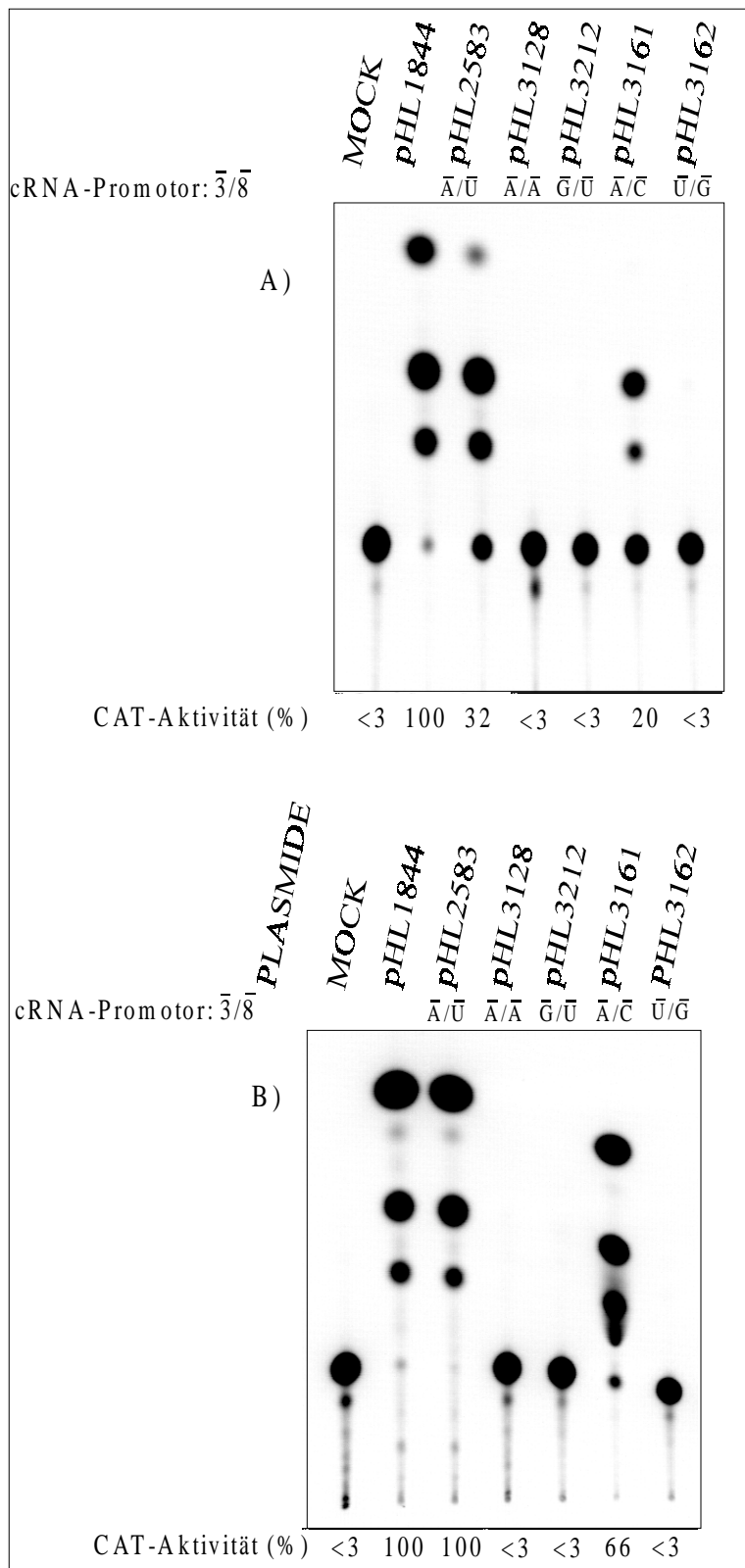


Abb. 3.20: CAT-Analyse der cRNA-Promotorvarianten mit Einzel- und nicht kompensierende Doppelsubstitutionen an den Positionen 3 und 8 am 3'-Ende.

pHL1844 (1104-vRNA-Promotor) dient als positive Kontrolle für das Experiment, pHL2583 (1104-analoger cRNA-Promotor) dient als positive Kontrolle für die cRNA-Promotorvarianten.

A) CAT-Analyse der primär transfizierten Zellen 26 h nach Transfektion und 12 h nach Infektion.

B) CAT-Analyse der MDCK-Passage 10 h nach Infektion mit dem Virusüberstand der 293T-Zellen.

Die Aufhebung der Basenpaarung ist offenbar mit einer Änderung der Sekundärstruktur des cRNA-Promotors verbunden. Es ist anzunehmen, dass die virale RNA-Polymerase aufgrund dieser Strukturänderung nicht mehr an den cRNA-Promotor binden und folglich auch nicht transkribieren kann. Das Konstrukt pHL3161 zeigt nach primärer Infektion 30% und nach der Passage 66% der CAT-Aktivität der positiven Kontrolle. In diesem Konstrukt ist die Base U₈ durch C₈ ersetzt (A-U→A-C). Bei der Replikation dieses Segmentes (Abb. 3.21) entstehen in der komplementären vRNA die Nukleotide U•G. Zwischen diesen Basen ist eine schwache Basenpaarung möglich, die zusammen mit der Basenpaarung zwischen C₂ und G₉ ausreichend ist, um die Struktur zu erhalten und damit die Bindung der viralen RNA-Polymerase zu ermöglichen. Es kommt zur Transkription. Dagegen führt bei pHL2308 die gleiche Mutation im 5'-Strang zu keiner CAT-Aktivität. Dies könnte bedeuten, dass hier die Interaktion mit der viralen RNA-Polymerase, einschließlich die der Einzelstrangnukleotide 4-7, nicht ausreicht, um die aktive Struktur des cRNA-Promotors zu bilden.

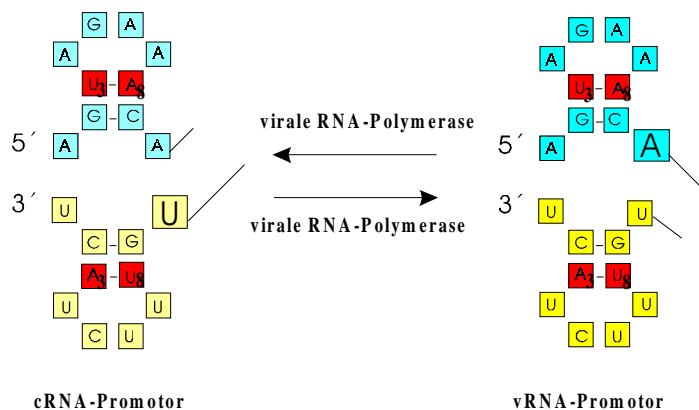


Abb. 3.21: Darstellung der proximalen v- und cRNA-Promotorabschnitte in der „corkscrew“-Konformation. Die vRNA wird über die cRNA repliziert und ebenso die cRNA über vRNA (Tchatalbachev, pers. Mitteilung).

Auf dieser Basis war hier zu vermuten, dass die schwache Basenpaarung G•U in den cRNA-Konstrukten pHL3163 am 5'-Ende und pHL3212 am 3'-Ende des cRNA-Promotors ebenfalls eine CAT-Aktivität aufweisen könnte, was nicht der Fall ist. Vergleicht man die CAT-Aktivität des vRNA-Promotors (positive Kontrolle pHL1844) mit der des cRNA-Promotors (pHL2583), läßt sich erkennen, dass die Affinität der viralen RNA-Polymerase zum cRNA-Promotor wahrscheinlich schwächer ist als zum vRNA-Promotor. D.h. eine schwächere Basenpaarung im Promotor eines cRNA-Segmentes reicht im Vergleich zum vRNA-Promotor nicht aus, um die CAT-Expression zu gewährleisten.

Diese Ergebnisse sind erste Indizien dafür, dass die aktive Struktur des cRNA-Promotors ähnliche Eigenschaften wie die des vRNA-Promotors besitzt, auch wenn die Aktivität des cRNA-Promotors im allgemeinen niedriger ist als die des vRNA-Promotors.

Im 5'-Strang des cRNA-Promotors führt jeder Austausch im Basenpaar an Position 3 und 8 bei der primären Infektion zur Verminderung bzw. zum vollständigen Verschwinden der CAT-Expression. Nach der Passage lässt sich kein CAT-Signal mehr detektieren. Möglicherweise lässt sich die aktive Struktur des 5'-cRNA-Promotorstranges auf dieser Art und Weise nicht detektieren und reagiert deswegen empfindlich auf die Nukleotidaustausche.

3.3.3.2 Kompensierende Doppelsubstitutionen innerhalb des proximalen cRNA-Promotors

Durch kompensierende Doppelaustausche (U/A, A/U, G/C, C/G) an den Positionen 3 und 8 in beiden Strängen soll sowohl die Rolle der Basenspezifität, als auch die Rolle der Basenpaarung des cRNA-Promotors für die Erkennung durch die virale RNA-Polymerase getestet werden.

Führt die Doppelsubstitution des U₃/A₈-Paares am 5'-Promotorende bzw. des A₃/U₈-Paares am 3'-Promotorende mit anderen Basenpaaren zu einer vergleichbaren CAT-Aktivität, so bedeutet dies, dass die Basenpaarung an den Positionen 3 und 8 essentiell für die spezifische Strukturbildung ist, unabhängig davon, um welches Nukleotidpaar es sich handelt. Führt diese Doppelsubstitution zu einer Verminderung oder zu keiner CAT-Aktivität, so kann dies bedeuten, dass eine Basenspezifität in der Wechselwirkung mit der viralen RNA-Polymerase vorliegt. Die virale RNA-Polymerase würde dann für ihre vollständige Funktion nicht nur die aktive Sekundär- bzw. Tertiär-Struktur des cRNA-Promotors erkennen, sondern auch die chemischen Valenzen einzelner dort vorhandener Basen. Alternativ dazu kann die innere Stabilität der Bindungsstruktur auch durch einen Basenpaaraustausch so gelöst sein (eines von zwei Basenpaaren), dass die Polymerase-Bindung nicht mehr in einer aktiven Weise möglich ist.

In den Abbildungen 3.22 und 3.23 sind CAT-Analysen der kompensierenden Substitutionen an den Positionen 3 und 8 in beiden Strängen aufgeführt. Die Daten stammen ebenfalls aus der gleichen Versuchsreihe wie in den Abbildungen 3.19 und 3.20.

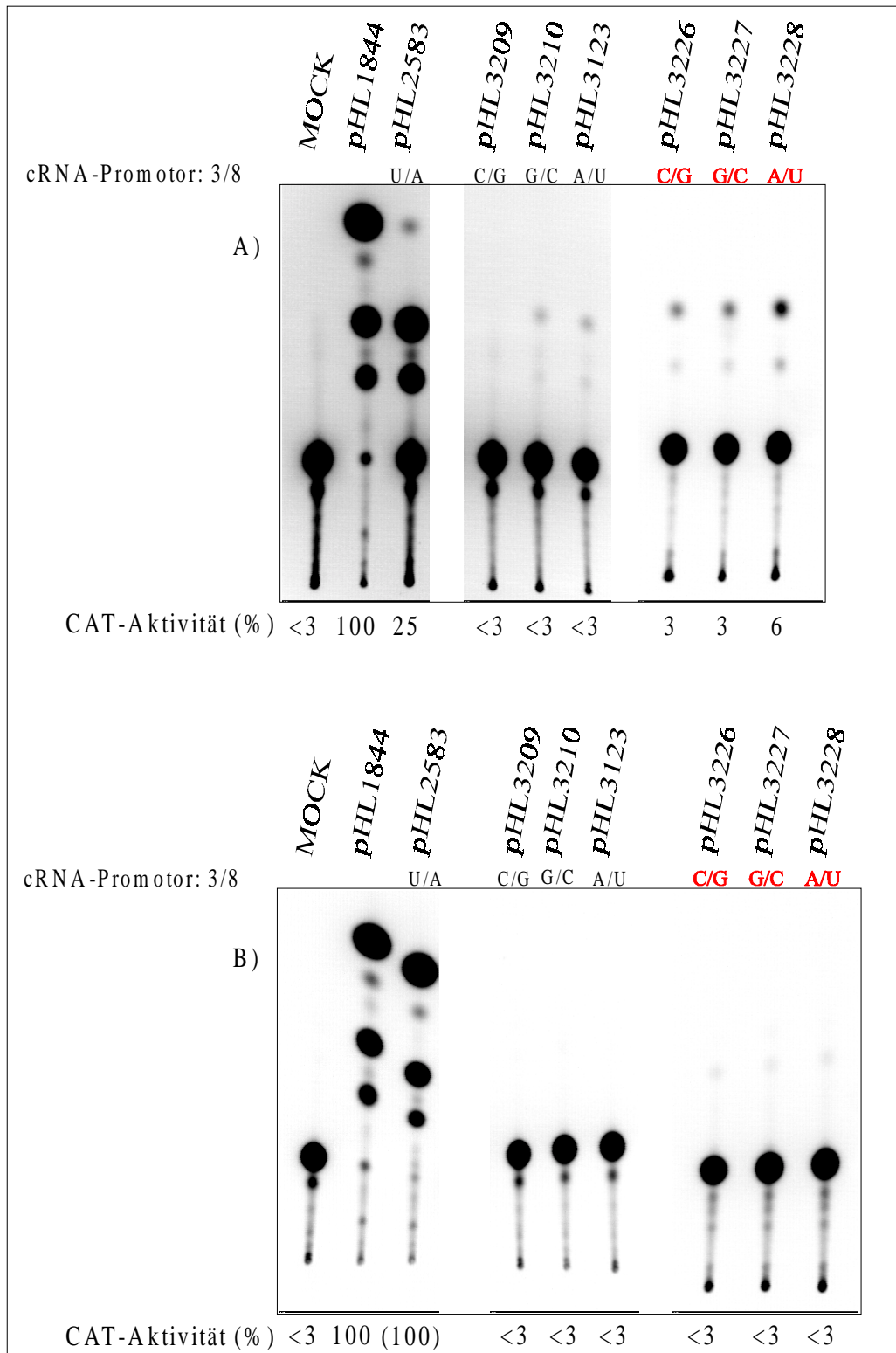


Abb. 3.22: CAT-Analyse der kompensierenden Doppelsubstitutionen an den Positionen 3 und 8 des 5'-cRNA-Promotorstranges. A) CAT-Analyse der primär infizierten 293T-Zellen. B) CAT-Analyse der Passage in MDCK-Zellen. Bei der *in vivo*-Analyse handelt es sich um die gleiche Versuchsserie wie bei den in Abbildung 3.19 dargestellten Ergebnissen, die aber auf verschiedene TLC-Platten aufgetragen werden mussten. Bei den **rot** markierten Nukleotiden soll darauf hingewiesen werden, dass zugleich weitere Mutationen am 3'-Ende vorgenommen wurden (A $\bar{3}$ -U $\bar{8}$ \rightarrow U $\bar{3}$ -A $\bar{8}$).

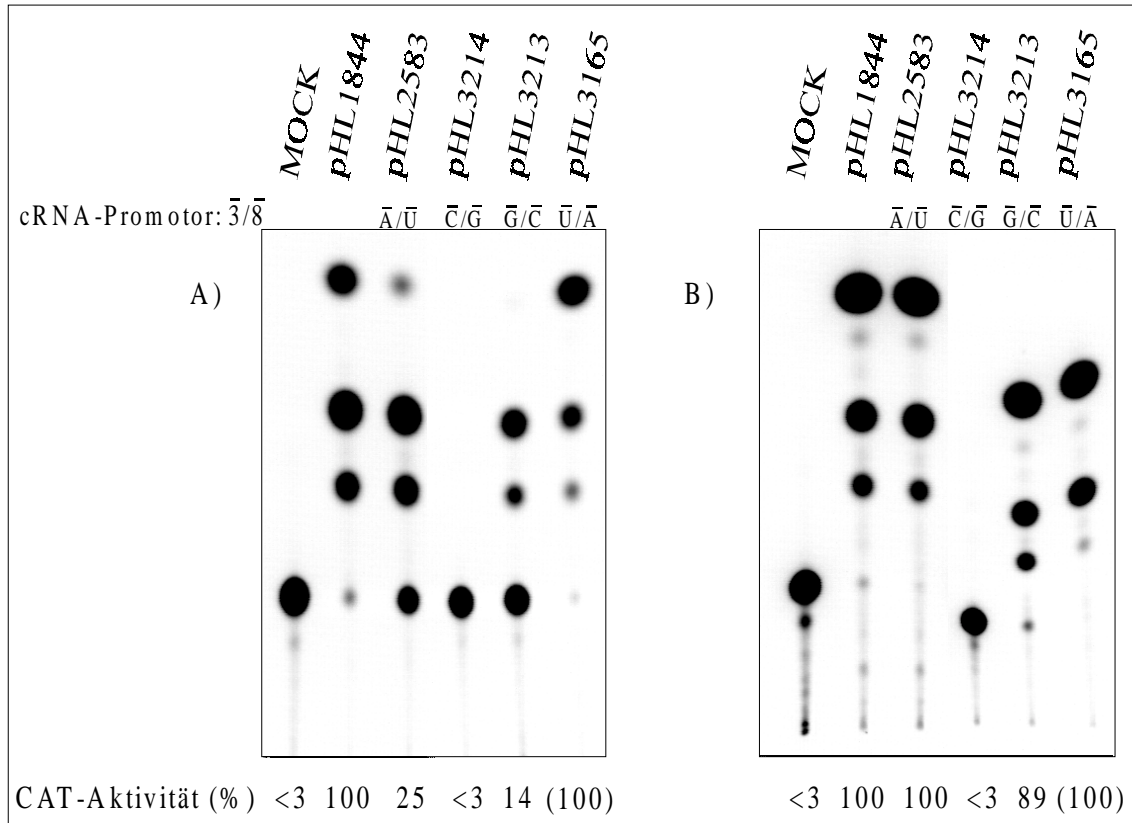


Abb. 3.23: CAT-Analyse der kompensierenden Doppelsubstitutionen an den Positionen $\bar{3}$ und $\bar{8}$ des 3'-cRNA-Promotorstranges

A) CAT-Analyse der primär transfizierten 293T-Zellen. B) CAT-Analyse der Passage in MDCK-Zellen. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um die gleiche Versuchsserie wie bei den in Abbildung 3.20 präsentierten Ergebnissen.

Die kompensierenden Substitutionen an den Positionen $\bar{3}$ und $\bar{8}$ des 3'-Stranges des cRNA-Promotors führen bei dem G/C-Paar zu einer verminderten bzw. bei dem U/A-Paar zu einer erhöhten CAT-Aktivität. Hier scheint die Basenpaarung eine Voraussetzung für die Bindung der viralen RNA-Polymerase zu sein, ohne dass unbedingt eine Basenspezifität vorliegen muss. Bei der C/G-Basenpaarung läßt sich dagegen keine CAT-Expression nachweisen. Bei der damit vorliegenden asymmetrischen Verteilung zwischen den Cysteinresten ($\bar{2}$, $\bar{3}$) und den Guaninresten ($\bar{8}$, $\bar{9}$) verhindert offenbar die *stacking-interaction* zwischen den benachbarten Purinen die Basenpaarbildung, und die „*corkscrew*“-Struktur kann in der Wechselwirkung mit der viralen RNA-Polymerase nicht ausgebildet werden. Demgegenüber führt die kompensierende U $\bar{3}$ /A $\bar{8}$ -Basenpaarung sogar zu einer erhöhten CAT-Aktivität gegenüber der positiven Kontrolle mit den 1104-analogen Mutationen. Die Abnahme der CAT-Aktivität im Falle der G $\bar{3}$ /C $\bar{8}$ -Basenpaarung kann der stärkeren dreifachen

Wasserstoffbindung zwischen den gepaarten G-C-Basen zugeschrieben werden. Tatsächlich benötigt die virale RNA-Polymerase für die Erkennung des cRNA-Promotors eine Basenpaarung an Position $\bar{3}$ und $\bar{8}$ des 3'-Endes. Damit jedoch der Polymerasekomplex entlang der cRNA wandern kann, um die Transkription oder die Replikation einzuleiten, muss die Basenpaarung gelöst werden. Da die Trennung der dreifachen Wasserstoffbindung schwieriger ist als der zweifachen bei dem A/U-Paar, kommt es zur Verzögerung der Funktion der viralen RNA-Polymerase und damit zur Abnahme der Expressionsrate des CAT-Reportergens (ähnlich wie bei der vRNA-Promotoranalyse: Flick, 1998).

Da die Basenpaarung U/A am 3'-Ende zu einer höheren Aktivität als die positive cRNA- und vRNA-Kontrolle führt, wurde sie mit den anderen kompensierenden Basenpaarungen des 5'-Stranges in den Konstrukten pHL3226, pHL3227 und pHL3228 kombiniert. Das Ergebnis ist jedoch ebenfalls negativ und lässt auf eine gegen jede Änderung der Stabilität empfindliche Struktur schließen.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass für die Funktion der viralen RNA-Polymerase der proximale 3'-cRNA-Promotorstrang eine robuste, auch bei Stabilitätsveränderungen stabile „*corkscrew*“-Sekundärstruktur einnimmt, während dies für die offenbar empfindliche 5'-cRNA-Promotorstruktur auf diese Wege nicht bewiesen werden kann.

3.3.4 Analyse des distalen cRNA-Promotorabschnittes

Zur Ausbildung der „corkscrew“-Konformation des aktiven vRNA-Promotors sind neben den Nukleotiden an Position 3 und 8 des proximalen Bereiches auch die Nukleotide C an Position $\bar{11}$ im 3'- und G an Position 12 im 5'-Strang des distalen Bereiches essentiell. Die Aufhebung dieser Basenpaarung in vRNA-Promotorvarianten schwächt bzw. zerstört die Promotoraktivität. Bei der komplementären cRNA werden daraus die Nukleotide G an Position 11 im 5'- und C an Position $\bar{12}$ im 3'-Strang. Der Einfluß von Einzelnukleotidaustauschen bzw. der kompensierenden A/U-Paarung werden für dieses Basenpaar getestet.

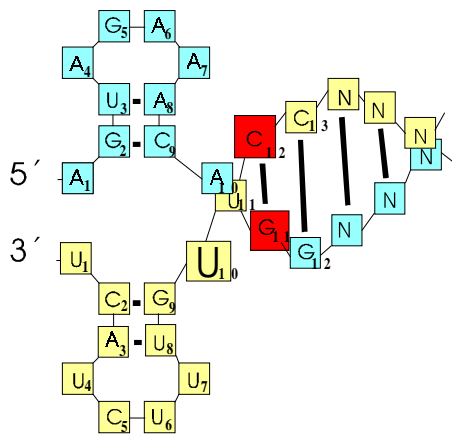


Abb. 3.24: Schematische Darstellung des cRNA-Promotors in der „corkscrew“-Konformation

Die untersuchten Nukleotide C $\bar{12}$ am 3'- und G11 am 5'-Ende sind rot gekennzeichnet. Die variablen Nukleotide des doppelsträngigen distalen cRNA-Promotorbereichs sind hier mit N gekennzeichnet.

Die CAT-Analyse (Abb. 3.25) zeigt, dass die Basenpaarung zwischen den Nukleotiden 11 am 5'- und $\bar{12}$ am 3'-Ende des cRNA-Promotors für die Erkennung der viralen RNA-Polymerase essentiell ist. Diese Erkennung scheint jedoch nicht nukleotidspezifisch zu sein, da die CAT-Expression der A/U-Basenpaarung gegenüber der C/G-Basenpaarung nur geringfügig schwächer ist.

Diese Analyse des distalen cRNA-Promotorabschnittes weist ebenfalls wie die des proximalen Abschnittes auf eine „corkscrew“-Konformation des aktiven cRNA-Promotors hin.

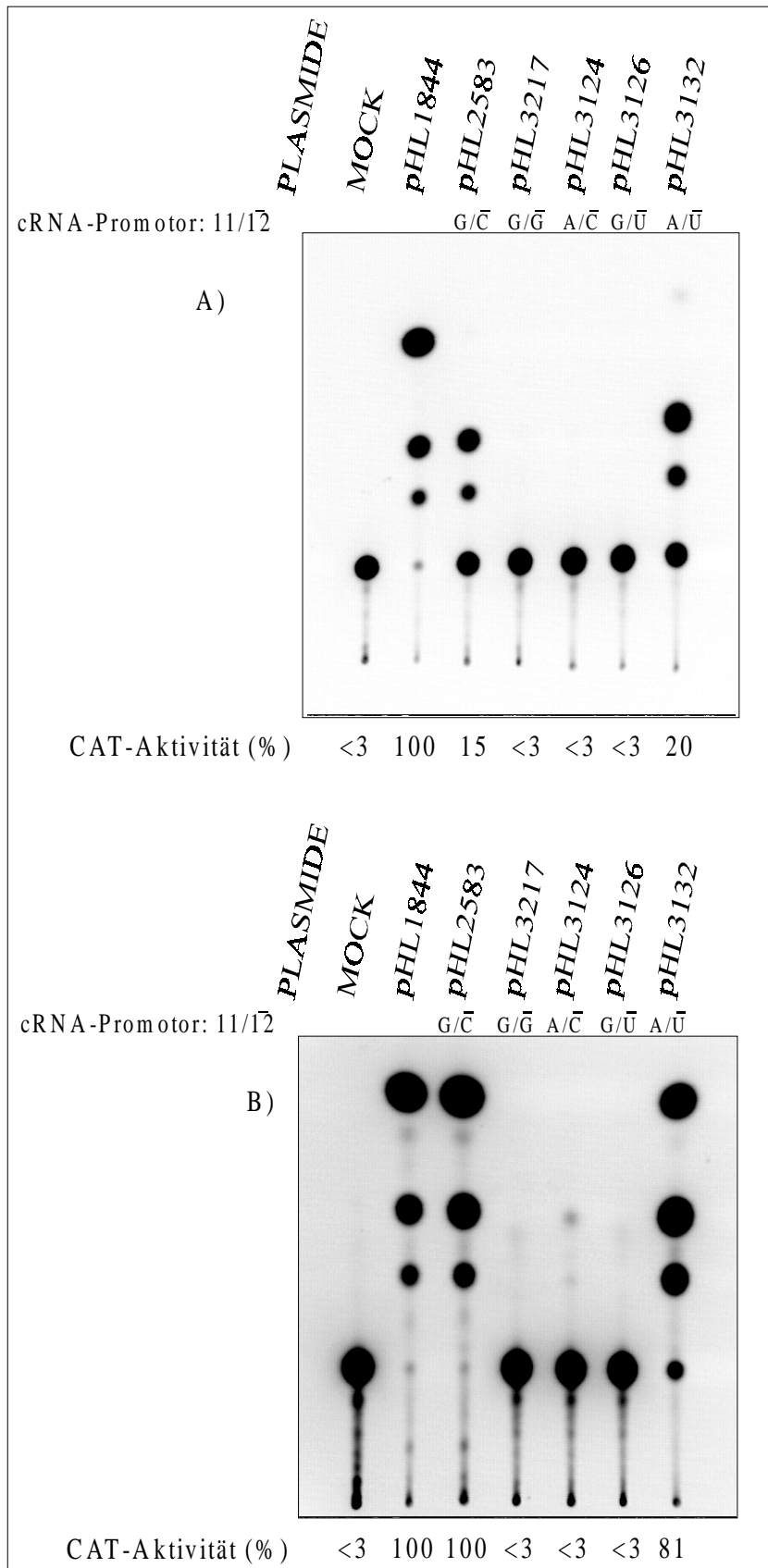


Abb. 3.25: CAT-Analyse des distalen cRNA-Promotorabschnittes

A) CAT-Analyse nach der primären Transfektion in 293T-Zellen

B) CAT-Analyse nach der Passage in MDCK-Zellen

3.4 Analyse des 5'-Endes der cRNA-Transkriptions- und Replikationsprodukte

Die CAT-Analyse des cRNA-Promotors deutet darauf hin, dass die Transkription dieser cRNA mit den 5 Uridinresten am 5'-Ende des cRNA-Promotors und dem Reporter gen in negativer Orientierung erfolgt. D.h. auch die cRNA kann transkribiert werden und dient nicht nur als Matrize für die vRNA-Replikation. Dies muss aber noch in weiteren experimentellen Schritten bestätigt werden. Bei der Transkription der viralen RNA-Moleküle (vRNAs) entsteht die mRNA, bei der Replikation der vRNA die komplementäre cRNA. Für die Transkription zu viraler mRNA wird ein Startermolekül benötigt, das in einem „cap-snatching“-Prozess von der Nuklease-Aktivität der PB2-Untereinheit der viralen RNA-Polymerase auf Kosten zellulärer mRNA-Moleküle zur Verfügung gestellt wird (siehe 1.4.6.1). Dieses Startermolekül hybridisiert mit dem ersten Nucleotid am 3'-Ende der vRNA-Matrize, und es kommt damit zur Transkription der folgenden Nucleotidsequenzen. Die entstandenen mRNA-Moleküle weisen damit an ihren heterologen 5'-Enden zusätzliche Fremd-Nucleotide auf. Die cRNA-Synthese läuft dagegen ohne Startermolekül vom ersten Nucleotid am 3'-Ende bis zum letzten Nucleotid am 5'-Ende des vRNA-Moleküls ab.

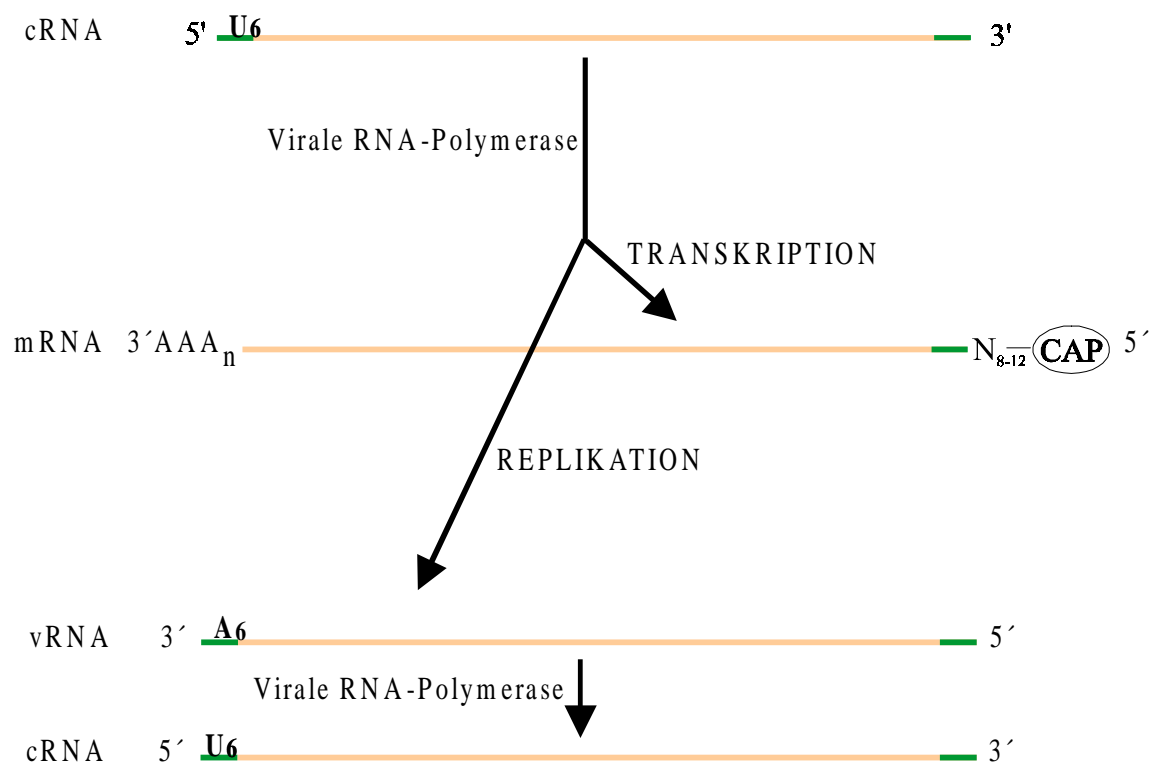


Abb. 3.26: Transkription und Replikation der Influenza A-cRNA-Moleküle

Die genaue Bestimmung des Transkriptionsstarts bzw. des 5'-Endes der einzelnen mRNA-Moleküle kann mit Hilfe der RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-Methode erfolgen.

Wenn, wie hier gezeigt, die cRNA zu mRNA transkribiert wird (Abb. 3.26), muss ein ähnlicher „cap-snatching“-Prozess stattfinden. Bei der Replikation muss dagegen eine komplementäre vRNA (Abb. 3.26) entstehen, die mit dieser Methode ebenfalls nachgewiesen werden kann.

Die CAT-Analyse der ersten Passage zeigt eine starke Expression (Abb. 3.14 u.a.), die auf eine starke Transkriptionsleistung zurückzuführen ist. Für die RACE-Reaktion (Abb. 3.27) wird daher die mRNA bzw. die Gesamt-RNA aus den primär infizierten 293T-Zellen und ebenso aus den sekundär infizierten MDCK-Zellen der ersten Passage isoliert. Zur Detektion der komplementären vRNA wird die Reverse Transkriptase-Reaktion der Gesamt-RNA mit einem CAT-spezifischen Startermolekül CATII² durchgeführt. Dieses CATII-Startermolekül hybridisiert an einer Sequenz innerhalb des positiv orientierten CAT-Reportergens. Um die virale mRNA zu detektieren, wird die Reverse Transkriptase-Reaktion mit einem T21³-Startermolekül durchgeführt. Die Reaktionsprodukte werden aufgereinigt (2.2.5.4), um alle nicht eingebauten Nukleotide zu entfernen, die in der nächsten Reaktion stören würden. In einer terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase-Reaktion werden Guaninsäure-Reste an das 3'-Ende der cDNA-Moleküle angefügt. In einer anschließenden PCR-Reaktion mit den Startermolekülen CII⁴ (komplementär zu den angefügten Guaninresten) und CAT III⁵ (komplementär zu dem 5'-Strang des CAT-Reportergens) können die modifizierten cDNA-Moleküle amplifiziert werden. In einer zweiten PCR-Reaktion mit einem CII-*anchor*⁶- und einem zweiten weiter proximal gelegenen CAT Startermolekül CAT VI⁷ wird die spezifische Amplifikation erhöht (*nested PCR*). Das entstandene PCR-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (Schnittstelle im Startermolekül CII-*anchor* eingefügt) und *Eco*RI (Schnittstelle im CAT-Fragment) gespalten und in einen pBSK+ *Bam*HI-*Eco*RI-Vektor einligiert. Die resultierenden Klone werden anhand ihrer *Bam*HI-*Eco*RI-Schnittstellen charakterisiert. Als positive Klone werden diejenigen bezeichnet, die nach der *Bam*HI-*Eco*RI-Spaltung ungefähr die Größe des PCR-Fragments aufweisen. Die Bestimmung des 5'-Endes erfolgt anschließend durch die Sequenzierung mit dem T3⁸-Startermolekül.

²CATII: 5'-CATCGCAGTACTGTTGTAA-3'
³T21: 5'-ATACTCGAGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
⁴CII: 5'-GAAGATCTGATCAGGATCCCCCCCCCCCC-3'
⁵CATIII: 5'-CGGTGTAACAAGGGTGAA-3'
⁶CII-*anchor*: 5'-CCATCGATGAAGATCTGATCAGGATCC-3'
⁷CATVI: 5'-AATAGAATTCAGCATTTCATCAGGCGGGC-3'
⁸T3: 5'-GCTCGAAATTAACCCCTCACTAAAG-3'

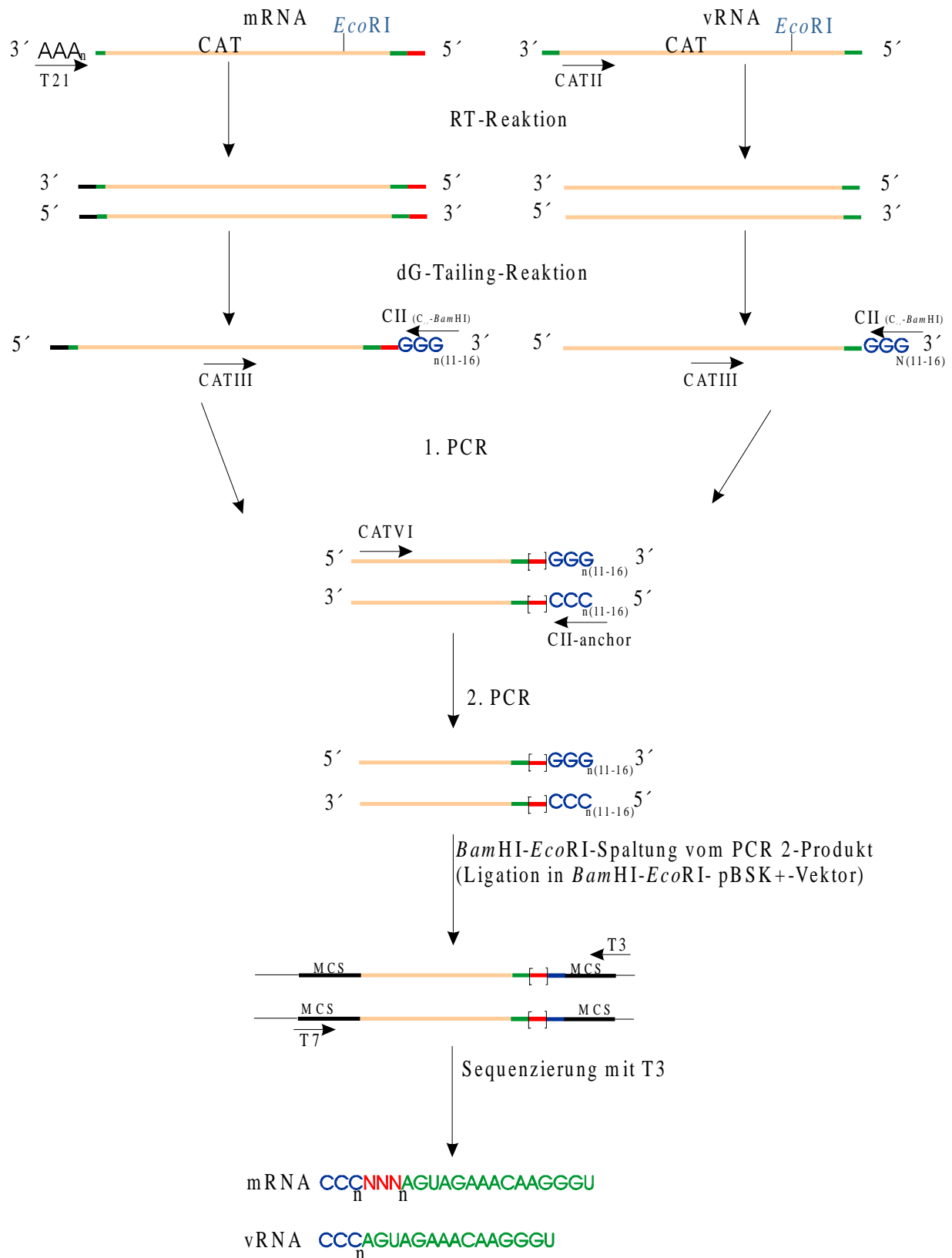
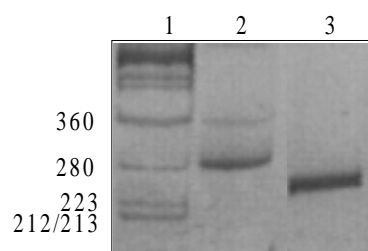


Abb. 3.27: Ablauf der RACE-Methode, mit der die 5'-Enden der cRNA-Transkriptionsprodukte bestimmt werden. Grün: Promotorsequenz, rot: Startermolekül, blau: eingefügte Guaninreste, schwarz: Poly-A-Schwanz. *EcoRI*-Schnittstelle liegt in der CAT-Sequenz, *BamHI* in dem CII- bzw. CII-anchor-Oligonukleotid und wird durch die Amplifikation eingeführt.

**Abb. 3.28: Das RACE-PCR-Produkt**

PAA-Gel: 7,5%

1: Größenstandard

2: RACE-PCR-Produkt (288 bp)

3: *Bam*HI-*Eco*RI Spaltungsprodukt
des RACE-PCR-Fragmentes (261 bp)

Die Sequenzierungen ergeben, dass das Verhältnis Transkriptionsprodukt mRNA: Replikationsprodukt vRNA ungefähr bei 1:10 liegt. Die 5'-Enden der mRNA-Moleküle sind in Tabelle 3.1 ersichtlich, die der vRNA in Tabelle 3.2.

Tabelle 3.1: Bestimmung der 5'-Endsequenzen der mRNA-Moleküle nach der RACE-Methode

Die Klone 5-79 stammen aus isolierter Gesamt-RNA, ausgehend von dem cRNA-Konstrukt pHL2583. Die Klone 104-162 stammen aus mRNA-Isolaten, ausgehend von dem cRNA-Konstrukt pHL2583 (107, 120, 147, 150, 157) bzw. von dem cRNA-ambi-Konstrukt (vgl. 3.7) pHL2891 (Klone 104, 143). **Blau:** Cytosinnukleotide, komplementär zu den durch die Tailingreaktion angefügten Guaninresten, **rot:** die Sequenz der über den „cap-snatching“-Prozeß zur Verfügung gestellten Startermoleküle, **grün:** die zur 3'-cRNA-Promotor komplementäre Sequenz, schwarz: von der Sequenz abweichende Nukleotide. Das Leerzeichen in der Sequenz deutet auf ein fehlendes Nukleotid hin.

RACE-Klon	Sequenz des 5'-Endes
5	C ₁₂ GUCCAGUAGAAACAAGGGUA
13.1.1	C ₁₂ UAGCAUCAGUAGAAACAAGGGUA
13.1.2	C ₁₄ UUCUAAGUAGAAACAAGGGUA
13.3	C ₁₂ UCUCCUCAGUAGAAACAAGGGUA
13.5	C ₁₃ AGUAUAAGUAGAAACAAGGGUA
13.6	C ₁₂ UAGUAUAAGUAGAAACAAGGGUA
13.8.1	C ₁₂ UCUUCUAAGUAGAAACAAGGGUA
13.8.2	C ₁₃ AGCAUCAGUAGAAACAAGGGUA
20	C ₁₃ AUUAUAAGUAGAAACAAGGGUA
72	C ₁₂ GCAGUAGAAACAAGGGUA
79	C ₁₂ GAGUAGAAACAAGGGUA
104.14	C ₁₁ UGAGAGAGACAGAAGUAGAAACAAGGGUA
104.18	C ₁₁ GAGAGAGATTGAAGUAGAAACAAGGGUA
107	C ₁₂ GAUACUACUUGAGUAUAAACAAGGGUA
120	C ₁₂ GAGUAGAAACAAGGGUA
143.1	C ₁₁ GGUAGUACACACAAGGGUA
143.2	C ₁₁ GGUAGGAUUUCACGUGGUAGAGGUACAAACAAGGGUA
147	C ₁₁ GAGUAGAAACAAGGGUA
150	C ₁₂ GGAGUAUAAACAAGGGUA
157	C ₁₂ GAUAGUUACCU GUAGAAACAAGGGUA
153	C ₁₁ AGUAGAAACAAGGGUA
162	C ₁₂ AGUAAAAACAAGGGUA

Tabelle 3.2: Bestimmung der 5'-Endsequenzen der durch cRNA-Replikation gebildeten vRNA-Moleküle

Alle Klone stammen aus Gesamt-RNA-Isolaten von pHL2583. **Blau**: die Cytosinnukleotide, komplementär zu den durch die Tailingreaktion angefügten Guaninsäure-Resten, **grün**: 5'-Promotorsequenz, komplementär zur 3'-cRNA-Promotorsequenz, **schwarz**: abweichende Sequenzpositionen. In der Tabelle ist nur ein Teil der sequenzierten vRNA-Moleküle aufgeführt.

RACE-Klon	Sequenz des 5'-Endes
15	C ₁₁ AGUAGAAACAAGGGUA
14	C ₁₁ AGUAGAAACAAGGGUA
17	C ₁₃ AGUAGAAACAAGGGUA
18	C ₁₄ AGUAGAAACAAGGGUA
31	C ₁₁ AGUAGAAACAAGGGUA
44	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA
48	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA
55	C ₁₆ AGUAGAAACAAGGGUA
57	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA
58	C ₁₃ AGUAGAAACAAGGGUA
59	C ₁₃ AGUAGAAACAAGGGUA
60	C ₁₃ AGUAGAAACAAGGGUA
61	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA
62	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA
64	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA
66	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA
83	C ₁₃ AGUAAAACAAGGGUA
101	C ₁₃ AGUAGAAACAAGGGUA
110	C ₁₃ AGUAGAAACAAGGGUA
111	C ₁₃ AGUAGAAACAAGGGUA
124	C ₁₂ AGUAGAAACAAGGGUA

Die in Tabelle 3.1 und 3.2 aufgeführten Endsequenzen deuten daraufhin, dass cRNA-Moleküle zu mRNA transkribiert bzw. zu vRNA repliziert werden können. Dabei ist die Rate der Transkription zu Replikation kleiner als bei einem vRNA-Molekül, was sowohl aus der RACE-Analyse als auch aus der CAT-Analyse deutlich wird. Mit Ausnahme von Klon157 und Klon 143.2 (Tabelle 3.1) beginnen die 5'-Promotorsequenzen (**grün**) mit dem Adennukleotid, komplementär zu Uridin, dem ersten Nukleotid am 3'-Ende des cRNA-Promotors. D.h. die cRNA-Transkription startet überwiegend schon am ersten Nukleotid der cRNA-Matrize. Die Nukleotidlänge der Startermoleküle zwischen den Cytosinresten und dem Transkriptionsstart am 5'-Ende der mRNA-Moleküle variiert zwischen 1 und 22. Bei den Klonen 153 und 162 aus mRNA-Isolaten lassen sich keine Zusatznukleotide vor dem Transkriptionsstart nachweisen. Damit kann für diese Isolate trotz mRNA-spezifischer

Isolierung nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um die 5'-Enden von vRNA-Molekülen handelt. Die Häufigkeit der Zusatznucleotide ist in Abbildung. 3.29 dargestellt.

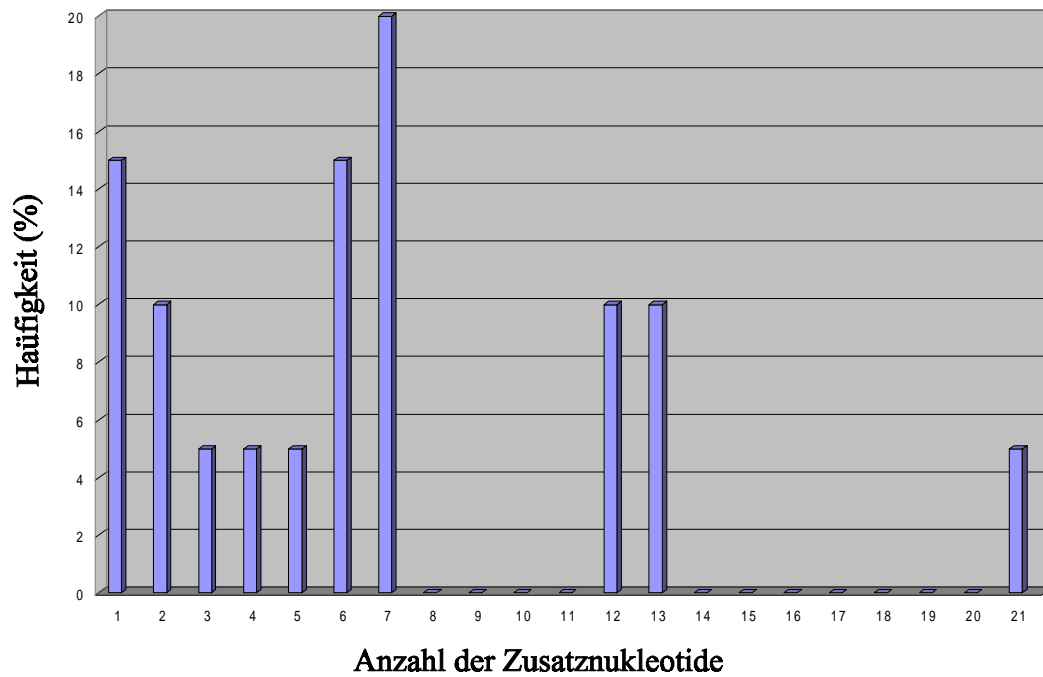


Abb. 3.29: Längenverteilung der Zusatznucleotide (Startermoleküle) an den 5'-Enden der entlang der cRNA-Matrize transkribierten mRNA-Moleküle

3.5 Variationen in den cRNA-Konstrukten

3.5.1 Aufbau eines pHL2583-analogen Konstruktes

Die Klonierung der cRNA-Konstrukte wie in der Abbildung 3.12 beschrieben, ist zeitaufwendig. Deswegen wurde ein einfacheres Klonierungsschema entwickelt, bei dem das pHH21-Konstrukt mit 2 Erkennungssequenzen des „Ausleger“-Enzyms (*Bbs*I) versehen wird. Anschließend wird das CAT-Reportergen zwischen die Erkennungssequenzen von *Bbs*I und *Bsm*BI in negativer Orientierung inkliert. Die gewünschten Promotorvarianten konnten dadurch in einem einzigen Klonierungsschritt als Oligonukleotide entweder über die *Bsm*BI-Schnittstellen (5'-cRNA-Promotorvarianten) oder über die *Bbs*I-Schnittstellen (3'-cRNA-Promotorvarianten) inseriert werden (Abbildung 3.30).

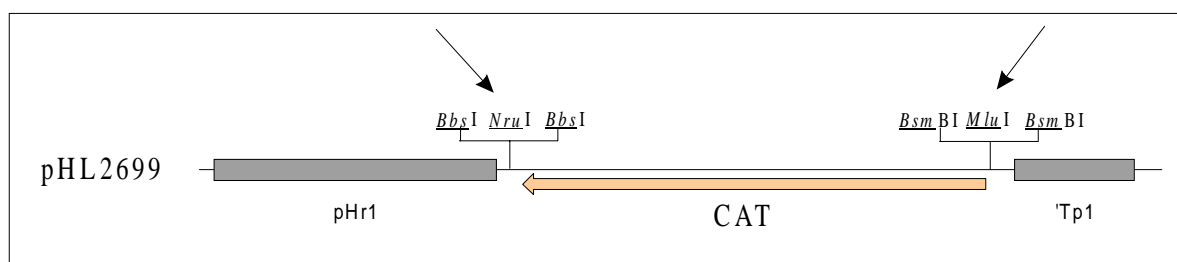


Abb. 3.30: pHL2699: Klonierungskonstrukt für cRNA-Promotorvarianten

Die 5'-cRNA-Promotorvarianten können über die *Bsm*BI-Schnitte, die 3'-cRNA-Promotorvarianten können über die *Bbs*I-Schnittstellen inseriert werden.

Die nach diesem Klonierungsschema entstandenen Klone konnten jedoch für die cRNA-Promotoranalyse nicht eingesetzt werden, da die resultierenden cRNA-Konstrukte nach der Passage in MDCK-Zellen keine CAT-Aktivität gezeigt haben (pHL2721, Abb. 3.31). Das 1104-analoge pHL2721-Plasmid unterscheidet sich von pHL2583 (1104-analoges Konstrukt, Abb. 3.12) in der Sequenz der nichtkodierenden Region am 3'-Ende, vor dem CAT-Start (Abb. 3.32). Es ließ sich nicht erklären, warum die Verpackung des pHL2721 in das Influenza A-Virus nicht erfolgen konnte bzw. eine CAT-Expression nach Passage nicht beobachtet wurde. Eine Möglichkeit liegt in der Anwesenheit einer *Sph*I-Schnittstelle, die eine AUG-Sequenz enthält und direkt vor dem Start des CAT-Reportergens liegt, obwohl eine solche Schnittstelle auch in ähnlicher Position bei pHL2583 vorhanden ist. Tatsächlich zeigt das Konstrukt pHL3010 (entspricht pHL2721, jedoch nach Entfernen der *Sph*I-Schnittstelle) eine CAT-Aktivität nach der Passage. Spätere Erfahrungen haben jedoch gezeigt, dass das

Verpackungsproblem nicht darin liegt, und deswegen war es sicherer, die cRNA-Promotorkonstrukte nach dem Schema in der Abbildung 3.12 aufzubauen.

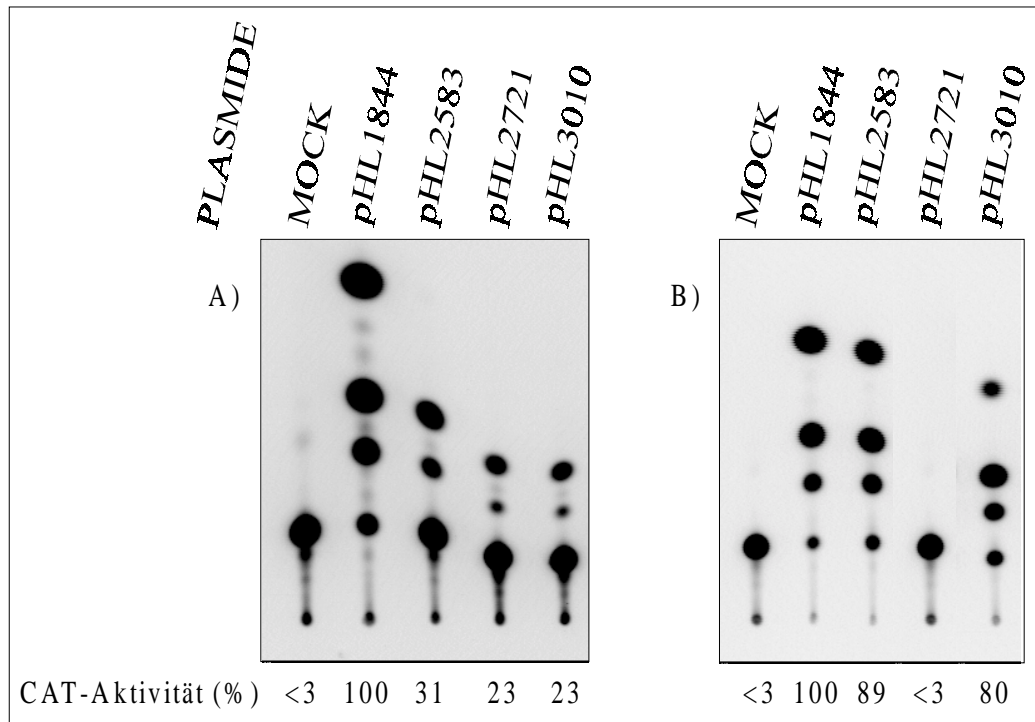


Abb. 3.31: CAT-Analyse verschiedener 1104-analoger cRNA-Konstrukte

Die Promotorsequenzen von pHL2583, pHL2721 und 3010 sind einheitlich, die Konstrukte unterscheiden sich jedoch in der Sequenz der nichtkodierenden Region direkt vor dem CAT-Startcodon. A) CAT-Analyse 26 h nach Transfektion und 12 h nach Infektion in 293T-Zellen. B) CAT-Analyse 10 h nach der ersten Passage in MDCK-Zellen

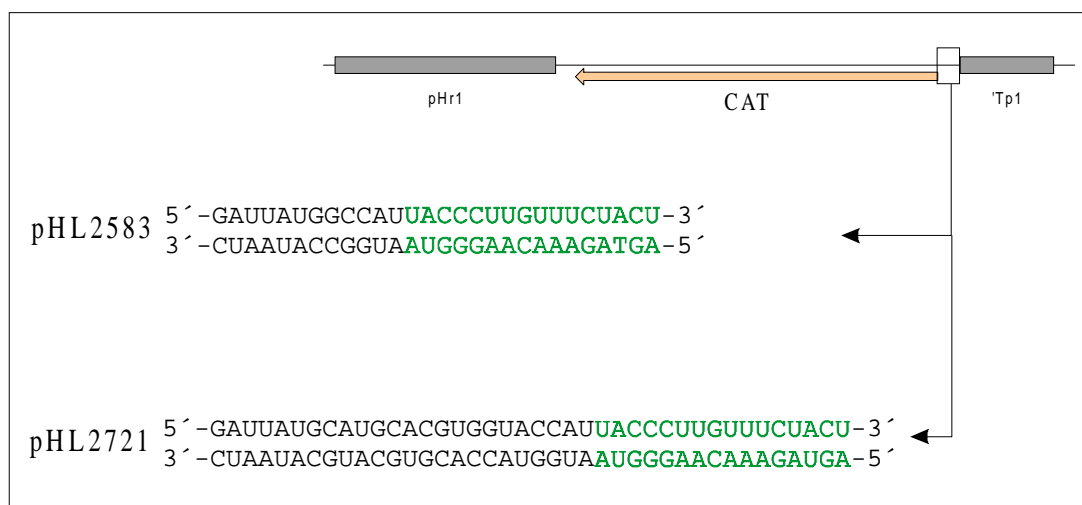


Abb. 3.32: Sequenz der nichtkodierenden Region am 3'-Ende der Konstrukte pHL2583 und pHL2721

Die 3'-cRNA-Promotorsequenz ist in grün dargestellt

3.5.2 Aufbau eines cRNA-Konstruktes mit positiv orientiertem CAT-Reportergen

Der Aufbau des cRNA-Konstruktes pHL2583 entspricht nicht exakt dem Aufbau eines viralen cRNA-Moleküls. Um die Aktivität des cRNA-Promotors zu detektieren, ist es notwendig, mit einem künstlichen Konstrukt zu arbeiten. Bei dem Influenza cRNA-Molekül ist dagegen das kodierende Gen positiv orientiert, und es sind keine Uridinreste in Transkriptionsrichtung vorhanden: 3'→5'. In pHL2706 wird das CAT-Reportergen deshalb in positiver Orientierung zwischen den 5'- und 3'-cRNA-Promotor-Segmenten eingebaut (Abb. 3.33).

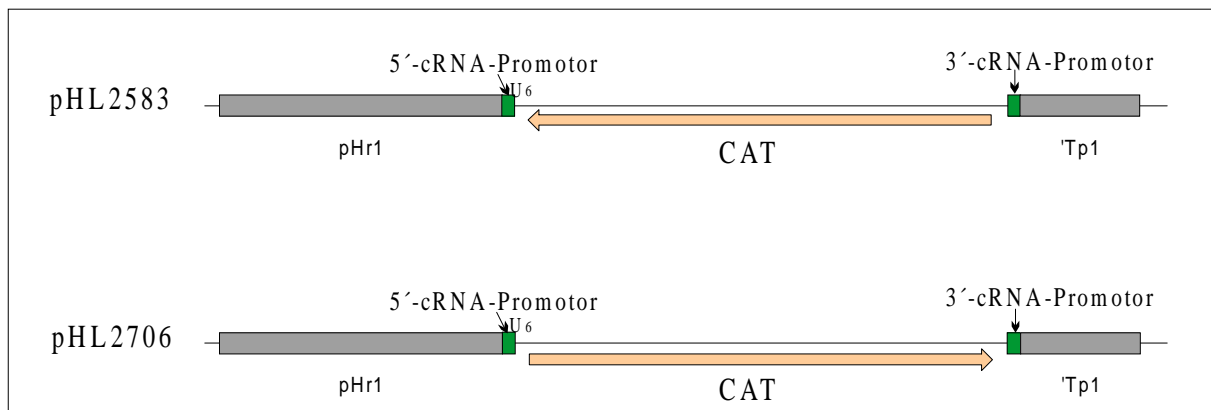


Abb. 3.33: Aufbau der cRNA-Konstrukte pHL2583 und pHL2706

Am 5'-Promotor des pHL2706 sind ebenfalls wie bei pHL2583 6 Uridinreste eingefügt, das CAT-Reportergen ist aber wie in einer natürlich vorkommenden Influenza-cRNA positiv orientiert.

Die CAT-Expression des pHL2706-Konstruktes ist nach der primären Infektion niedriger als diejenige bei pHL2583. In der ersten Passage steigt die CAT-Aktivität beider Konstrukte auf das gleiche Niveau. Im Gegensatz zu pHL2583 (Abb. 3.15) sinkt die CAT-Expression bei pHL2706 in der zweiten Passage stark ab, in der dritten Passage ist das CAT-Signal kaum noch detektierbar (Abb. 3.35). Aus der cRNA des pHL2607-Konstruktes kann eine mRNA gebildet werden, da hier am 5'-Promotorende ebenfalls wie in pHL2583 6 zusätzliche Uridinreste eingefügt werden, jedoch kann aus dieser mRNA kein CAT-Protein translatiert werden, da sie nur negativ orientiert sein kann. Die dennoch erhaltenen CAT-Signale lassen darauf schließen, dass die nach der Transfektion in der Zelle vorliegende cRNA von dem Influenza A-Virus als Zwischenprodukt der Replikation erkannt und zu vRNA repliziert wird (Abb. 3.11).

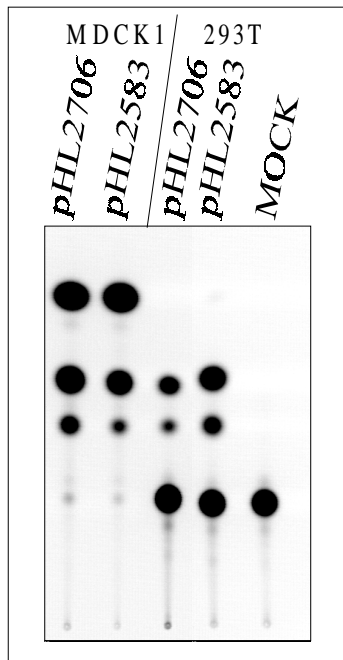


Abb. 3.34: CAT-Analyse der cRNA-Konstrukte pHL2583 und pHL2706

CAT-Analyse 26 h nach Transfektion und 12 h nach Infektion in 293T-Zellen, 10 h nach der ersten Passage in MDCK-Zellen.

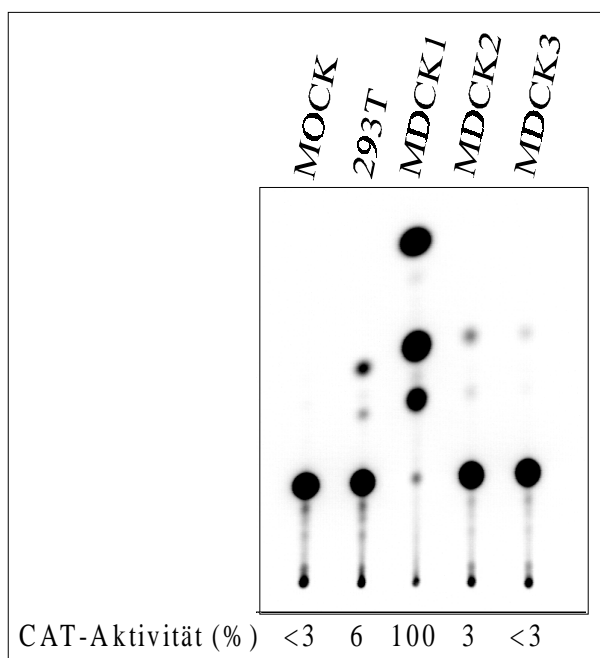


Abb. 3.35: CAT-Expression von pHL2706 nach mehreren Passagen

CAT-Analyse 26 h nach Transfektion und 12 h nach der primären Infektion in 293T-Zellen bzw. 10 h nach jeder Passage (1-3) in MDCK-Zellen.

3.6 Kombination von cRNA- und vRNA-Molekülen zu *ambisense* Molekülen

Ambisense-RNA-Moleküle kommen natürlicherweise bei den Arenaviren vor. Das Genom dieser Viren besteht aus zwei Segmenten einzelsträngiger RNA, die eine *ambisense*-Orientierung aufweisen. Artifizuell wurde ein *Ambisense*-System bei den Rabiesviren realisiert (Finke *et al.*, 1997). In einem *Ambisense*-System erfolgt die Transkription zweier Gene ausgehend von einem einzigen *ambisense* Molekül. Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass ein cRNA-Molekül mit den 6 zusätzlich eingefügten Uridinresten am 5'-Promotorende und dem kodierenden Gen in positiver Orientierung in der Lage ist, die Transkription zur mRNA zu ermöglichen, ist in einem weiteren Schritt eine cRNA-Sequenz mit einer vRNA-Sequenz zu einem System zusammengefügt worden. Die Transkription des einen Gens soll daher von dem cRNA-Promotor, die des anderen von dem vRNA-Promotor eingeleitet werden. Mit Hilfe des Polymerase I-Transkriptionssystems wird dafür ein cDNA-*Ambisense*-Konstrukt aufgebaut, das die Reportergene CAT und GFP enthält.

In Abbildung 3.36 ist das Klonierungsschema der *ambisense* Konstrukte dargestellt. Zunächst wird in den mit den Restriktionsenzymen *NdeI-XbaI* geschnittenen Vektor des pHL2559-Plasmids (Abb. 3.12) ein CAT-Reportergen in negativer Orientierung einligiert. Das GFP-Reportergen wird anschließend in das neue Konstrukt pHL2705 mittels einer *HindIII-EcoRV*-Doppelspaltung inkloniert. Das nun entstandene Konstrukt pHL2707 besitzt zwei entgegengesetzt orientierte Gene. In einem parallelen Schritt wird pHL2710, ein Derivat des pHL2699-Konstruktes (Abb. 3.30), das zwischen seinen *BbsI*-Schnittstellen die 1104-analoge 5'-cRNA-Promotorsequenz enthält, mit *BsmBI* gespalten. Ein Oligonukleotid mit der 1104-5'-vRNA-Promotorsequenz wird zwischen diese *BsmBI*-Schnittstellen inseriert. Mittels einer *KpnI-HindIII*-Doppelspaltung wird schließlich die gesamte *ambisense*-DNA aus dem pHL2707 ausgeschnitten und in den pHL2891-Vektor an den gleichen Schnittenden einligiert. Es resultiert das erste *ambisense* Konstrukt pHL2899, in dem die Transkription des CAT-Gens von dem cRNA Promotor und die des GFP-Gens von dem vRNA-Promotor gesteuert wird. In einem zweiten *ambisense* Konstrukt pHL2900 wird die Transkription des CAT-Gens von dem vRNA-Promotor und die des GFP-Gens von dem cRNA-Promotor gesteuert. Hierfür wird pHL2899 mit den Restriktionsenzymen *NruI* und *Asp718* gespalten und als Vektor für die inverse Ligation der gesamten *ambisense* DNA [*PmII* (partiell)-*SplI*-Insert], ebenfalls aus dem pHL2707-Konstrukt, verwendet.

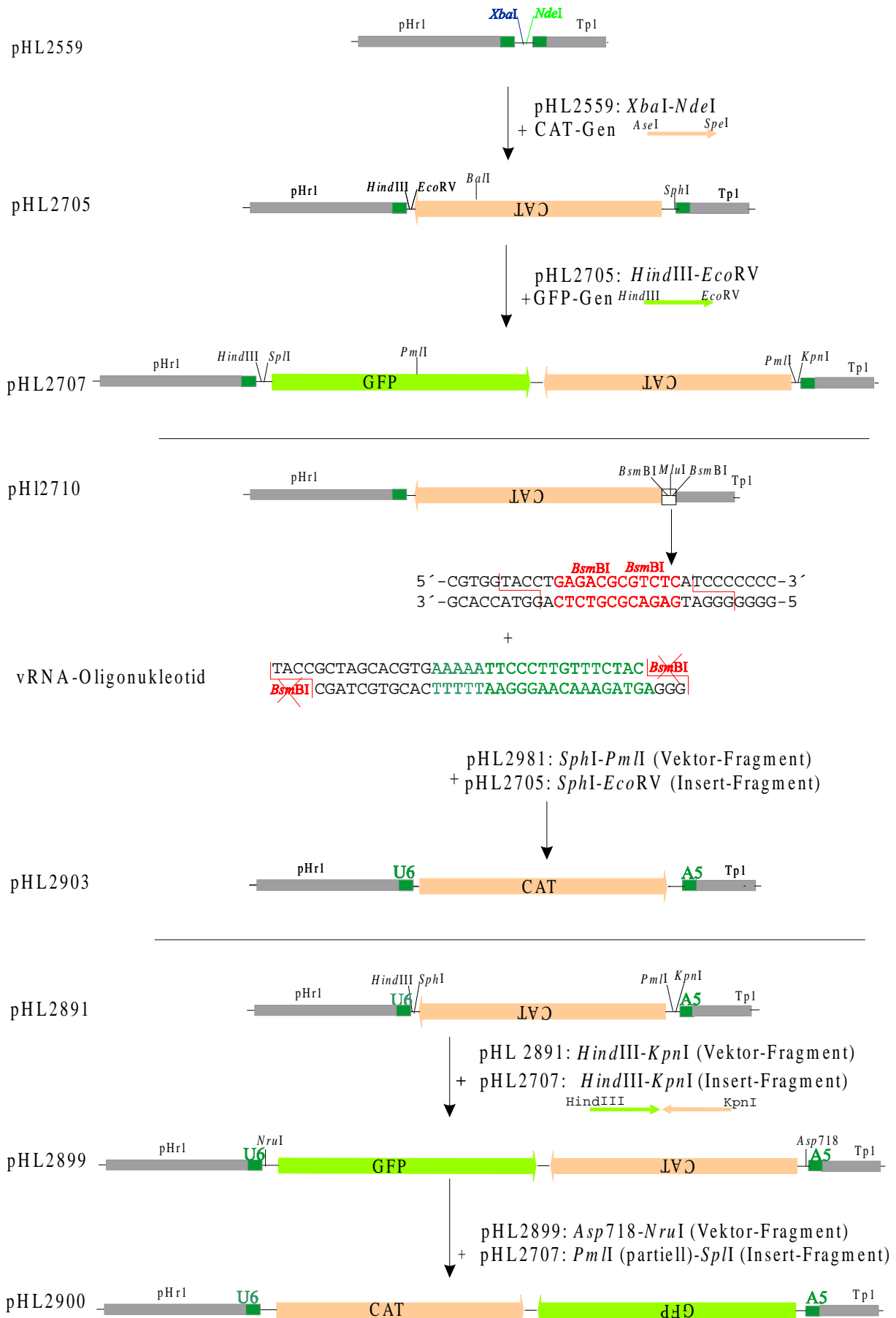


Abb. 3.36: Klonierungsschema der *ambisense* Konstrukte

In dem Polymerase I-Transkriptionssystem werden die Reportergene CAT und GFP zwischen die cRNA- und die vRNA-1104-Promotorsequenzen einkloniert, es entsteht ein *ambisense* Konstrukt, das aus zwei Genen in gegenläufiger Orientierung (*ambisense*) besteht. Als *ambisense* Promotorkontrolle wird das CAT-Reportergen in pHL2891 in negativer Orientierung und in pHL2903 in positiver Orientierung zwischen die in dem *ambisense* Konstrukt verwendeten Promotorsequenzen eingesetzt. Im ersten Fall wird das CAT-Gen von dem cRNA-Promotor, im zweiten von dem vRNA-Promotor transkribiert.

Der Ablauf der *ambisense* Transkription in dem *ambisense* Polymerase I-Transkriptionssystem ist in Abbildung 3.37 graphisch dargestellt. Das Prinzip, wie die cRNA- und vRNA-Promotoren die *ambisense* Promotor-Expression beider Gene steuern, lässt sich mit Schema 3.38 erklären. Nach Transfektion des *ambisense* Konstruktes entsteht durch die Funktion der zellulären RNA-Polymerase I ein *ambisense* cRNA-Molekül. Handelt es sich dabei um pHL2899 oder gleich aufgebaute Derivate (CAT in *antisense*, GFP in *sense*), wird nach der Infektion mit FPV-Virus das CAT-Reportergen, ausgehend von dem cRNA-Promotor, in einem Schritt transkribiert. Das GFP-Reportergen wird über zwei vorgelagerte Schritte hinweg exprimiert. Zuerst wird mit Hilfe der viralen RNA-Polymerase das *ambisense* cRNA-Molekül in ein *ambisense* vRNA-Molekül umgeschrieben, dann wird ausgehend von dem vRNA-Promotor das GFP-Reportergen transkribiert. Handelt es sich dabei um pHL2900 oder seine Derivate (CAT in *sense*, GFP in *antisense*), wird die GFP-Transkription in einem Schritt von dem cRNA-Promotor, die CAT-Transkription in zwei Schritten von dem vRNA-Promotor eingeleitet.

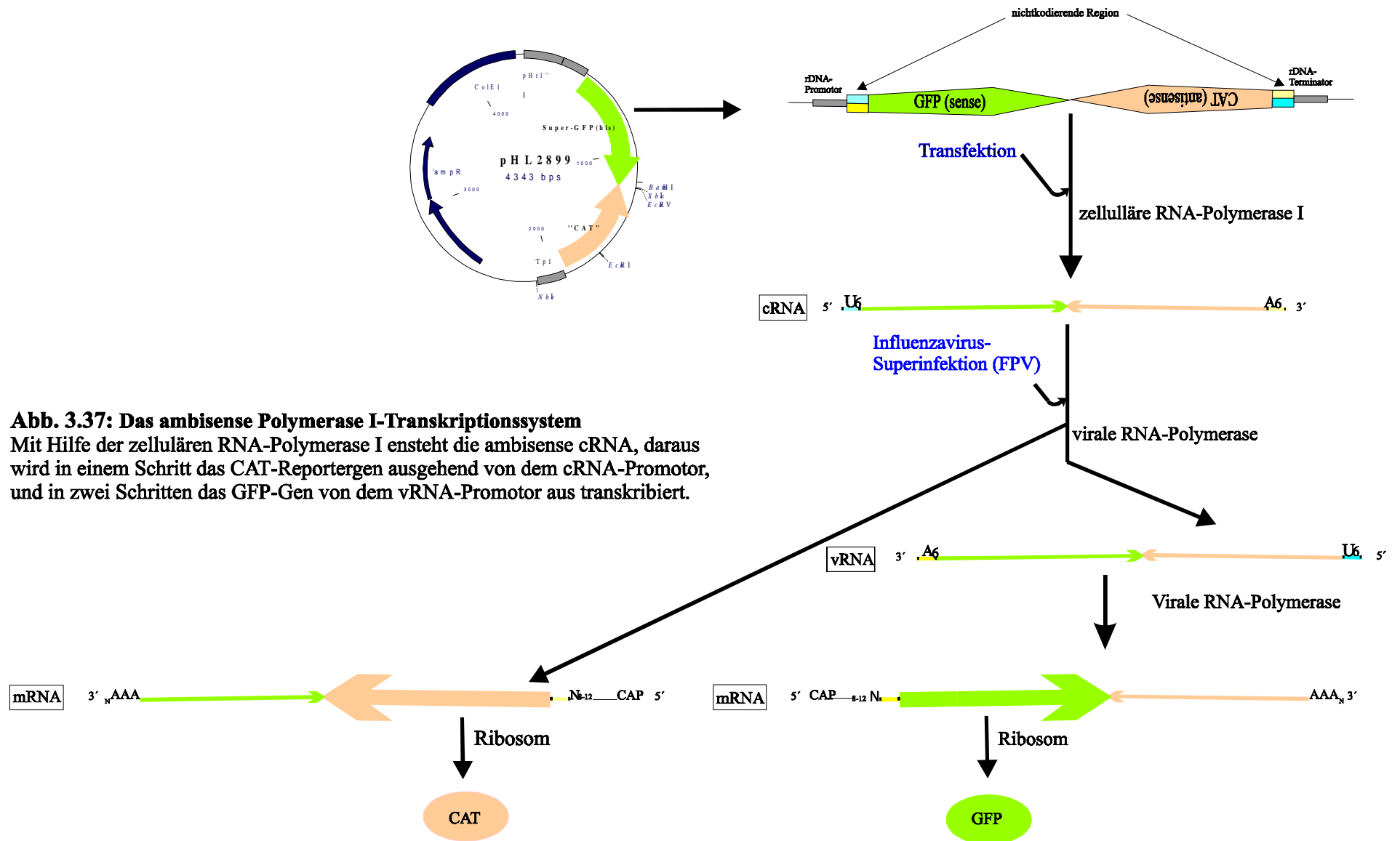
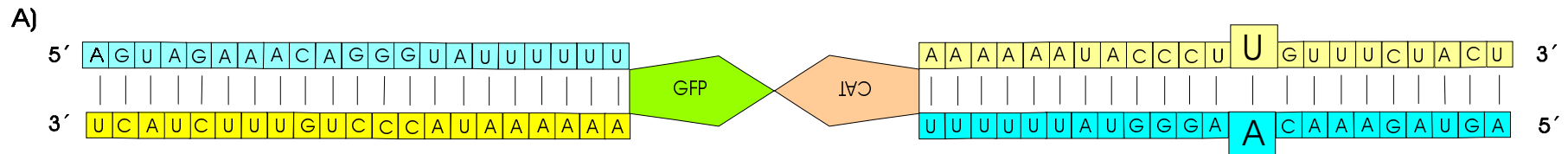


Abb. 3.37: Das ambisense Polymerase I-Transkriptionssystem
 Mit Hilfe der zellulären RNA-Polymerase I entsteht die ambisense cRNA, daraus wird in einem Schritt das CAT-Reportergen ausgehend von dem cRNA-Promotor, und in zwei Schritten das GFP-Gen von dem vRNA-Promotor aus transkribiert.



B) ambisense vRNA-Promotor ambisense cRNA-Promotor

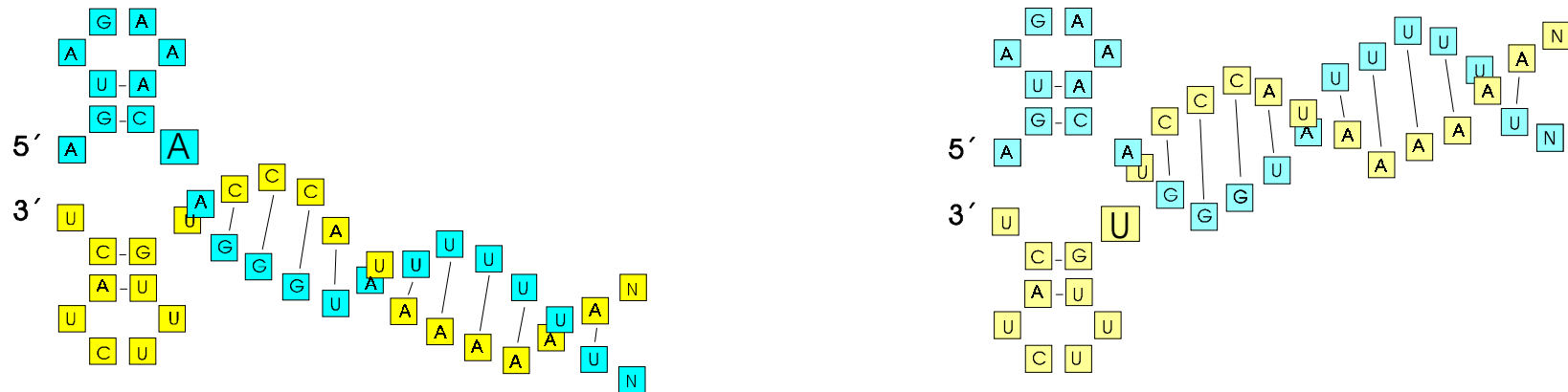


Abb. 3.38: Aufbau des *ambisense* RNA-Segmentes

A) Aufbau der durch die zelluläre RNA-Polymerase I transkribierten *ambisense* cRNA: Hellblau→hellgelb und der durch Replikation daraus entstandenen *ambisense* vRNA: Dunkelblau→dunkelgelb.

B) Die vRNA- und cRNA-Promotorstrukturen der *ambisense* RNA-Moleküle.

3.6.1 CAT-Expression in den *ambisense* Konstrukten

Die ersten *ambisense* Konstrukte werden bezüglich ihrer CAT-Aktivität nach der primären Infektion und der ersten Passage in MDCK-Zellen untersucht.

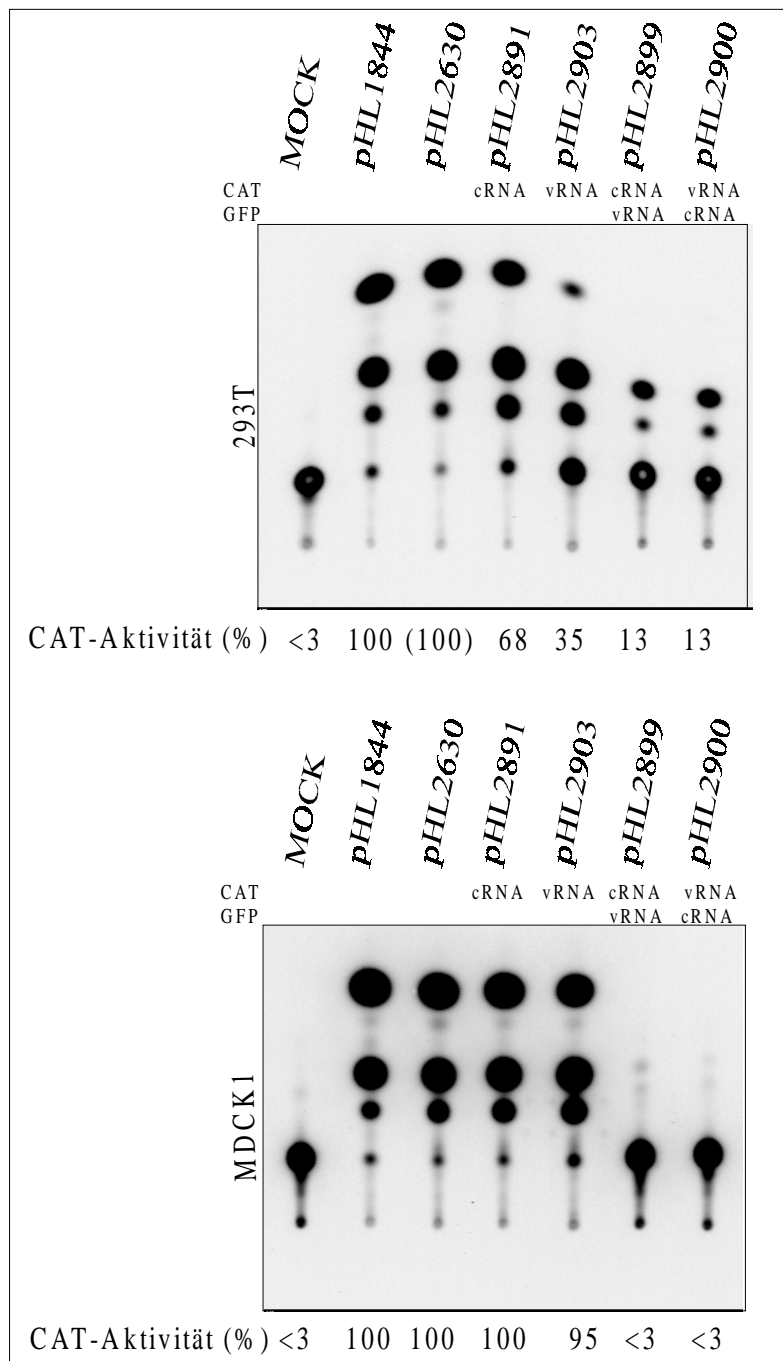


Abb. 3.39: CAT-Analyse der *ambisense* Konstrukte

Die vRNA in pHL2630 ist 1679 nt lang und wird hier als Kontrolle für die ungefähr gleich lange vRNA bzw. cRNA des *ambisense* Segmentes (pHL2899: 1591 nt, pHL2900: 1613 nt) verwendet. pHL2891 und pHL2903 besitzen nur das CAT-Reportergen zwischen den *ambisense* Promotoren, dabei wird es im ersten Fall von dem cRNA-Promotor, im zweiten Fall von dem vRNA-Promotor transkribiert. pHL2899 und pHL2900 sind *ambisense* Konstrukte mit zwei Reportergenen, CAT und GFP, dabei wird jeweils ein Gen von dem cRNA- und ein Gen von dem vRNA-Promotor aus transkribiert.

In Abbildung 3.39 sind die Ergebnisse der CAT-Analyse der *ambisense* Konstrukte aufgeführt. In allen *ambisense* Konstrukten ließ sich eine CAT-Aktivität nach der primären Infektion nachweisen. Nach der ersten Passage in MDCK-Zellen können bei den *ambisense* Konstrukten pHL2899 und pHL2900 keine CAT-Signale detektiert werden. Bei den *ambisense* Kontrollkonstrukten pHL2891 und pHL2903 haben sich die CAT-Signale verstärkt. pHL2630, dessen vRNA-Segment fast gleich lang ist wie das eines *ambisense* Konstruktes zeigt nach der Passage ebenfalls eine Steigerung der CAT-Expression.

Ähnlich wie bei dem cRNA-Klon pHL2721 (vgl. 3.5.1) scheint es sich hier um ein Verpackungsproblem dieser *ambisense* Moleküle zu handeln. Daher wurden mit PCR und Oligonukleotid-gesteuerter Mutagenese weitere *ambisense* Konstrukte aufgebaut, die auf pHL2899 basieren. Es handelt sich dabei um die Verkürzung der nichtkodierenden Sequenz zwischen dem Promotor und dem Reporter gen der *ambisense* Konstrukte, verbunden mit dem Entfernen von *SphI*-Schnittstellen oder der Variation zwischen 5 und 6 Uridinresten an der Polyadenylierungsstelle. Tabelle 3.3 zeigt die verschiedenen *ambisense* Konstrukte, die auf pHL2899 basieren.

Tabelle 3.3: Elemente der 3'-Sequenzvariation der verschiedenen *ambisense* Konstrukte

Die Konstrukte unterscheiden sich an den 3'-Enden durch Sequenzverkürzung sowie durch Präsenz der *SphI*-Schnittstelle bzw. der eingefügten 5 oder 6 Uridinreste.

Promotorenden	cRNA → CAT	vRNA → CAT	cRNA → CAT vRNA → GFP	cRNA → GFP vRNA → CAT
5': 6U 3': 5U PA	pHL2891	pHL2903	pHL2899	pHL2900
Verkürzung des 3'-Endes	pHL2891	pHL2903	pHL2932	pHL2933
5': 6U 3': 6U	pHL2954	pHL2959	pHL2958	pHL2960
5': 6U 3': 6U (- <i>SphI</i>)	pHL2957		pHL2989	
5': 6U 3': 5U (- <i>SphI</i>)	pHL2992			

3.6.1.1 vRNA- und cRNA-Promotoraktivität im 1104-*ambisense* Promotorsystem

Die CAT-Aktivität der *in vivo* analysierten Konstrukte pHL2583 (1104-analoges cRNA-Konstrukt) und pHL1844 (1104 vRNA-Konstrukt) beweist eine geringere Aktivität des cRNA-Promotors gegenüber dem vRNA-Promotor (Abb. 3.14 u.a.). Die *ambisense* Konstrukte zeigen ähnliche Verhältnisse bezüglich ihres durch den cRNA-Promotor bzw. den vRNA-Promotor exprimierten CAT-Gens (Abb. 3.39). Um dieses Verhältnis zugunsten des cRNA-Promotors zu verbessern, wurden einige Modifikationen am 3'-Ende der Konstrukte pHL2891 und pHL2903 durchgeführt (Tabelle 3.3). In diesen Konstrukten wird das CAT-Reportergen zwischen den Promotorenden eines *ambisense* Konstruktes, sowohl in positiver (pHL2903), als auch in negativer Orientierung (pHL2981) eingebaut. Im ersten Fall wird die Transkription des monocistronischen CAT-RNA-Segmentes von dem vRNA-Promotor, im zweiten Fall von dem cRNA-Promotor eingeleitet. Die CAT-Expression lässt sich aus Abbildung 3.40 entnehmen.

Generell hat sich die CAT-Aktivität der abgeänderten monocistronischen cRNA-*ambisense* Kontrollkonstrukte nicht erhöht, die des abgewandelten monocistronischen vRNA-*ambisense* Kontrollkonstruktes hat sich leicht erhöht. Die CAT-Analyse der ersten Passage zeigt jedoch, dass die gebildeten Fremdsegmente von dem Influenza A-Virus verpackt werden.

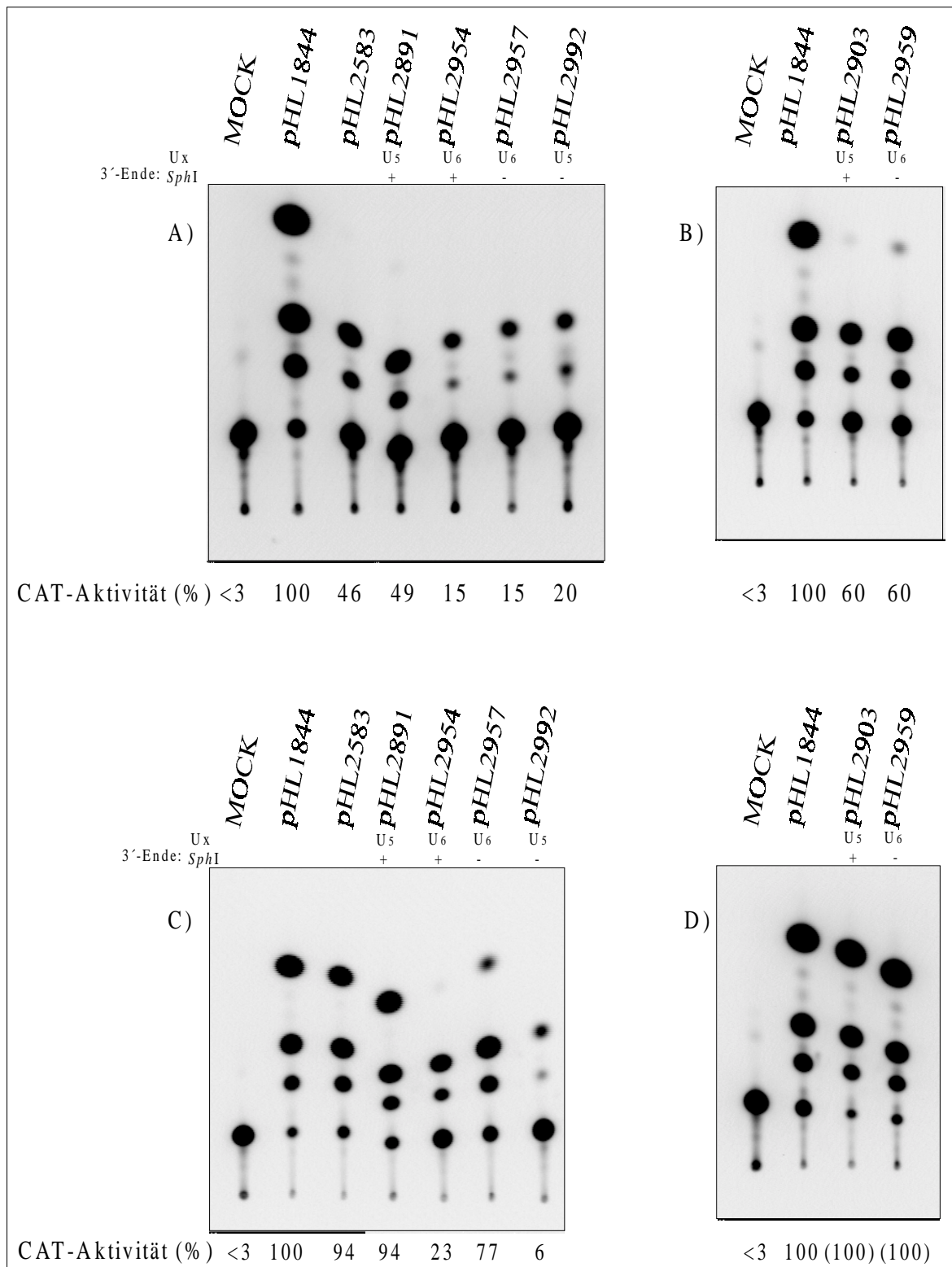


Abb. 3.40: CAT-Analyse der cRNA- und vRNA-Expression im *ambisense* Promotorsystem

Die entsprechenden Konstrukte werden charakterisiert durch die Anzahl der Uridinreste und durch die *SphI*-Schnittstelle [vorhanden (+)/ entfernt (-)].

A) CAT-Analyse des cRNA-CAT nach Transfektion und primärer Infektion in 293T-Zellen, C) nach der ersten Passage in MDCK-Zellen. B) CAT-Analyse des vRNA-CAT nach Transfektion und primärer Infektion, D) nach der ersten Passage.

3.6.1.2 CAT-Aktivität des cRNA- und vRNA-Promotors in den CAT-GFP-*ambisense* Konstrukten

Die zuerst aufgebauten CAT-GFP *ambisense* Konstrukte weisen nur nach der primären Infektion in 293T-Zellen CAT-Signale auf, die nach der ersten Passage in MDCK-Zellen nicht mehr auftreten (Abbildung 3.40). Das Problem liegt vermutlich in der Sequenz der 3'-Enden dieser bicistronischen RNA-Segmente. Folglich wurden sie gegenüber pHL2899 und pHL2900 modifiziert (Tabelle 3.3). Ziel dieser Modifikationen ist es, die Verpackung der CAT-GFP *ambisense* Segmente (bicistronische RNA-Segmente) zu ermöglichen. Bei dem pHL2899-Konstrukt wird die CAT-Transkription von dem cRNA-Promotor, bei pHL2900 von dem vRNA-Promotor aus eingeleitet. Die GFP-Transkription wird jeweils von dem anderen Promotor aus gestartet (siehe 3.6.3).

Nur bei pHL2960 (abgeleitet von pHL2900) führt die eingebrachte Modifikation zu einem positiven Ergebnis (Abb. 3.41). Dieses Konstrukt zeigt nach der primären Infektion eine CAT-Expression, die durch die Passage in MDCK-Zellen verstärkt wird. Von den modifizierten pHL2899-Konstrukten lässt sich nur bei pHL2989 ein CAT-Signal nachweisen, das nach der ersten Passage verschwindet (Abb. 3.42).

Im allgemeinen ist die Aktivität des vRNA-Promotors stärker als die des cRNA-Promotors, so dass letztere leichter von störenden Faktoren beeinflusst werden kann. Solche Faktoren können überflüssige, nicht viruseigene Sequenzen oder andere, im Verlauf des Infektionszyklus auftretende Faktoren sein.

Bei der *ambisense* Gen-Transkription entstehen zueinander komplementäre RNA-Moleküle, mRNA1 und mRNA2, die eventuell Dimere bilden und dadurch ihre eigene Translation bzw. Expression verhindern können. Um dies zu verhindern, kann die in den 3'-Hälften beider mRNA-Moleküle gelegene *ambisense* Sequenz des hier nicht transkribierbaren Gens herausgespleißt werden. In einem einfachen Spleißsystem, das aus Spleißvektor und Spleißdonor besteht, wird bei pHL2899 und pHL2960 in einer Oligonukleotid-gesteuerten Mutagenese ein Spleißakzeptor in inverser Sequenz vor das CAT-Reportergen und ein Spleißdonor, ebenfalls in inverser Sequenz, nach dem CAT-Reportergen (zwischen CAT und GFP) eingebaut (Abb. 3.41). Dann wird im Verlauf der Infektion das CAT-Gen aus denjenigen mRNA-Molekülen herausgespleißt, in denen es in distaler Position in „antisense“ Orientierung vorliegt.

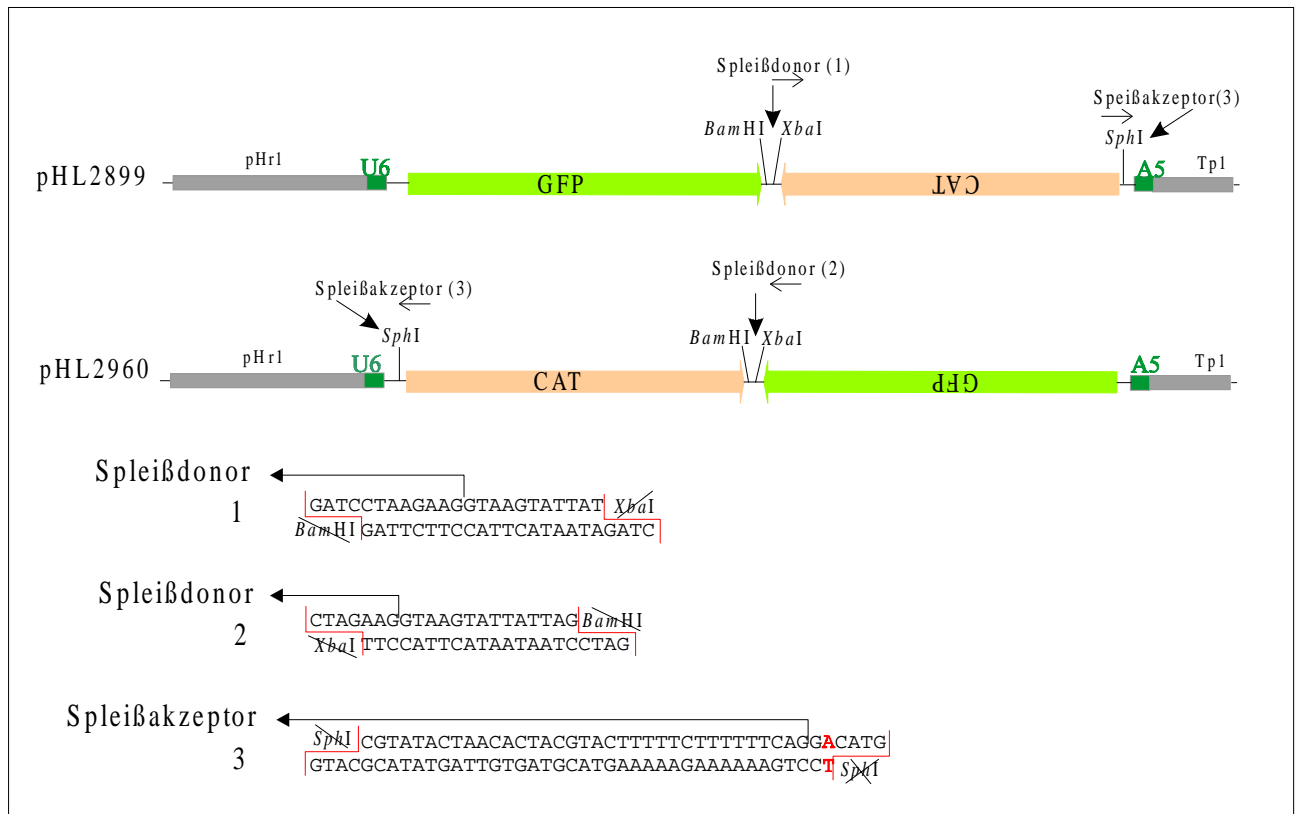


Abb. 3.41: Aufbau von *ambisense* Konstrukten mit einem einfachen Spleißsystem

Die Oligonukleotide, die die Spleißdonor und Spleißakzeptorsignale enthalten, werden in die entsprechend gespaltenen *ambisense* Plasmide in zwei Schritten einligiert. *SphI* soll darauf hinweisen, dass durch die Punktmutation (C→A) in der Erkennungssequenz für *SphI*, diese Schnittstelle nach der Ligation verloren geht.

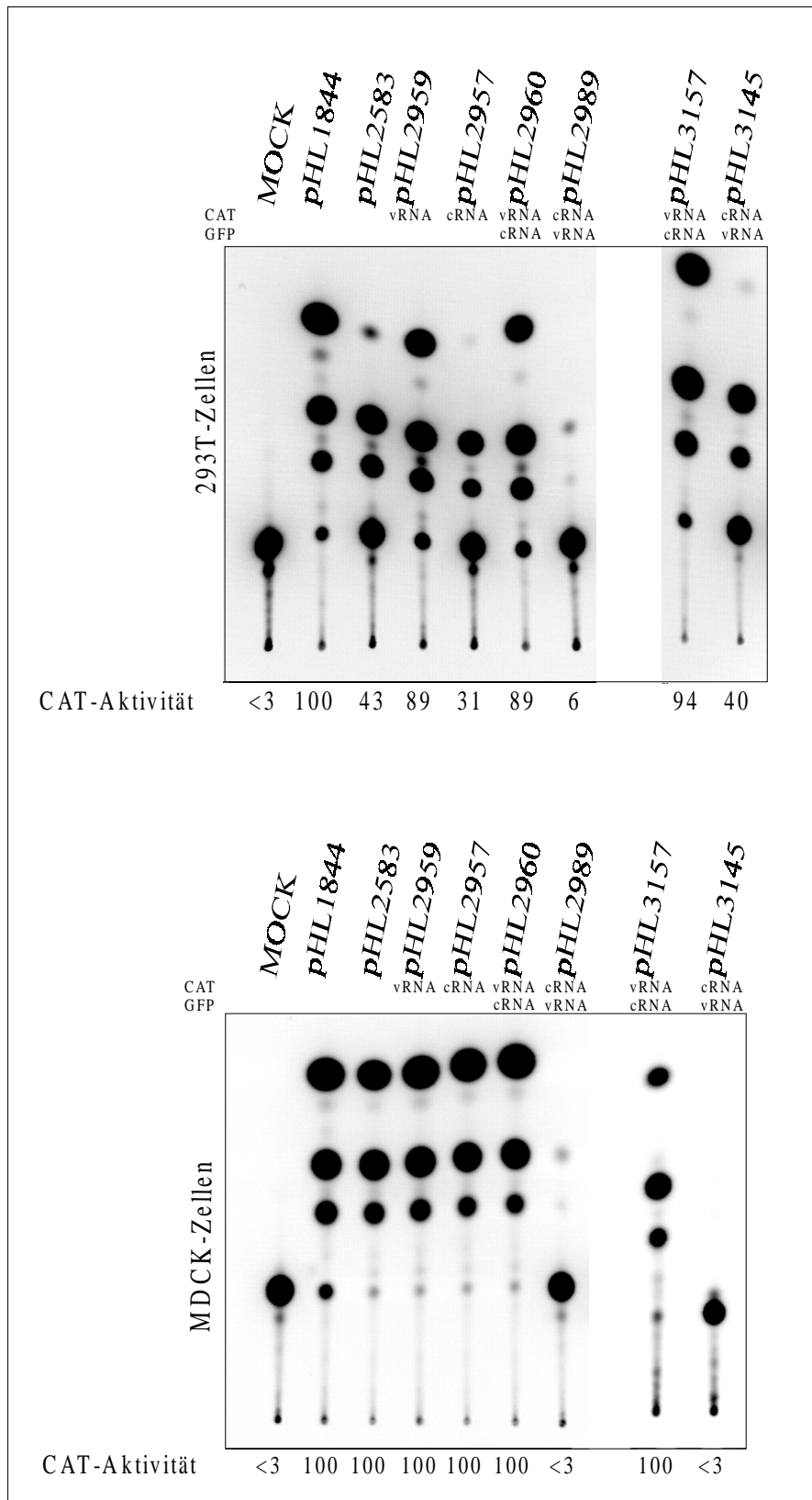


Abb. 3.42: CAT-Analyse der neu abgeleiteten *ambisense* Konstrukte (vgl. Abb. 3.39)

PHL2957 und PHL2959 sind die monocistronischen cRNA und vRNA *ambisense* Kontrollkonstrukte. Bei den *ambisense* Konstrukten PHL2960 und PHL3157 wird die CAT-Gentranskription von dem vRNA-Promotor, bei PHL2989 und PHL3145 von dem cRNA-Promotor eingeleitet. Die *ambisense* Konstrukte PHL3145 und PHL3157 sind mit dem einfachen Spleißsystem versehen.

3.6.2 Variation in der Promotorregion von *ambisense* Konstrukten

Bei den Plasmiden pHL2899, pHL2900 und den daraus abgeleiteten Konstrukten entsteht nach der Transfektion durch die zelluläre RNA-Polymerase I eine *ambisense* cRNA, während die vRNA erst nach der Infektion durch die virale RNA-Polymerase gebildet wird (siehe Abbildung 3.37). Wird das *ambisense* Konstrukt umgekehrt eingesetzt, indem die 3'- und 5'-Promotorabschnitte ihre Positionen vertauschen (Abb. 3.43B), wird als erstes nach der Transfektion die vRNA transkribiert, die cRNA aber erst durch Replikation nach der Infektion gebildet. In einer PCR gesteuerten Mutagenese mit den Konstrukten pHL2989 und pHL2960 als Matrize und mit geeigneten Startermolekülen⁹, gefolgt von der anschließenden Klonierung des entstandenen Fragmentes, resultieren die Konstrukte pHL3106 und pHL3107, so dass die Promotorsequenzen der 3' und 5' Enden einander ersetzen. Das *ambisense* Gen des pHL3106 ist analog zu pHL2989 aufgebaut und das des pHL3107 analog zu pHL2960.

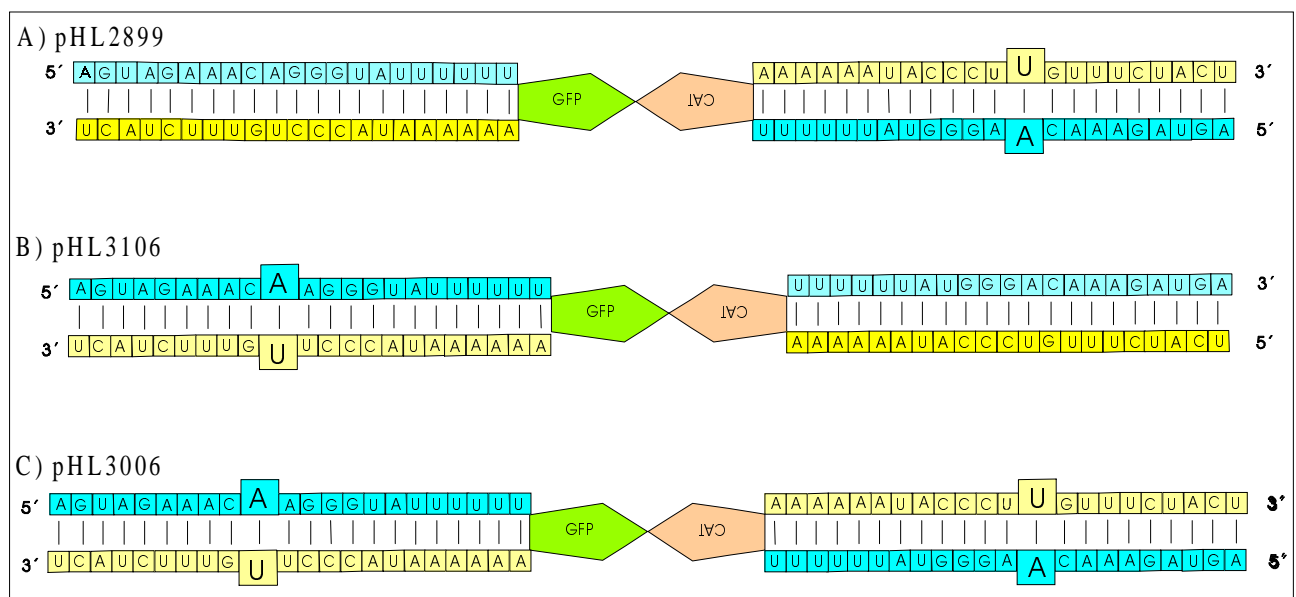


Abb. 3.43: Schematische Darstellung der *ambisense* Promotoren

A) *ambisense* Promotor des Konstruktes pHL2899 und von dessen Derivaten, nach Transfektion dieser Plasmide in 293T-Zellen entsteht als RNA Polymerase I-Transkript die cRNA, B) *ambisense* Promotor des pHL3106 und des pHL3107; nach Transfektion in 293T-Zellen entsteht hier die vRNA, C) *ambisense* Promotor mit aufgehobenem Winkel, aus der gebildeten RNA nach Transfektion des pHL3006 sollten beide Reportergene GFP und CAT gleichermaßen transkribiert werden.

⁹ 5'-ambi Inversion: 5'-AATACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTTTATAC-3'

3'-ambi Inversion: 5'-AATACGTCTCCGGGAGTAGAAACAGGGTATTTTTTGCAT-3'

Die CAT-Analyse der *ambisense* Konstrukte mit den *ambisense* Promotorvarianten ist in Abbildung 3.44 dargestellt.

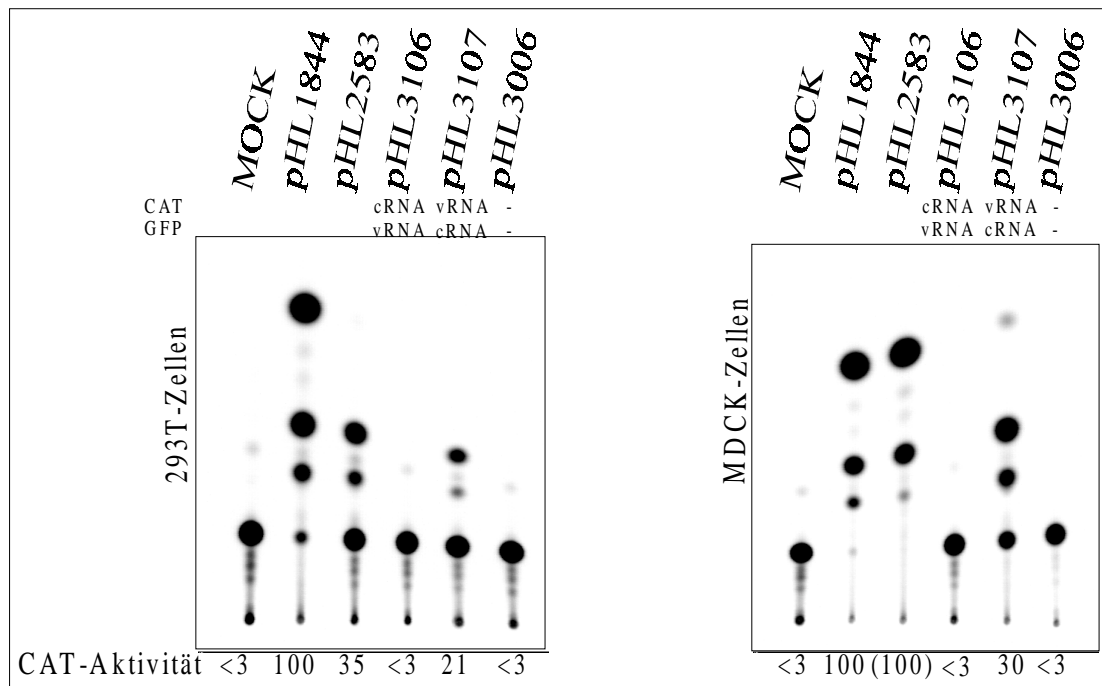


Abb. 3.44: CAT-Analyse der *ambisense* -Konstruktvarianten

Das CAT-Reportergen in pHL3106 wird von dem cRNA-Promotor aus transkribiert, in pHL3107 von dem vRNA-Promotor, bei pHL3006 werden beide Reportergene von einem gleichem winkelfreien Promotor aus transkribiert.

Die CAT-Aktivitäten der *ambisense* Konstruktvarianten pHL3106 und pHL3006 sind im allgemeinen geringer als die der pHL2899-Derivate (Abb. 3.42). Der cRNA-Promotor des pHL3106 zeigt keine CAT-Aktivität. Im Vergleich zu den Konstrukten pHL2960 und pHL3157 ist die CAT-Aktivität des vRNA-Promotors hier schwächer (Abb. 3.42). D.h. der Aufbau des *ambisense* Konstruktes pHL2899, bei dem die cRNA zuerst gebildet wird, führt zu einer ausgeglicheneren Expression beider Reportergene, als bei der vRNA-Transkription durch die RNA-Polymerase I, wie das bei pHL3106 der Fall ist. Die *ambisense* Konstrukte mit dem aufgehobenen Promotor-Winkel zeigen keine CAT-Signale, obwohl der gleiche Promotor in dem einfachen Polymerase I-Transkriptionssystem eine CAT-Aktivität aufweist (Flick, 1998).

3.6.3 GFP-Expression der *ambisense* Segmente

Bei den *ambisense* Konstrukten wird das CAT-Reportergen von dem einen der beiden Promotoren (vRNA- oder cRNA-), das GFP-Reportergen von dem anderen transkribiert. Bei dem pHL2899-Konstrukt und seinen Derivaten wird die Transkription des CAT-Reportergens von dem cRNA-Promotor eingeleitet, die des GFP-Reportergens von dem vRNA-Promotor. Neben der CAT-Expression lässt sich hier auch die GFP-Expression beobachten und verfolgen. Bei dem pHL2900-Konstrukt und seinen Derivaten wird die CAT-Transkription dagegen von dem vRNA-Promotor eingeleitet und die GFP-Transkription von dem schwächeren cRNA-Promotor. In diesem Fall lässt sich die GFP-Expression nicht durch die Grün-Fluoreszenz der Zellen nachweisen. Die zugehörige CAT-Expression ist bereits in dem Abschnitt 3.6.2 dargestellt.

Die GFP-Expression lässt sich damit nur dann direkt beobachten, wenn sie durch den vRNA-Promotor des *ambisense* Konstruktes eingeleitet wird. Dies ist aus den Ergebnissen der CAT-Analyse zu erwarten, denn auch die cRNA-CAT-Expression ist wesentlich niedriger, als die des vRNA-Promotors. Zudem ist zu beachten, dass der CAT-Enzymtest viel sensibler ist als die mikroskopische Darstellung des grün-fluoreszierenden Proteins.

Die GFP-Expression der *ambisense* Konstrukte pHL2989 und pHL3145 ist in Abbildung 3.45 dargestellt. pHL2251 dient als positive Kontrolle der GFP-Expression (Abb. 3.46). Die GFP-Expression der Konstrukte pHL2989 und pHL3145 lässt sich sowohl nach der primären Infektion in 293T-Zellen, als auch nach der ersten Passage in MDCK-Zellen beobachten. Die Anzahl der grün-fluoreszierenden 293T- bzw. MDCK-Zellen der Konstrukte pHL2989 und pHL3145 ist geringer als bei der positiven Kontrolle pHL2251. Dies entspricht den Ergebnissen der Versuche zur Verlängerung der vRNA-Moleküle. Diese Versuche (siehe 3.2) zeigen, dass die Transkription der vRNA durch die virale RNA-Polymerase längenabhängig ist; je länger das vRNA-Fremdsegment ist, um so schwächer ist seine Transkription. In den *ambisense* Konstrukten pHL2989 und pHL3145 beträgt die Gesamtlänge der cRNA ungefähr 1600 Nukleotide, in der GFP-Kontrolle pHL2251 dagegen nur 800. Darüberhinaus kommt es durch Ausbildung eines U5/A5-Doppelstranges im distalen Promotor-Bereich zur Verzögerung der Transkription, da der Doppelstrang erst gelöst werden muss, damit die virale RNA-Polymerase entlang des *ambisense* Segmentes wandern kann.

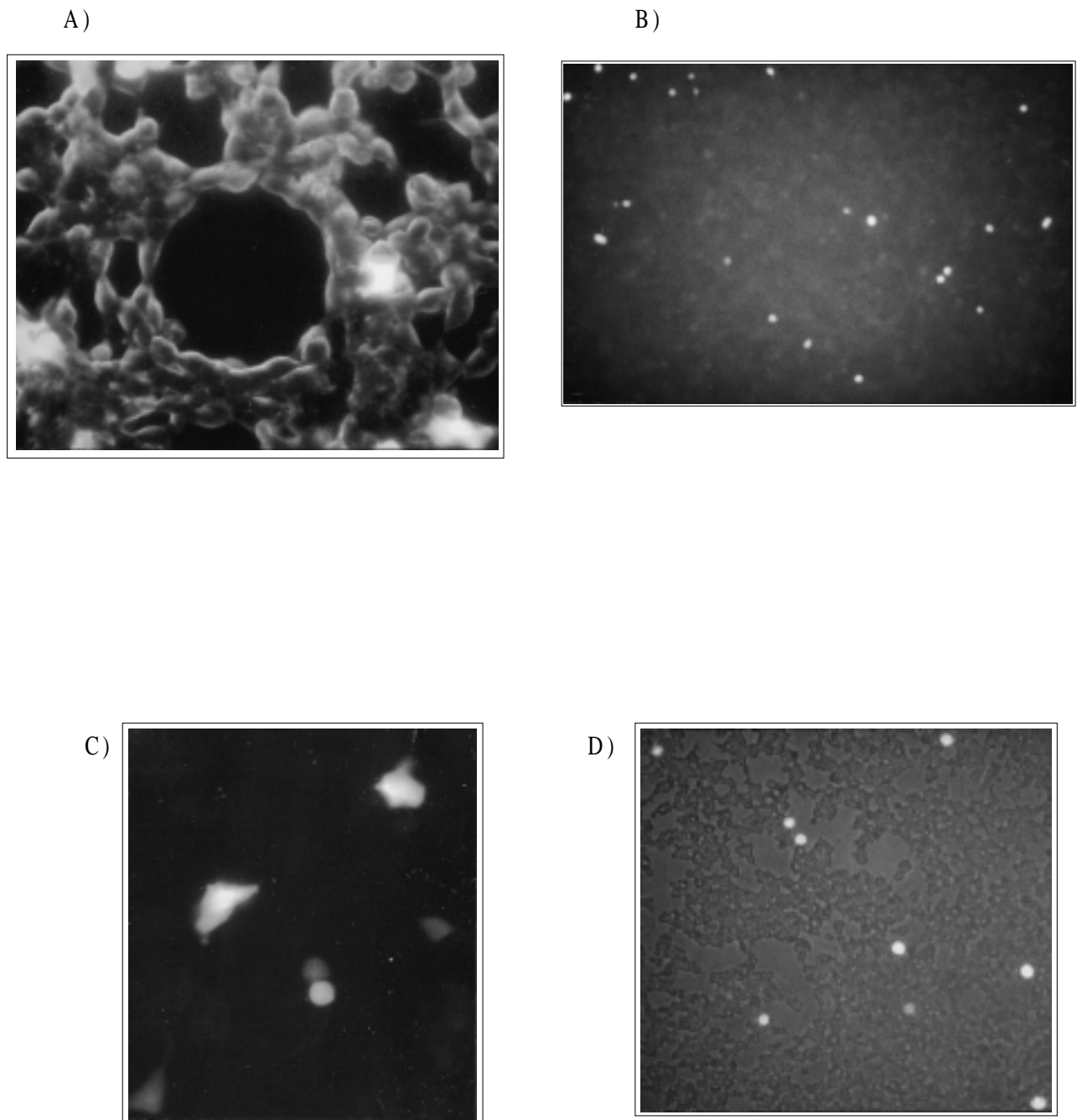


Abb. 3.45: GFP-Analyse der *ambisense* Konstrukte pHL2989 und pHL3145

A) GFP-Expression 26 h nach Transfektion mit pHL2989 und 12 h nach der primären Infektion in 293T-Zellen und B) 10 h nach Passage in MDCK-Zellen. C) GFP-Expression 26 h nach Transfektion mit pHL3145 und 12 h nach der primären Infektion in 293T-Zellen und D) 10 h nach Passage in MDCK-Zellen.

3.7 GFP-Expression: Transfektionskontrolle

Zur schnellen Überprüfung der Transfektionseffizienz wird parallel zu den zu testenden Konstrukten pHL2251 transfiziert. Es handelt sich dabei um ein Konstrukt mit der Polymerase I-Transkriptionseinheit und einem vRNA-Segment, bei dem das GFP-Reportergen (740 nt) die kodierende Region des HA-Segmentes ersetzt. Nach der Transfektion und anschließenden Infektion wird mit Hilfe der viralen RNA-Polymerase das GFP-Gen unter der Kontrolle des vRNA-Promotors transkribiert. Bereits nach 6 h lassen sich grün fluoreszierende Zellen beobachten. Die Inkubationszeit nach der Infektion richtet sich nach den zu testenden Plasmiden (8-12 h). Mit Hilfe dieser GFP-Expression im parallelen Kontrollansatz kann der Verlauf einer Transfektion anders als bei der nachträglichen CAT-Analyse sehr schnell beurteilt werden.

In Abbildung 3.46 sind Aufnahmen von GFP-exprimierenden 293T- und MDCK-Zellen des pHL2251-Konstruktes dargestellt. Nach der primären Infektion fluoreszieren ca. 20-30 % der 293T-Zellen grün, die Anzahl der fluoreszierenden MDCK-Zellen erhöht sich in der Passage auf 35-45%. Dies steigt bis zur zweiten Passage weiter an und fällt in der dritten analog zu der positiven CAT-Analyse ab (Daten nicht gezeigt).

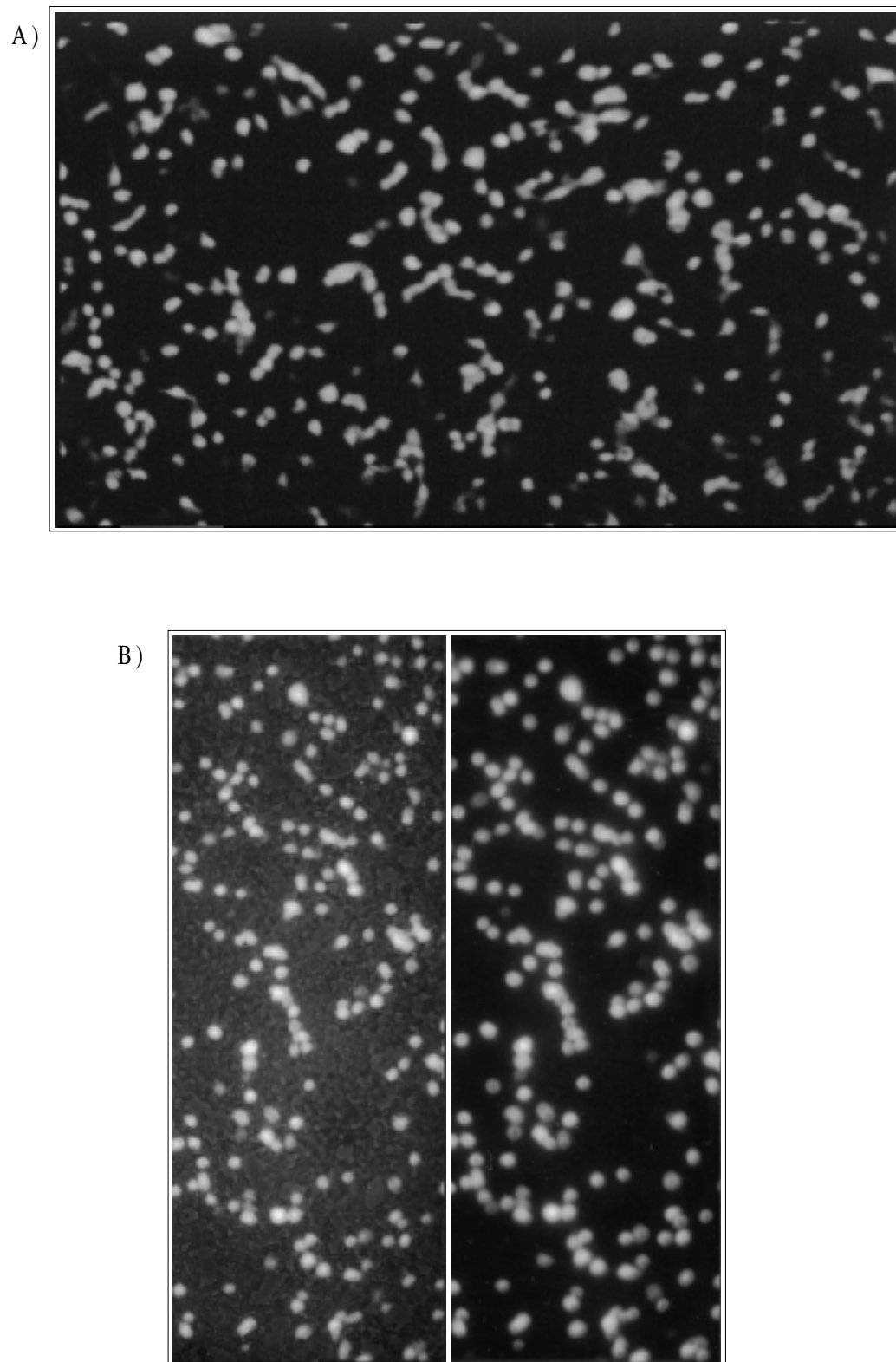


Abb. 3.46: GFP-Analyse des pHL2251-Konstruktes

A) CAT-Expression 20 h nach Transfektion und 8 h nach Infektion in 293T-Zellen, B) GFP-Expression 10 h nach der Passage in MDCK-Zellen.

3.8 Einfluss der Konzentration des Nukleoproteins (NP) auf die Transkription und Replikation von Influenza A-Segmenten

NP ist für das Umschalten von der mRNA-Synthese (Transkription) zur cRNA-Synthese (Replikation) verantwortlich. In der frühen Phase der Influenza A-Infektion sind neben den NP-Molekülen in den vRNP-Komplexen sehr wenig freie NP-Moleküle vorhanden, der Polymerasekomplex bleibt an das 5'-Ende der vRNA gebunden, so dass es nicht möglich ist, die gesamte Länge der vRNA in mRNA zu transkribieren. In der späten Phase der Infektion liegt dagegen eine höhere Konzentration an neugebildeten freien NP-Molekülen vor, die jetzt als „Antiterminator“ fungieren, indem sie die virale RNA-Polymerase von ihrer Bindestelle verdrängen und die Transkription bis zum letzten vRNA-Nukleotid fortschreiten kann. So entsteht die cRNA, die wiederum zur vRNA repliziert. Diese Abhängigkeit der Transkription und Replikation von der NP-Konzentration wird hier sowohl bei der vRNA als auch bei der cRNA mit Hilfe der Booster-Plasmide getestet.

Werden die Booster-Plasmide gleichzeitig mit einem Konstrukt kotransfiziert, können die nach der Transfektion exprimierte Polymerase-Untereinheiten und das NP das mit Hilfe der zellulären RNA-Polymerase entstandene cRNA- bzw. vRNA-Segment transkribieren bzw. replizieren (amplifizieren). Um die Abhängigkeit der Transkription bzw. Replikation der Influenza A-Segmente von der NP-Konzentration zu überprüfen, werden die Zellen nach der Kotransfektion nicht infiziert. Das Booster-Plasmid, das für NP kodiert, wird in unterschiedlichen Konzentrationen (0,001-2 µg) zugegeben, die Konzentrationen der restlichen Booster-Plasmide, die für die Polymerase-Untereinheiten PB1, PB2 und PA kodieren, werden konstant bei 1 µg gehalten. In dieser Versuchsreihe werden neben der vRNA- auch cRNA-Konstrukte und *ambisense* Konstrukte getestet.

3.8.1 Einfluss der Konzentration des Nukleoproteins (NP) auf die Transkription und Replikation von cRNA-Konstrukten

Der Einfluss der NP-Konzentration auf die Amplifikation der 1104-Promotor-Konstrukte pHL1844 (1104-vRNA), pHL2583 (1104-cRNA) und die Promotorvarianten im distalen Element des cRNA-Promotors wird analysiert. Das Ergebnis der CAT-Analyse ist in Abbildung 3.47 dargestellt.

Die CAT-Expression des pHL1844-Konstruktes ist schon bei 1 µg NP-Plasmid so hoch wie nach einer Infektion, die des cRNA-Konstrukts pHL2583 ist bei der gleichen NP-Konzentration schwach, bei den cRNA-Promotorvarianten mit Einzelsubstitution am 5'- (Position 11) bzw. am 3'-Ende (Position $\bar{12}$) gleich schwach bzw. schwächer als bei der 1104-cRNA-Promotorvariante. Das Konstrukt pHL3132 mit der kompensierenden Doppelsubstitution (C $\bar{12}$ /G 11→U $\bar{12}$ /A 11) führt zu einer vergleichsweise hohen CAT-Aktivität, die sich durch Zugabe von 0,5 µg oder 0,25 µg NP-Plasmid kaum ändert.

Generell scheint der Einfluss der Konzentration des NP-Plasmids bei Transkription oder Replikation der cRNA schwächer zu sein als bei vRNA.

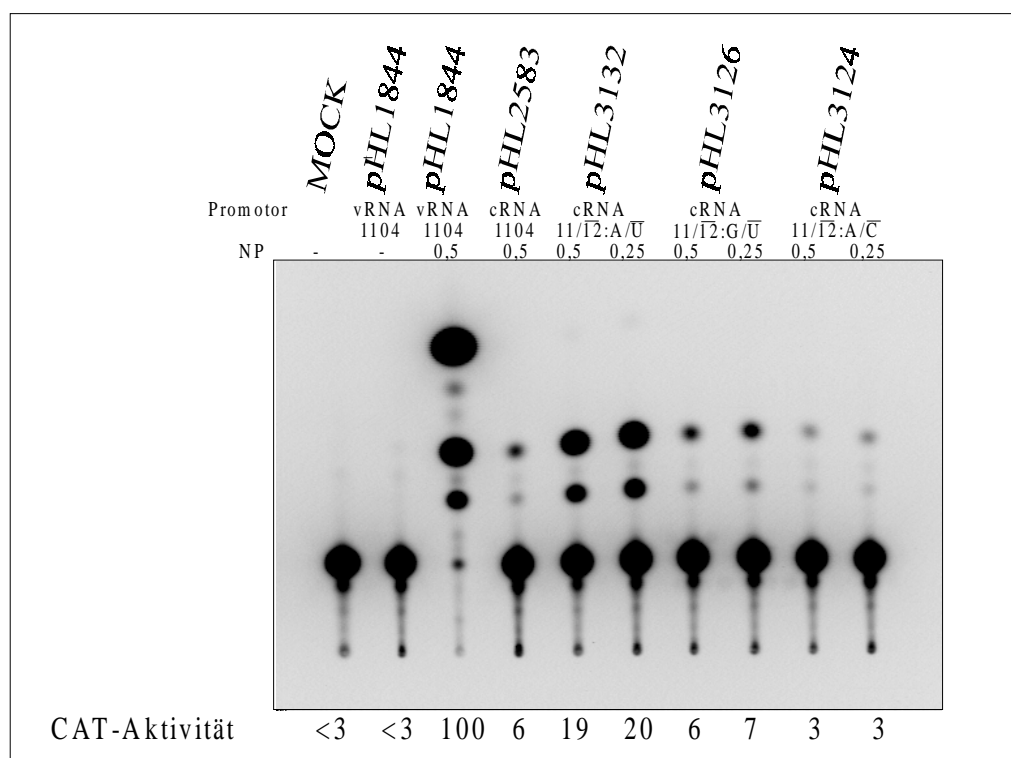


Abb. 3.47: Abhängigkeit der cRNA-CAT-Expression von der NP-Konzentration

Die CAT-Analyse erfolgt 30 h nach Transfektion in 293T-Zellen. Wo die NP-Konzentration nicht angegeben ist, werden Booster-Plasmide ohne das NP-Plasmid mit den zu testenden Konstrukten kotransfiziert.

3.8.2 Einfluss der NP-Konzentration auf die Transkription und Replikation der *ambisense* Segmente

Der Einfluss der NP-Konzentration auf die Transkription und Replikation von vRNA- und cRNA-Segmenten in den *ambisense* Konstrukten pHL2960 und pHL2989 wird gleichzeitig untersucht.

CAT-Analyse und GFP-Bilder bestätigen das Ergebnis von 3.9.1. Es lässt sich bei der cRNA keine Konzentrationsabhängigkeit beobachten (Abb. 3.48 und 3.49). Sowohl die detektierte CAT- als auch die GFP-Expression wird von dem vRNA-Promotor des *ambisense* Konstruktes eingeleitet. Die Anzahl der grün-fluoreszierenden Zellen nach Transfektion des pHL2989-Konstruktes, bei dem die GFP-Transkription durch den vRNA-Promotor gesteuert wird, ist unter diesen Bedingungen deutlich höher als nach Transfektion ohne Booster-Plasmide, aber mit Infektion. Hier werden die durch die kotransfizierten Booster-Plasmide synthetisierten Proteine der Polymerase-Untereinheiten und NP schnell zur Verfügung gestellt und können die Transkription bzw. Replikation gleich nach Transfektion einleiten.

Als Kontrolle wurde das *ambisense* Kontrollkonstrukt pHL2959 mit dem monocistronischen CAT-Reportergen, dessen Transkription von dem vRNA-Promotor eingeleitet wird, bezüglich der Abhängigkeit von Transkription und Replikation von verschiedenen NP-Konzentrationen untersucht (Abb. 3.50). Das analoge Konstrukt pHL2957, bei dem die CAT-Transkription von dem cRNA-Promotor eingeleitet wird, wurde ebenfalls untersucht. Die CAT-Analyse ist jedoch negativ und wird hier nicht dargestellt.

Die CAT-Analyse und GFP-Aufnahmen (Abb. 3.48-3.50) zeigen, dass Transkription und Replikation der von dem vRNA-Promotor gesteuerten Segmente von der Konzentration des NP-Proteins abhängig sind. Die Zugabe von 0,5 µg bzw. 1 µg NP-Plasmid führen zu einer höheren CAT- bzw. GFP-Expression. Die Transkription und Replikation der vom cRNA-Promotor gesteuerten Segmente bleiben bei den unterschiedlichen NP-Konzentrationen unbeeinflusst.

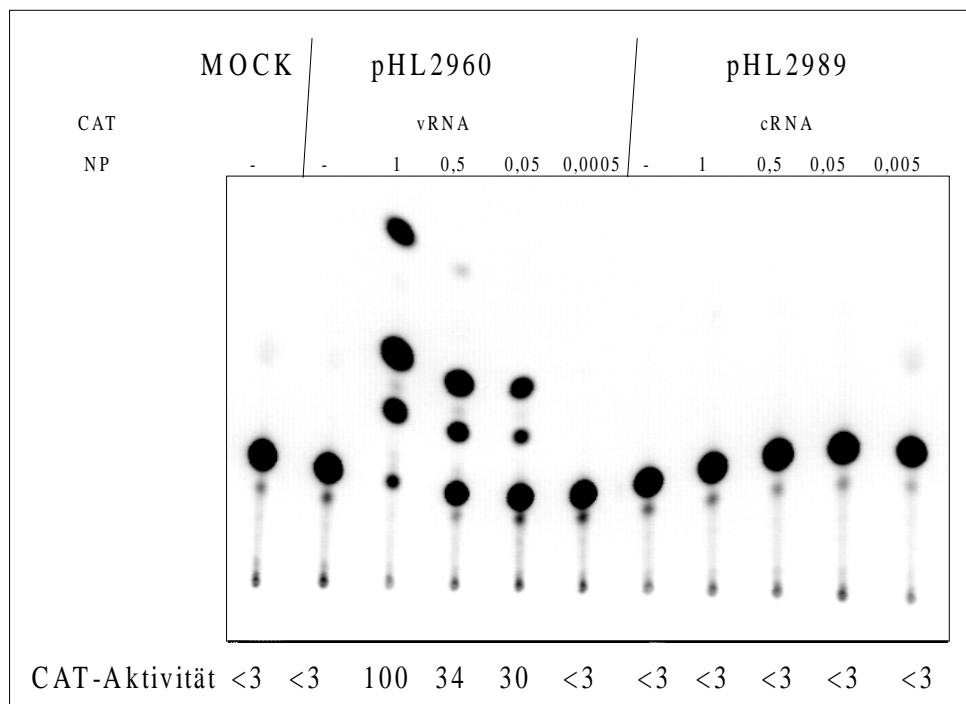


Abb. 3.48: Abhängigkeit der *ambisense* CAT-Expression von der NP-Konzentration

Die CAT-Analyse erfolgt 30 h nach Transfektion in 293T-Zellen. Wo die NP-Konzentration nicht angegeben ist werden die Polymerase Booster-Plasmide ohne das NP-Plasmid mit den zu testenden Konstrukten kotransfiziert.

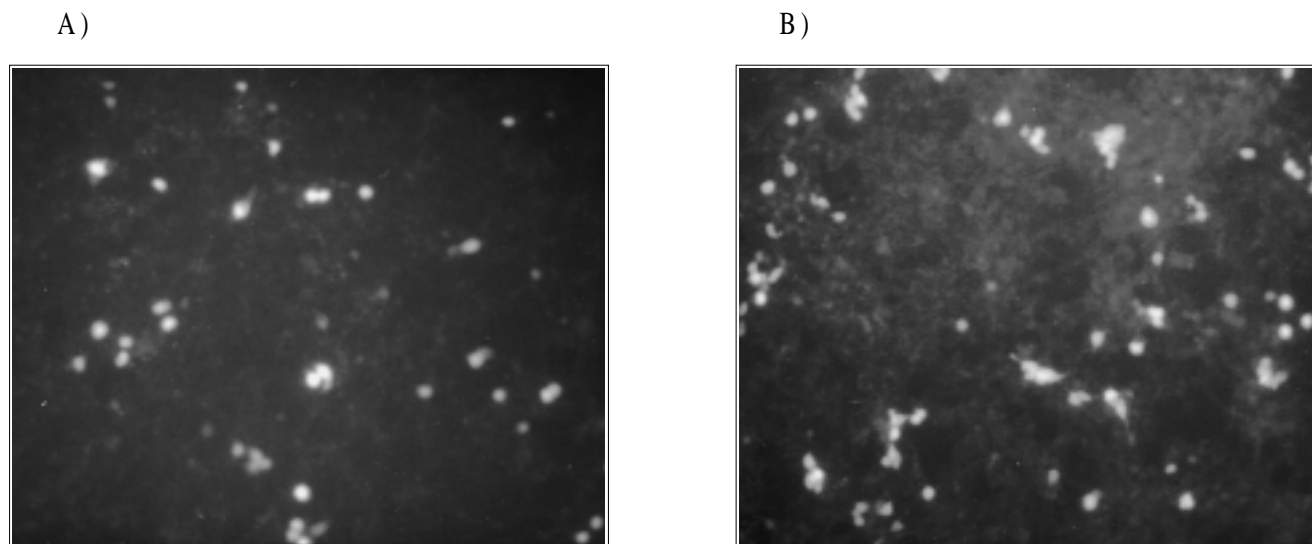


Abb. 3.49: Abhängigkeit der *ambisense* GFP-Expression von der NP-Konzentration

Der Nachweis der GFP-Expression erfolgt 30 h nach Transfektion. A) GFP-Expression nach Kotransfektion von pHL2989 mit den Booster-Plasmiden: je 1 µg, B) GFP-Expression nach Kotransfektion mit pHL2989 mit den Booster-Plasmiden: NP: 0,5 µg; der Rest je 1 µg.

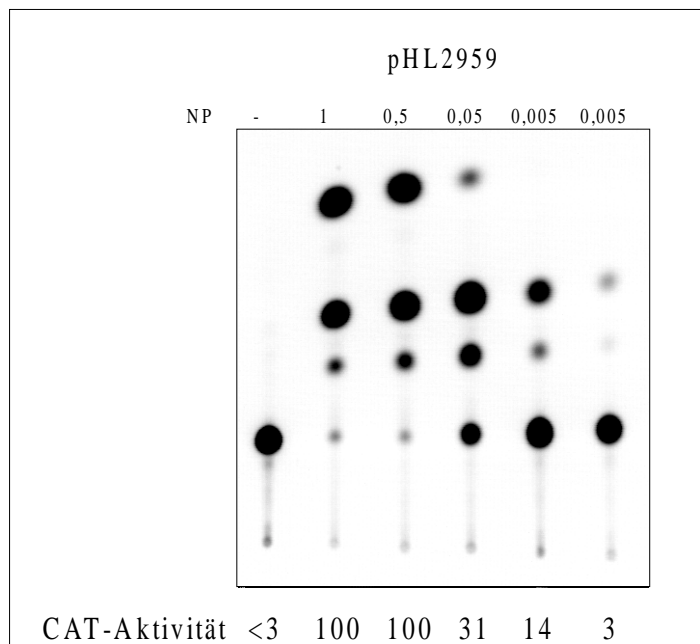


Abb. 3.50: CAT-Expression von pHL2959 mit dem monocistronischen CAT-Reportergen und dem *ambisense* Promotorsystem

Die Abhängigkeit von der NP-Konzentration bei diesem Konstrukt entspricht der des *ambisense* Konstruktes pHL2960 mit den bicistronischen GFP- und CAT-Reportergenen.

4 DISKUSSION

4.1 Einführung

Die Erforschung des Lebenszyklus, den ein Influenza-Virus von der Infektion bis zur Ausknospung durchläuft ist von großer Bedeutung für die Bekämpfung dieses Virus. Kenntnisse über die Transkriptions- und Replikationsmechanismen sind dabei äußerst wichtig und bieten die Möglichkeit, diese Viren an der Akkumulation in der Wirtszelle zu hindern. Transkription und Replikation des Influenza A-Virus laufen im Zellkern der Wirtszelle ab und benötigen sowohl zelluläre als auch virale Faktoren. Bei den viralen Faktoren handelt es sich hauptsächlich um die virale RNA-Polymerase und das NP-Protein. Die virale RNA-Polymerase arbeitet ohne exonukleolytische Einbau-Korrektur und weist daher eine gewisse Fehlerrate auf, die durch Nukleotidsubstitutionen zur Variabilität dieses Virus beiträgt.

Für die Erforschung von Influenza-Viren sind Techniken der Reversen Genetik erforderlich. Mit Hilfe solcher Techniken ist die Analyse der viralen RNA-Segmente durch *in vivo* und *in vitro* Transkriptionssysteme möglich. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das RNA-Polymerase I-Transkriptionssystem, bestehend aus dem humanen rDNA-Promotor und dem murinen Terminator (Neumann *et al.*, 1994; Hoffmann, 1997), verwendet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und die daraus resultierenden Ergebnisse tragen zum Verständnis der viralen RNA-Polymerase in ihrer Interaktion mit der viralen RNA (vRNA) und der komplementären RNA (cRNA) bei. Sie zeigen, dass diese Polymerase in der Lage ist, virale Segmente, die ca. 700-1700 Nukleotide größer sind als das Influenza-eigene größte Segment 1 (2341 nt), zu transkribieren und zu replizieren. Außerdem konnte die aktive virale RNA-Polymerase-gebundene Struktur des komplementären RNA-Promotors analysiert werden. Die neu entdeckte Fähigkeit der viralen RNA-Polymerase, sowohl die cRNA als auch die vRNA zu transkribieren und zu replizieren, kann biotechnisch in einem *ambisense* Transkriptionssystem gegen Influenza selbst bzw. gegen andere Negativstrang-RNA-Viren eingesetzt werden.

4.2 Längenabhängigkeit der Transkription, Replikation und Verpackung von rekombinanten vRNA-Molekülen

Die Transkription und Replikation der viralen RNA wird von der viralen RNA-Polymerase katalysiert. Sowohl in der primären Infektion als auch in der Passage zeigten die auf ca. 3000 bzw. 4000 Nukleotide verlängerten vRNA-Segmente positive CAT-Signale (Abb. 3.4-3.6, Zusammenfassung in Tabelle 4.1), d.h. die virale RNA-Polymerase ist in der Lage, auch derart große Segmente zu transkribieren und zu replizieren.

Tabelle 4.1: Vergleich der CAT-Aktivitäten der verlängerten vRNA-Konstrukte pHL2640 (A) und pHL2651 (B) ohne Kotransfektion bzw. nach Kotransfektion mit allen vier Booster-Plasmiden, oder nur mit NP bzw. mit den Polymerase Untereinheiten.

A)

pHL2640 (vRNA=3110nt)	ohne Kotransfektion	+Booster Plasmide	+ NP	+PB1, PB2, PA
CAT-Aktivität 293T-Zellen	6	79	6	6
CAT-Aktivität MDCK1-Zellen	35	52	32	34

B)

pHL2651 (vRNA=4027nt)	ohne Kotransfektion	+Booster Plasmide	+ NP	+PB1, PB2, PA
CAT-Aktivität 293T-Zellen	3	60	3	3
CAT-Aktivität MDCK1-Zellen	35	48	19	35

Vergleicht man die in Tabelle 4.1 A und B aufgeführten CAT-Aktivitäten, so lässt sich erkennen, dass die Expression der großen Segmente in der primären Infektion ohne Kotransfektion mit den Booster-Plasmiden bzw. nach Kotransfektion nur mit NP oder den Polymerase-Untereinheiten schwach positiv war. In der Passage stieg die Expression dann jedoch auf das 5-10-fache an. Die Kotransfektion mit allen vier Booster-Plasmiden führte bereits in der primären Infektion zu einer 6-8-fachen CAT-Expression im Vergleich zur

Kotransfektion ohne die Booster-Plasmide. Im Gegensatz zu den nicht kotransfizierten oder den mit dem NP oder den Polymerase Untereinheiten kotransfizierten Zellen stieg die CAT-Expression in der Passage nicht stark an, sie war nur ca. 1,5-fach höher. Nach der Transfektion transkribieren und replizieren die durch die Booster-Plasmide gebildeten Proteine ausschließlich die nun als vRNA Segmente vorliegenden Konstrukte, bevor dann die Infektion durchgeführt wird, was zu einer erhöhten CAT-Expression und schließlich zu einer effizienteren Verpackung der Fremdsegmente führt. Während der Passage laufen sowohl die Transkription als auch die Replikation aller viralen Segmente gleichzeitig, d.h ohne zeitliche Vorgabe für das Fragmentsegment ab, abhängig von der viralen RNA-Polymerase und dem NP. Auf dieser Stufe spielt es keine Rolle mehr, ob die Konstrukte mit Booster-Plasmiden kotransfiziert waren oder nicht. Daher gleichen sich die Niveaus der Transkription und der Replikation und damit der Expression der mit Booster-Plasmiden kotransfizierten Konstrukten mit der Expression ohne Kotransfektion bzw. für die der Kotransfektion nur mit NP oder nur mit Polymerase-Untereinheiten einigermaßen aus. Die Transfektion des pHL2640 und seiner optimierten Variante pHL2641 mit dem verbesserten Transfektionsreagens (Lipofektamin-Plus) führte bereits in den primär infizierten 293T-Zellen zu 87% bzw. 95% CAT-Aktivität (relativ zu derjenigen von pHL1844), die in den passagierten Zellen weiter gestiegen ist (Abb. 3.8).

Die positive CAT-Expression in den Zellen der ersten Passage deutet darauf hin, dass diese großen Segmente nicht nur repliziert und transkribiert, sondern auch wie die Virus-eigenen Segmente in die Virionen der Virus-Nachkommenschaft verpackt werden.

Die erfolgreiche CAT-Expression der primären und sekundären Infektion der auf ca. 3000 und 4000 Nukleotide verlängerten Segmente sollte durch das Ersetzen des verlängerten CAT-Segmentes durch das ca. 3000 bp große β -Galaktosidase-Gen nochmals bestätigt werden. Die Expression des β -Galaktosidase-Gens war in den 293T-Zellen der primären Infektion nachweisbar (Abb. 3.10). Das bestätigt, dass die virale RNA-Polymerase die gesamte Länge des großen Segmentes transkribiert und nicht z.B. durch kryptische Spleißsignale den verlängerten Sequenzabschnitt ausspleißt. Allerdings liess sich in den MDCK- und 293T-Zellen der ersten Passage keine β -Gal-Expression nachweisen, und auch die Versuche, das 3'-Ende der nichtkodierenden Region zu verkürzen, führten zu keiner β -Gal-Expression in der Passage. Dass die Verpackung des β -Gal-Gens nicht nachweisbar war, muß nicht unbedingt an der nichtkodierenden Region oder an den viralen Verpackungssignalen liegen. Es ist

möglich, dass die β -Gal-vRNA, aufgrund ihrer Größe Sekundärstrukturen ausbildet, die ihre Verpackung verhindern. Denn selbst auf 4000 Nukleotide verlängerte Segmente wurden verpackt, was anhand der CAT-Expression bewiesen werden konnte.

4.3 Konstruktion der cRNA für die Transkription

Beim Influenza A-Virus lassen sich drei RNA-Typen unterscheiden: Die Negativstrang vRNA, die dazu komplementäre Positivstrang cRNA und die virale mRNA. Bei der Transkription der vRNA wird die mRNA synthetisiert, während die cRNA bei der Replikation der vRNA gebildet wird. Mit Hilfe des RNA-Polymerase I-Transkriptionssystems konnten cRNA-Konstrukte so aufgebaut werden, wie sie im Influenza-Virus vorkommen, komplementär zu der vRNA, so dass das kodierende Gen (CAT) positiv zu den cRNA-Flanken orientiert ist. Die in vivo-Transfektion und anschließende Infektion führte zur CAT-Expression sowohl in den primär infizierten als auch in den passagierten Zellen (Hoffmann, 1997). Ein ähnliches Konstrukt pHL2706 wurde auch hier aufgebaut und zeigte ebenfalls eine CAT-Expression. Das bedeutet, dass nach der Transfektion solcher Konstrukte nun primär die cRNA-Matrize mit Hilfe der RNA-Polymerase I gebildet wird, deren Promotor von der viralen RNA-Polymerase erkannt und gebunden wird, so dass die cRNA zu vRNA repliziert. D.h. diese cRNA wird in der normalen Abfolge als Zwischenprodukt der Replikation erkannt, und dient zuerst als Matrize zur vRNA-Synthese. Die entstandene vRNA wird dann zu mRNA transkribiert, die anschließend die CAT-Expression liefert. Diese Ergebnisse zeigen also, dass die cRNA und cRNA-Promotor analog zu der vRNA mit Hilfe des Polymerase I-Transkriptionssystems untersucht werden kann.

Allerdings muß für die Untersuchung der cRNA bzw. der cRNA-Promotoraktivität als Transkriptions-Matrize folgendes beachtet werden: Wird die cRNA wie sie im Influenza-Virus natürlicherweise vorkommt mit dem CAT-Reportergen nachgebaut (pHL2706), so kann die erhaltene CAT-Expression keine direkte Aussage über die cRNA bzw. deren Promotor geben, da die gebildete cRNA nach der Infektion der transfizierten Zellen nur als Matrize für die vRNA-Synthese dient, die dann zu mRNA transkribiert wird: $[cRNA^{+10} \rightleftharpoons vRNA^- \rightarrow mRNA^+]$. Für die beabsichtigte Analyse des cRNA-Promotors in der Transkription wurden daraufhin die cRNA-Konstrukte so aufgebaut, dass sie sich in drei Elementen von der natürlich vorkommenden cRNA unterscheiden: Erstens ist das kodierende CAT-Gen in inverser Orientierung eingesetzt worden und zweitens wurden 6 Uridinreste neben dem 5'-Promotorende (Position 16-21) der cRNA eingefügt, um die Polyadenylierung und damit die mRNA-Synthese zu ermöglichen, drittens wurden die 5-6 Adeninreste am 3'-Ende der cRNA (Position 17-22), die zu den 5-6 Uridinresten am 5'-Ende (Position 17-22) des vRNA-

¹⁰ Die Zeichen +/- geben die Orientierung des kodierenden Gens in der RNA an

Promotors komplementär sind, entfernt, um eine mögliche Basenpaarung mit den eingefügten Uridinresten am 5'-cRNA-Promotorende zu vermeiden. Aus einer solchen cRNA (pHL2583 und die weiteren cRNA-Promotormutanten) kann eine mRNA synthetisiert werden, die zur CAT translatiert werden kann. Die hier bei der Replikation gebildete vRNA ist nun ein Positivstrang bezogen auf die kodierende Sequenz und kann nicht selbst zur CAT-mRNA transkribiert werden. Somit kann erreicht werden, dass die nachgewiesene CAT-Expression durch die Aktivität des cRNA-Promotors bedingt wird: $vRNA^+ \rightleftharpoons cRNA^- \rightarrow mRNA^+$ (vgl. Fußnote Seite 146).

Tabelle 4.2: CAT-Aktivitäten (%) der cRNA-Konstrukte pHL2583 und pHL2706

Konstrukt Infizierten Zellen	pHL2583	pHL2706
293T-Zellen	10	6
MDCK1	100	100
MDCK2	25	3
MDCK3	18	<3

Vergleicht man das 1104-analoge pHL2583-Konstrukt (CAT in negativer Orientierung, bezogen auf den cRNA-Promotor) mit dem ebenfalls 1104-analogen pHL2706-Konstrukt (CAT in positiver Orientierung), so lässt sich anhand der CAT-Aktivitäten kein großer Unterschied in den primär infizierten Zellen oder in den Zellen der ersten Passage erkennen (Abb. 3.34). In den Zellen der zweiten und dritten Passage sinkt die Aktivität des pHL2583 langsam ab, während sie bei pHL2706 drastisch abklingt (Abb. 3.15 und 3.35). Bei beiden Konstrukten entsteht nach Transfektion in den 293T-Zellen mit Hilfe der zellulären RNA-Polymerase I die cRNA. Nach der FPV-Infektion wird mit Hilfe der viralen RNA-Polymerase aus der cRNA des pHL2706-Konstruktes zuerst die vRNA synthetisiert, die dann zur mRNA transkribiert wird. Im Gegensatz dazu wird die cRNA des pHL2583-Konstruktes in der frühen Infektions-Phase zu mRNA transkribiert, welche die CAT-Expression liefert. Somit stehen aus der zeitlich schlechter koordinierten Transkription und Replikation des pHL2706 weniger vRNA-Moleküle zur Verfügung, die deswegen weniger effizient als die des pHL2583 in die neu gebildeten Virionen verpackt werden.

4.4 Aktivitätsanalyse des cRNA-Promotors in der Transkription

Bei der *in vivo*-Analyse der vRNA zu cRNA-Konzentration wird ein Verhältnis von 10:1 festgestellt (Yamanaka *et al.*, 1991). Das lässt auf eine stärkere Aktivität des cRNA-Promotors für die Replikations-Initiation gegenüber dem vRNA-Promotor schließen. In der *in vitro*-Analyse wurde dagegen gefunden, dass die Aktivität des cRNA-Promotors schwächer ist als die des vRNA-Promotors (Parvin *et al.*, 1989; Seong & Brownlee, 1992a; Pritlov *et al.*, 1995). Vergleicht man die CAT-Aktivitäten der cRNA-Promotor- und vRNA-Promotor-konstrukte, jeweils enthaltend die 1104-Promotormutationen, in den primär infizierten Zellen, so lässt sich auch hier ein Verhältnis von etwa 1:10 (cRNA:vRNA), nachweisen.

In der ersten Passage erreicht die Transkriptions-Aktivität des 1104-cRNA-Promotors (pHL2583) ihr Maximum, in der zweiten Passage nimmt sie langsam ab, während die 1104-vRNA (pHL1844) erst in der dritten Passage ihre maximale Aktivität erreicht (Abb. 3.2 B und Abb. 3.15 B). Im Gegensatz dazu konnte bei den Wildtyp-cRNA- (pHL2708) und -vRNA-Konstrukten (pHL1863) eine CAT-Aktivität nur in den primär transfizierten Zellen nachgewiesen werden. In den Zellen der Passage liess sich keinerlei CAT-Aktivität detektieren. Das liegt daran, dass die 1104-Mutation die virale Transkription und Replikation weit stärker anregt als die Wildtyp-Promotorsequenz, und dadurch liegen sehr viele 1104-vRNA-Moleküle vor, die in die Tochter-Virionen verpackt werden, d.h. der Anteil an rekombinanten Viren, die dieses CAT-Fremdgen tragen, steigt trotz der Gegenselektion an, die alle defekten Viren, d.h. mit unvollständigem Satz an vRNA-Segmenten, eliminiert.

Tabelle 4.3: Wildtyp und 1104-cRNA und vRNA-Konstrukte und ihre Eigenschaften

Eigenschaften Konstrukt	rDNA-Promotor	rDNA- Terminator	c/vRNA- Promortyp	CAT- Orientierung
pHL926	murin	murin	WT-vRNA	negativ
pHL1104	murin	murin	1104-vRNA	negativ
pHL1863	human	murin	WT-vRNA	negativ
pHL1844	human	murin	1104-vRNA	negativ
pHL2583	human	murin	1104-cRNA	negativ
PHL2706	human	murin	1104-cRNA	positiv
pHL2708	human	murin	WT-cRNA	negativ

Die Wildtyp-cRNA (5′: C 3, A 5 und G 8) zeigte 13% CAT-Aktivität (im Vergleich zu 100% CAT-Aktivität des pHL1844, Abb. 3.14) in der primären Infektion gegenüber 55% des 1104-analogen pHL2583. Es ist von Bedeutung, dass eine CAT-Aktivität des WT-cRNA-Promotors bei dem hier optimierten System detektierbar war. Bei dem optimierten System handelt es sich um die chimäre Polymerase I-Transkriptionseinheit mit dem humanen rDNA-Promotor und dem murinen rDNA-Terminator unter optimalen Transfektionsbedingungen: Hoch transfizierbare 293T-Zellen (20-30% Transfektionseffizienz), das Lipofektamin-Plus-Transfektionsreagens, 26 h Transfektionszeit und 12 h Infektionszeit. In der Wildtyp-vRNA in dem Polymerase I-Transkriptionssystem mit dem murinen rDNA-Promotor und -Terminator, B82-Zellen und Lipofektamin-Transfektionsreagens war die nur eine schwache CAT-Aktivität nachweisbar (pHL296: Neumann & Hobom, 1995; Flick *et al.*, 1996). Dagegen zeigte die gleiche vRNA unter den optimierten Bedingungen 30% CAT-Aktivität (pHL1863: Hoffmann, 1997; Abb. 3.1 dieser Arbeit). Tabelle 4.4 faßt die CAT-Aktivitäten der Wildtyp- und 1104-cRNA bzw. vRNA-Konstrukte zusammen.

Tabelle 4.4: CAT-Aktivitäten der cRNA- und vRNA-Konstrukte mit der Wildtyp- und der 1104-Promotorsequenz

Die CAT-Aktivitäten sind aus den Abbildungen 3.1 und 3.14 entnommen worden.

Konstrukt Zellen	pHL1844 (1104-vRNA)	pHL1863 (WT-vRNA)	pHL2583 (1104-cRNA)	pHL2708 (WT-cRNA)
293T-Zellen	100	30	55	13
MDCK1	100	<3	100	<3

4.5 Die aktive Struktur des cRNA-Promotors

Durch zahlreiche gezielte Mutationsanalysen in der vRNA-Promotorregion wurde die aktive Struktur des vRNA-Promotors, die „*corkscrew*“-Konformation, vorgestellt (Flick *et al.*, 1996, 1999a). Wir postulierten, dass die aktive cRNA-Promotorstruktur eine Variante der „*corkscrew*“-Konformation bei der Interaktion mit der viralen RNA-Polymerase eingeht. Um dies nachzuweisen wurden die Nukleotide, die für die Bildung der „*corkscrew*“-Struktur des vRNA-Promotors essentiell sind, auch bei dem cRNA-Promotor entsprechend substituiert. Hier handelt es sich um die Nukleotide des proximalen Elementes in den Positionen 3 und 8 an den 3′ und an den 5′-Enden des vRNA- bzw. cRNA-Promotors, und im distalen Element um diejenigen an Position 11 des 3′-Endes und 12 des 5′-Endes des vRNA-Promotors. Bei dem komplementären cRNA-Promotor handelt es sich bei den letzteren Nukleotiden um die Position 11 des 5′-Endes und 12 des 3′-Endes. Tabelle 4.5 faßt die CAT-Expression der verschiedenen Substitutionen an diesen Positionen zusammen.

Die CAT-Analysen der Mutanten mit Substitutionen an den Positionen 11 des 5′-cRNA-Promotors und 12 des 3′-cRNA-Promotors bestätigen die postulierte „*corkscrew*“-Struktur, da nur die kompensierende A-U-Substitution zu einer CAT-Expression führt. Gleichzeitig bestätigen diese Ergebnisse auch für den cRNA-Promotor erneut, dass im distalen Bereich keine Nukleotidspezifität der viralen RNA-Polymerase vorliegt (Flick *et al.*, 1996).

Die kompensierenden Doppelsubstitutionen an den Positionen $\bar{3}$ und $\bar{8}$ des 3′-cRNA-Promotors führen zur CAT-Expression, ebenso aber auch eine der nichtkompensierenden Basenpaarungen: A-C. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei der Replikation (Amplifikation) die vRNA gebildet wird, die die komplementären U $\bar{3}$ •G $\bar{8}$ -Nukleotide aufweist. Zwischen diesen Basen ist eine schwache Basenpaarung möglich, die zusammen mit der Basenpaarung C $\bar{2}$ -G $\bar{9}$ offenbar ausreichend ist, um die „*corkscrew*“-Struktur zu erhalten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die aktive 3′-cRNA-Struktur eine „*corkscrew*“-Konformation einnimmt. Die vRNA-Promotoranalyse zeigte, dass am 3′-vRNA-Promotor eine Basenspezifität für die Interaktion mit der viralen RNA-Polymerase vorliegt. Es handelt sich um das Nukleotid U $\bar{7}$ (Flick & Hobom, 1999a). Dies ist hier nicht untersucht worden, an dieser Position und möglicherweise an anderen Positionen im einzelsträngigen Tetraloop-Bereich (Nukleotide 4-7) müssten weitere Mutationen getestet werden.

Tabelle 4.5: CAT-Expressionen der verschiedenen cRNA-Promotormutanten

Die CAT-Aktivitäten (%) in den Zellen der ersten Passage sind aus den Abbildungen 3.19, 3.20, 3.22, 3.23 und 3.25 zu entnehmen. Die überstrichenen Nukleotide beziehen sich auf das 3'-Promotorende. Das Zeichen - soll darauf hinweisen, dass keine solche Mutante gebaut bzw. getestet wurde. Bei dem pHL2583 handelt es sich um die 1104-analoge cRNA-Promotormutante, die als positive Kontrolle bei den CAT-Analysen der cRNA-Mutanten diente.

Position Nukleotid-Paar	3 – 8	$\bar{3}$ - $\bar{8}$	11- $\bar{12}$
A-U	<3 pHL3123	100 pHL2583	81 pHL3132
U-A	100 pHL2583	100 pHL3165	-
A-A	<3 pHL3127	<3 pHL3128	-
U-U	<3 pHL3211	-	-
G-C	<3 pHL3210	89 pHL3213	100 pHL2583
C-G	<3 pHL3209	<3 pHL3214	-
G-G	-	-	<3 pHL3217
A-C	<3 pHL3164	66 pHL3161	<3 pHL3124
C-A	<3 pHL3208	-	-
G-U	-	<3 pHL3212	<3 pHL3126
U-G	<3	<3 pHL3162	-

Keine der einfachen Substitutions-Varianten an den Positionen 3 oder 8 am 5'-Ende des cRNA-Promotors führte zu einer CAT-Expression. Überraschenderweise führten selbst die kompensierenden Doppelsubstitutionen A3-U8, G3-C8 und C3-G8 zu keiner nachweisbaren

CAT-Expression, was gegen die „*corkscrew*“-Struktur im 5'-Strang des cRNA-Promotors zu sprechen scheint. Dennoch zeigten die 1104-Mutante pHL2583 und die davon durch Doppelsubstitution abweichende Wildtyp-Sequenz (5': C 3, A 5 und G 8) eine nachweisbare CAT-Aktivität. In der ersten Mutante liegt die Basenpaarung U3-A8 vor, in der zweiten C3-G8, was für deren Basenpaarung und damit für die „*corkscrew*“-Konformation am 5' cRNA-Promotor spricht. Die vRNA-Promotoranalyse hatte gezeigt, dass das G5 am 5'-vRNA-Promotor von der viralen RNA-Polymerase spezifisch erkannt wird, und jeglicher Austausch dieses Nukleotids die CAT-Expression verhindert (Flick & Hobom, 1999a). Dies scheint bei dem cRNA-Promotor nicht zwingend der Fall zu sein, da das WT-Konstrukt mit einem C3-G8 Basenpaar in Kombination mit A5 eine CAT-Aktivität aufweist (13% derjenigen von pHL1844, Tabelle 4.4), gegenüber dem inaktiven pHL2309 (Tabelle 4.5) ebenfalls mit einem C3-G8 Basenpaar, jedoch in Kombination mit G5. Das spricht für eine Bevorzugung von A5 gegenüber G5 in der Interaktion des cRNA-Promotors mit der viralen RNA-Polymerase, jedenfalls bei der Transkriptions-Initiation des cRNA-Promotors. Möglicherweise wird auch noch ein anderes Nukleotid in der 5'-Tetraloop-Schleife spezifisch erkannt, z.B. A4, A6 oder A7. Um dies zu erhärten, müssten weitere Promotormutanten an den Positionen 4-7 des 5'-cRNA-Promotors getestet werden. Weiterhin wäre es interessant, auch die Kombination der Basenpaarungen A3-U8, U3-A8 und G3-C8 mit A5 zu testen. Prinzipiell sprechen die Daten des pHL2583 (1104-Mutante) im Vergleich zum pHL2708 (WT-Konstrukt) für eine „*corkscrew*“-Struktur, bedingt durch wechselnde Basenpaarungen an den Positionen 3 und 8 innerhalb des cRNA-Promotors. Die negative CAT-Aktivität der restlichen Basenpaar-Kombinationen an diesen Positionen (pHL3123, pHL3210 und pHL3209) deuten darauf hin, dass diese Basenpaarungen mit bestimmten Nukleotiden innerhalb des Tetraloops (Nukleotidposition 4-7), sehr wahrscheinlich mit dem A5, kombiniert werden müssen, d.h. dass im Tetraloop eine Nukleotidspezifität in der Interaktion mit der viralen RNA-Polymerase vorliegt.

Diese Resultate für die verschiedenen Mutationen im cRNA-Promotor zeigen, dass er eine aktive Struktur bei der Interaktion mit der viralen RNA-Polymerase bildet, und dass diese Struktur mit dem postulierten „*corkscrew*“-Schema übereinstimmt. Diese Aussage sollte allerdings durch weitere *in vivo*-Analysen von Mutationen innerhalb der Tetraloops der beiden Promotorenden bekräftigt werden. Diese Resultate zeigen weiterhin, dass das 5'-Ende des cRNA-Promotors, ebenso wie das 3'-Ende, eine entscheidende Rolle in der cRNA-Promotoraktivität spielt. Dieses Ergebnis widerspricht früheren *in vitro*-Studien des cRNA-

Promotors (Parvin *et al.*, 1989; Seong & Brownlee, 1992a; Li & Palese, 1992; Pritlove *et al.*, 1995). Jene Studien wurden unter der Voraussetzung durchgeführt, dass allein das 3'-Ende des cRNA-Promotors für den Start der Transkription ausreichend ist. Hierbei wurden das 3'- und das 5'-Ende unabhängig voneinander durch eine *in vitro*-Transkriptionsanalyse getestet, wobei Pritlove *et al.* einräumten, dass die aufgereinigte virale RNA-Polymerase, die für die *in vitro*-Transkription mit dem 3'-cRNA-Promotorstrang verwendet wurde, möglicherweise mit Oligonukleotiden des 5'-cRNA-Promotorstranges kontaminiert war. Die Mutationsanalyse von Pritlove *et al.* zeigte, dass die kompensierende Substitution G11-C12→U11-A12 keine Verminderung der Transkriptionsaktivität verursachte, was mit den hier vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt. Ebenfalls führte die Transition U10→C10 bzw. die Transversion U10→A10 zu keiner Verminderung der Aktivität (Pritlove *et al.*, 1995). Das bedeutet, dass ein beliebiger Austausch des Winkelnukleotids die Aktivität des cRNA-Promotors nicht beeinflusst. Dass das Winkelnukleotid des vRNA-Promotors zwar ausgetauscht werden kann, jedoch ungepaart vorliegen muß, wurde in anderer Weise durch die *in vivo*-Analyse im RNA-Polymerase I-Transkriptionssystem gezeigt (Flick, 1995; Flick *et al.*, 1996).

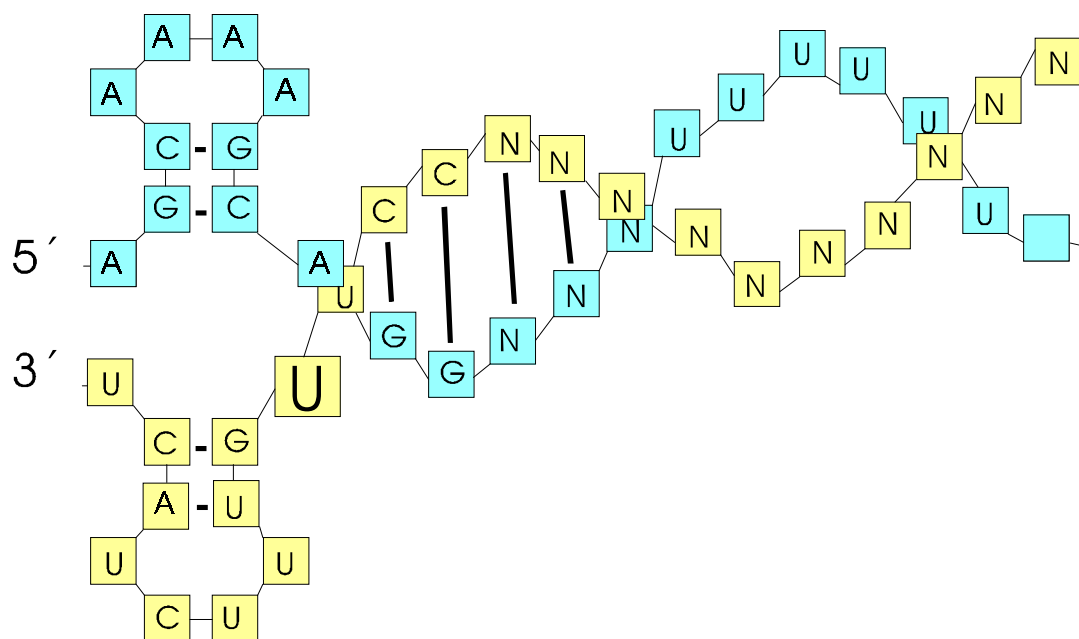


Abb. 4.1: Darstellung der „corkscrew“-Sekundärstruktur des cRNA-Promotors des Influenza A-Virus

Bei den gezeigten Nukleotiden handelt es sich um die Sequenz des WT-Promotors. Der proximale Abschnitt besteht aus den Nukleotiden 1-9 des 5'-Endes und 1-9 des 3'-Endes. Das U₁₀ am 3'-Ende ist ein überzähliges ungepaartes Nukleotid und bildet dadurch in dem cRNA-Promotor einen Winkel „nach oben“. Im distalen Element (Nukleotide 10-15 am 5'-Ende und 11-16 am 3'-Ende) sind hier nur die allgemein konservierten Nukleotide in definierter Weise aufgeführt worden. Die Segment-spezifisch gepaarten und ungepaarten Nukleotide sind als N bezeichnet.

4.6 Die *ambisense* Konstruktion bicistronischer RNA-Segmente

Die Kombination einer cRNA und vRNA Transkriptionseinheit zu einer *ambisense* bicistronischen RNA, bei der die Transkription der cRNA und der vRNA durch die Segmentenden zu den cRNA- bzw. vRNA-Promotoren initiiert wird, ist hier im nächsten Schritt erfolgreich getestet worden.

Tabelle 4.6: CAT-Expression der CAT-vRNA- und CAT-cRNA-Referenzkonstrukte bzw. der monocistronischen CAT-*ambisense*-Kontrollkonstrukte (m-avRNA/m-acRNA)

Die gezeigten prozentualen CAT-Aktivitäten stammen aus den MDCK-Zellen der ersten Passage.

Gen-Promotor Konstrukt	CAT-vRNA		CAT-cRNA		CAT-m-avRNA		CAT-m-acRNA	
	293T	M1	293T	M1	293T	M1	293T	M1
pHL1844	100	100	-	-	-	-	-	-
pHL2583	-	-	43	100	-	-	-	-
pHL2959	-	-	-	-	89	100	-	-
pHL2957	-	-	-	-	-	-	31	100

Tabelle 4.7: CAT- und GFP-Expression der bicistronischen *ambisense* CAT-GFP-Konstrukte

CAT- und GFP-Expression (%) in den 293T-Zellen der primären Infektion und in den MDCK-Zellen (M1) der ersten Passage, avRNA= *ambisense* vRNA, acRNA=*ambisense* cRNA bezeichnen die Matrize für die Transkription der entsprechend orientierten mRNAs.

Gen-Promotor Konstrukt	CAT-avRNA GFP-acRNA		CAT-acRNA GFP-avRNA	
	293T	M1	293T	M1
pHL2960	89 <3	100 <3	-	-
pHL3157	94 <3	100 <3	-	-
pHL2989	-	-	6 8	<3 10
pHL3145	-	-	40 8	<3 10

Die Tabellen 4.6 und 4.7 fassen die CAT- und GFP-Analysen der *ambisense* CAT-GFP-Konstrukte im Vergleich zu den CAT-Analysen der cRNA- und vRNA-*ambisense* Kontrollkonstrukten pHL2957/pHL2959 (mit monocistronischen RNAs, deren Enden sich zu den *ambisense* cRNA- und vRNA-Promotoren ausbilden, d.h. mit 6 A-U Basenpaaren benachbart zum Promotor) und die vRNA- bzw. cRNA-Referenzkonstrukte pHL1844/pHL2583 zusammen (siehe Abb. 3.42).

Die CAT-Analysen der CAT-vRNA und CAT-m-avRNA bzw. CAT-cRNA und CAT-acRNA zeigen die gleichen Expressionsniveaus, d.h. die Aktivitäten des vRNA- bzw. cRNA-Promotors in der *ambisense* Konstruktion verschlechtern sich nicht durch die Anwesenheit von 6A-U (potentiellen)-Basenpaaren benachbart zur Promotorstruktur. In den bicistronischen *ambisense* CAT-GFP-Konstrukten liessen sich die CAT- und GFP-Expression sowohl in den primär infizierten als auch in den passagierten Zellen nachweisen, wenn deren Transkription von dem vRNA-Promotor aus gestartet wird. Dass die GFP-Expressionsniveaus der bicistronischen *ambisense* Konstrukte nicht die der GFP-vRNA (pHL2251, Abb. 3.47) erreichen, liegt an der Länge des *ambisense* Segmentes, denn es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fremdsegmentes längenabhängig ist (Flick, 1998; diese Arbeit). Das war bei der CAT-Aktivität nicht direkt erkennbar, da diese sich schon in der Sättigung befand. Weiterhin ist die CAT-Testanalyse viel empfindlicher für die CAT-Expression als der GFP-Analysestest. Die Expression des CAT-Gens, dessen Transkription von dem cRNA-Promotor aus gestartet wird, war in den primär infizierten Zellen nachweisbar, die entsprechende Expression des GFP-Gens konnte hier jedoch gar nicht nachgewiesen werden, was der gleichen Ursache wie oben zugeschrieben wird. In den Zellen der ersten Passage liess sich die Expression dieser Gene, wenn deren Transkription von dem cRNA-Promotor eingeleitet wird, nicht mehr nachweisen. Im allgemeinen ist damit die Aktivität des vRNA-Promotors für den Start der Transkription stärker als die des cRNA-Promotors, während bei der Replikation das Verhältnis umgekehrt ist. Möglicherweise kommt es während der Verpackung oder der Passage zu Störungen in der Struktur des cRNA-Promotors oder der nichtkodierenden Region am 3'-Ende des *ambisense* Segmentes (siehe 4.7). Das Entfernen der in der nichtkodierenden Sequenz am 3'-Ende des *ambisense* Konstruktes vorhandene *SphI*-Schnittstelle, die eine AUG-Sequenz aufweist und damit die Translation stören könnte, hat zu keiner Verbesserung geführt. Jedoch wird das *ambisense* Konstrukt verpackt, was anhand der Expression der CAT- und GFP-Gene, deren Transkription von dem vRNA-Promotor des *ambisense* Segmentes aus gestartet wird, erkennbar ist. Hierfür war es notwendig, eine spezifische RT-PCR aus den

primär infizierten bzw. den passagierten Zellen oder aus den Viren des ersten Zellkulturüberstandes zu sequenzieren, um die korrekte Struktur des verpackten *ambisense* Segmentes zu überprüfen.

Somit konnte gezeigt werden, dass ein *ambisense* RNA-Segment, bestehend aus dem *ambisense* Promotor und zwei entgegengesetzt angeordneten Genen von der viralen Polymerase in beiden Richtungen transkribiert und repliziert werden kann. Es kommt zur Expression beider Gene in den primär infizierten Zellen. Dieses *ambisense* Segment wird weiterhin in die Tochter-Virionen verpackt. Erst in den passagierten Zellen lässt sich die Expression desjenigen Gens nicht mehr nachweisen, dessen Transkription von dem cRNA-Promotor aus gestartet wird.

4.7 Verpackung und Passage der Fremdsegmente

Nach Transfektion des Polymerase I-Transkriptionskonstruktes und anschließender Infektion mit FPV kommt es nach 7 h Inkubation zur Bildung der Virus-Nachkommenschaft, die teilweise zusätzlich zu den 8 eigenen Segmenten das Fremdgen trägt. Diese rekombinanten Viren sind in dem Zellkulturüberstand enthalten, der in den MDCK-Zellen passagiert wird. Lässt sich hier die Expression des Fremdgens detektieren, dann ist das Fremdsegment als neuntes zusätzliches Segment verpackt worden.

Gleichgültig, ob die Transfektion mit CAT-cRNA oder -vRNA-Konstrukten durchgeführt wird, es kann immer nur das vRNA-Segment verpackt werden. D.h. nur die vRNA-Moleküle werden in die Virus-Nachkommen verpackt, bedingt durch das ungepaarte Winkelnukleotid an Position 10 des 5'-Endes des vRNA-Promotors. Dabei ist das Vorhandensein eines ungepaarten Nukleotids an dieser Position und diesem Strang ausschlaggebend, und nicht das Nukleotid selbst. D.h. eine nicht nachzuweisende CAT-Aktivität in den Zellen der Passage nach Transfektion eines cRNA-Konstruktes scheint an der nichtkodierenden Terminalsequenz der RNA-Moleküle zu liegen, die sich in der fehlenden oder ineffizienten Verpackung der dazu komplementären vRNA auswirkt. Diese Tatsache konnte oft beobachtet werden, z.B. liess sich in den Zellen der ersten Passage des cRNA-Konstruktes pHL2721 keine CAT-Expression nachweisen. Der Unterschied zwischen diesem und dem weiteren cRNA-Konstrukt pHL2583 liegt in der Sequenz der nichtkodierenden Region zwischen dem 3'-Ende der cRNA-Promotorsequenz und dem CAT-Start (Abb. 3.32). Nach Entfernen der in dieser Sequenz vorliegenden *SphI*-Schnittstelle zeigte das resultierende Konstrukt eine CAT-Aktivität in den passagierten Zellen. Allerdings führte das Entfernen solcher Schnittstellen bei den *ambisense* Konstrukten pHL2989 und pHL3145 nicht zu dem gleichen Erfolg. Dabei wurde das *ambisense* Segment verpackt, was anhand der vRNA-Expression der bicistronischen *ambisense* RNA erkennbar war. Diese Verpackung findet offenbar nur mit geringer Effizienz statt. Möglicherweise treten während der Verpackung oder bei der Passage störende Faktoren aufgrund einer bestimmten Sequenz auf, welche die Transkription der cRNA oder die Translation der resultierenden mRNA blockieren. Es sollte getestet werden, ob der Austausch des G5-Nukleotids durch das A5 am 5'-Strang des cRNA-Promotors eine stärkere Expression bewirken kann.

Das Matrix-Protein M1 steht durch elektrostatische Interaktionen in Verbindung mit der Lipidmembran (Ruigrok *et al.*, 2000). Durch seine vielfältigen Interaktionen spielt das M1 die entscheidende Rolle bei der Verpackung der RNPs. Das Verpackungssignal liegt innerhalb der Sequenz der nichtkodierenden Region, sonst würde keines der CAT-Fremdsegmente zu einer Expression in den passagierten Zellen führen. Es hat sich auch zeigen lassen, dass das ungepaarte Nukleotid an Position 10 des 5'-Endes des vRNA-Promotors das Signal darstellt, d.h. die korrekte Konformation der vRNA für die verpackungsgerechte Erkennung durch virale Polymerase und M1-Protein bewirkt (Tchatalbachev, 2000).

4.8 Interaktion der viralen RNA-Polymerase und NP mit dem cRNA-Promotor

Die virale RNA-Polymerase ist ein Heterotrimer bestehend aus den PB1, PB2 und PA-Untereinheiten. Dabei interagiert der N-Terminus des PB1-Proteins mit dem C-Terminus des PA, sein C-Terminus mit dem N-Terminus des PB2 (Perez & Donis, 1995; Gonzalez *et al.*, 1996; Perales *et al.*, 1996; Toyoda *et al.*, 1996; Zürcher *et al.*, 1996). Die drei Untereinheiten sind sowohl für die Transkription als auch für die Replikation der viralen und der komplementären RNA erforderlich. Jede der drei Untereinheiten der viralen RNA-Polymerase übernimmt dabei eine bestimmte Rolle (siehe 1.4.2.1). Die PB1-Untereinheit ist das *core*-Enzym des Polymerase-Komplexes und besitzt Aminosäure-Motive, die typisch für RNA-abhängige RNA-Polymerasen sind (Poch *et al.*, 1990). *In vitro*-Versuche haben gezeigt, dass das PB1-Protein eine spezifische Bindung mit der vRNA- (Li *et al.*, 1998; Gonzalez & Ortin, 1999a) und der cRNA-Matrize (Gonzalez & Ortin, 1999b) eingeht. Diese Bindung erfolgt an den 3'- und 5'-Enden gleichzeitig durch zwei verschiedene Regionen des C- und N-Terminus des PB1-Proteins. Dabei ist die zentrale Region des Proteins für die Erkennung der cRNA-Matrize zuständig, der C-Terminus für die Erkennung der vRNA-Matrize, während der N-Terminus für die Bindung der vRNA als auch der cRNA verantwortlich ist (Gonzalez & Ortin, 1999b). Zusätzlich zu der viralen RNA-Polymerase ist das NP-Protein für die Transkription und Replikation der viralen und komplementären RNA unentbehrlich. Es konnte gezeigt werden, dass das NP mit dem PB1 und PB2, jedoch nicht mit PA, interagiert (Biswas *et al.*, 1998).

4.8.1 Vergleich der cRNA- bzw. vRNA-Promotor-Wechselwirkung mit der viralen RNA-Polymerase

Die Unterschiede in den CAT-Expressionsniveaus zwischen der cRNA und der vRNA (z.B. Tabelle 4.4) lassen erkennen, dass bei der Interaktion mit der viralen RNA-Polymerase eine aktivierte Struktur des jeweiligen Promotors ausgebildet wird. Die Bildungsrate und Stabilität dieser Struktur bestimmen die Transkriptionsrate und damit das Expressionsniveau des kodierenden Gens in dem vRNA- bzw. cRNA-Molekül. D.h. eine hohe CAT-Aktivität ist mit einer vollständigen Ausbildung, aber auch mit dem leichten Übergang in die nachfolgende Matrizenstruktur verbunden, eine mittelstarke CAT-Aktivität durch eine „instabile“ Teil-

Ausbildung oder aber durch eine allzu starre Aufrechterhaltung der Primärstruktur charakterisiert, fehlende CAT-Aktivität weist auf die Unmöglichkeit der Ausbildung dieser Struktur hin. Die unterschiedliche Nukleotidspezifität der viralen RNA-Polymerase bei der Interaktion mit dem cRNA- bzw. vRNA-Promotor deutet auf die spezifische Erkennung des jeweiligen Promotors durch die virale RNA-Polymerase und belegt die Interaktion auf der Seite der Polymerase in unterschiedlicher Konformation, besonders deutlich in der Asymmetrie der Verpackung der RNP-Komplexe zugunsten der vRNPs.

Die Ergebnisse der CAT-Analysen des cRNA-Promotors zeigen, dass der aktive cRNA-Promotor eine „corkscrew“-Konformation aufweisen muß bzw. in diese übergehen kann unter der Einleitung der Polymerase. Bei der Erkennung durch die Polymerase spielen neben der gesamten Konformation einzelne der exponierten Nukleotide in den Tetraloop-Sequenzen an beiden Strängen eine entscheidende Rolle. Es ist nicht eindeutig, ob hier ebenfalls das G5 (oder eher das A5) im 5'-Strang und das U⁷ im 3'-Strang die gleiche Rolle spielen wie bei dem vRNA-Promotor. Hierzu bedarf es weiterer Mutationsanalysen.

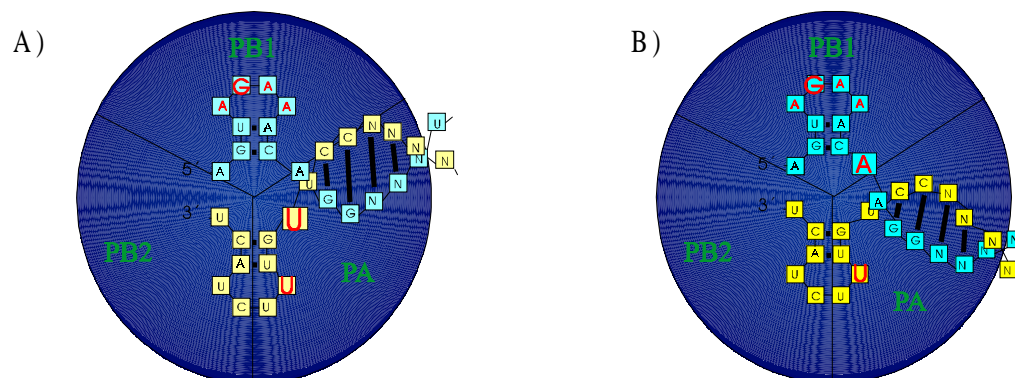


Abb. 4.2: Ausbildung der „corkscrew“-Struktur durch Interaktion der viralen RNA-Polymerase mit dem cRNA- bzw. vRNA-Promotor

A) Interaktion der „corkscrew“-cRNA mit der viralen RNA-Polymerase, B) Interaktion der „corkscrew“-vRNA mit der viralen RNA-Polymerase. Die rot gekennzeichneten Nukleotide in der Tetraloop-Sequenz spielen bei der Erkennung durch die virale RNA-Polymerase eine entscheidende Rolle. Das Winkelnukleotid ist ebenfalls rot gekennzeichnet, es bildet einen Winkel „nach unten“ (vRNA-Promotor) bzw. „nach oben“ (cRNA-Promotor).

4.8.2 Einfluss der NP-Konzentration auf die Transkription und Replikation der cRNA und der vRNA

Mit Hilfe der Booster-Plasmide zur Expression von PB1, PB2, PA und NP kann die Abhängigkeit der Transkription und Replikation der vRNA bzw. cRNA von den einzelnen Polymerase-Untereinheiten und von NP detektiert werden. Nur die Kotransfektion mit allen vier Booster-Plasmiden führt zur CAT-Expression. Die Kotransfektion mit einzelnen, mit Zweier- oder Dreier-Kombinationen der Booster-Plasmide führte zu keiner nachweisbaren Expression.

Die NP-Abhängigkeitsversuche der CAT- bzw. der GFP-Expression haben eindeutig gezeigt, dass der cRNA-Promotor auf eine andere Art und Weise mit dem NP-Protein interagieren muß als der vRNA-Promotor. In den bicistronischen *ambisense* CAT-GFP-Konstrukten war die Expression der von dem vRNA-Promotor gesteuerten Gene abhängig von der NP-Konzentration: je höher die NP-Konzentration, desto höher die Gen-Expression. Demgegenüber liess sich keine Expression der Gene detektieren, deren Transkription von dem cRNA-Promotor des bicistronischen *ambisense* Konstruktes aus gestartet wird. Allerdings war bei der cRNA-Promotormutante pHL3132 ca. 20% CAT-Aktivität des pHL1844 nachweisbar. Bei dieser Mutante war das G 11-C 12-Nukleotidpaar gegen das A 11-U 12- Nukleotidpaar ausgetauscht worden. Ob das NP-Protein mit dem distalen Bereich vor der „*corkscrew*“-Strukturbildung oder nach der Auflösung im Zuge der Transkription interagiert und damit die Transkription nach Auflösung der Doppelstrangbildung, die beim A-U- schneller als beim G-C-Basenpaar geht, ist unwahrscheinlich. Denn möglicherweise bedeckt die Polymerase durch ihre Bindung die Promotorregion, so dass räumlich keine Möglichkeit für die Bindung des NP an den distalen Bereich besteht.

Vermutlich spielen zelluläre Faktoren bei der Interaktion des NP-Proteins mit der viralen Polymerase und der cRNA eine Rolle, die nur bei FPV-Infektion angeregt werden können, oder es sind hier weitere virale Faktoren von Bedeutung, die bei der Booster-Aktivierung allein, d.h. ohne eine Infektion nicht vorliegen können. Denn in den nach Infektion mit den cRNA-Konstrukten transfizierten Zellen war die CAT-Expression nachweisbar. Betrachtet man die Ergebnisse der RACE-Analyse (vgl. 3.4), so lässt sich erkennen, dass bei der cRNA die Replikation gegenüber der Transkription bevorzugt wird: das Verhältnis der gebildeten vRNA-Moleküle (Replikation) zu den mRNA-Molekülen (Transkription) lag bei 10:1. Dieses

asymmetrische Verhältnis wurde bei den NP-Abhängigkeitsversuchen durch die vorliegenden freien NP-Moleküle zugunsten der Replikation der cRNA verschoben,. Die Neigung der cRNA zur Replikation konnte damit nicht herabgesetzt werden. Im Gegensatz dazu liess sich eine NP-Abhängigkeit der vRNA-Transkription nachweisen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkription, Replikation und Verpackung (Passage) viraler Fremdsegmente über die Länge der größten Virus-eigenen Segmente (2341 nt) hinaus bis auf 4000 nt ausgedehnt werden kann. Transkriptions- und Replikations-Effizienz sinken jedoch mit zunehmender Länge ab.

Mit Hilfe des RNA-Polymerase I-Transkriptionssystems konnte der Einfluss von gezielt gesetzten Mutationen in der cRNA-Promotorstruktur detektiert werden. Für die direkte Untersuchung des cRNA-Promotors wurde die DNA-Sequenz, die in dem RNA-Polymerase I-Transkriptionskonstrukt für das RNA-Segment kodiert, so verändert, dass nach *in vivo* Transfektion eine cRNA entsteht, die ihrerseits die Transkription einer Reporter-gen-mRNA initiieren kann. Nach Infektion bzw. Expression der viralen Polymerase und des NP-Proteins liess sich die Aktivität des Reportergens nachweisen. Somit wurde die Fähigkeit des cRNA-Promotors zum Transkriptionsstart erstmalig nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurde das kodierende CAT-Gen in inverser Orientierung (als Minusstrang-Sequenz) eingesetzt und am 5'-cRNA-Promotorende zusätzlich eine Folge von 6 Uridin-Basen eingefügt, um die Polyadenylierung der mRNA zu ermöglichen. Basierend auf der Mutationsanalyse des vRNA-Promotors ist die komplementäre cRNA-Promotorsequenz in gleicher Weise durch Substitution und Doppelsubstitution untersucht worden. Die Mutationsanalyse des cRNA-Promotors zeigt, dass die aktive cRNA-Promotorstruktur, wie die des vRNA-Promotors, eine „corkscrew“-Sekundärstruktur aufweist. Allerdings unterscheidet sich die Erkennungs- und Bindungs-Konformation der viralen RNA-Polymerase in der Interaktion mit einer optimierten cRNA-„corkscrew“-Struktur in einigen Einzelheiten von der Wechselwirkung mit der vRNA-„corkscrew“-Struktur. Zur Bestimmung aller basenspezifischen Erkennungselemente der viralen Polymerase bedarf es weiterer cRNA-Promotoranalysen. Die Analyse der 5'-Endsequenzen der aus der cRNA synthetisierten mRNA (c-mRNA) nach der RACE-Methode ergab, dass die 5'-Promotorsequenz durch Fremdsequenzen verlängert vorliegt, wie es für die aus der vRNA gebildete mRNA (v-mRNA) typisch ist. Auch der c-mRNA-Transkriptionsstart ist daher ein „cap-snatching“-Prozess.

Das unterschiedliche Verhalten der CAT-Expression der cRNA und vRNA bei den NP-Abhängigkeitsversuchen und die Ergebnisse der RACE-Analyse bestätigen, dass die in unserem System nach einer Infektion nachgewiesene CAT-Expression die

Transkriptionsaktivität der cRNA- bzw. der vRNA-Moleküle widerspiegelt und nicht die Replikation.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die cRNA außer der bekannten Replikations- eine Transkriptionsaktivität aufweist, war es möglich, cRNA- und vRNA-Transkription in einem System zu kombinieren. Dies enthält in einem *ambisense* bicistronischen RNA-Segment zwei Transkriptionseinheiten mit zwei einander entgegengesetzt orientierten Genen. Darin kann die Transkription des einen Gens von dem *ambisense* cRNA-Promotor, die des anderen Gens von dem *ambisense* vRNA-Promotor aus gestartet werden. Für die Polyadenylierung ist beiderseits eine U₆-Sequenz benachbart zur 5'-Promotorsequenz eingeführt worden. In den primär transfizierten Zellen lässt sich die Expression der *ambisense* Gene CAT und GFP nachweisen. In den passagierten Zellen lässt sich bei diesen Konstrukten die Expression desjenigen Gens mit deutlicher Leistung nachweisen, dessen Transkription von dem vRNA-Promotor des *ambisense* Segmentes aus gestartet wird. Um die Expression desjenigen Gens weiter zu stärken, dessen Transkription von dem cRNA-Promotor des *ambisense* Segmentes aus gestartet wird, bedarf es weiterer Experimente. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass ein solches *ambisense* Segment von der viralen RNA-Polymerase transkribiert und repliziert wird. Außerdem wird das virale *ambisense* Segment in die Tochter-Virionen verpackt. Mit diesem System kann man zwei verschiedene Gene, z.B. ein Influenza-eigenes und ein beliebiges Fremdgen, zu einem *ambisense* Segment kovalent zusammenfügen, mit der Gewähr für einen stabilen Aufbau eines solchen rekombinanten Influenza-Virus.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, S.** (1995). The importance of importin. *Trends Cell Biol.* **5**: 189-191
- Air, GM and Laver, WG** (1989). The neuraminidase of influenza virus. *Proteins Struct Funct Genet*; **6**:341-356.
- Alonso-Caplen, FV; Krug, R. M.** (1991). Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmatic transport of NS1 mRNA. *Mol. Cell Biol.* **11**:1092-1098.
- ST. Angelo, C.; Smith, G.; Summers, M.; Krug, R. M.**(1987). Two of the three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors from a complex in insect cells. *J. Virology* **61**:361-365
- Bartsch, I.; Schoneberg, C.; Grummt, I.** (1987). Evolutionary changes of sequences and factors that direct transcription termination of human and mouse ribosomal genes. *Mol. Cell Biol.* **7**: 2521-2529
- Baudin, F.; Bach, C.; Cusak, S.; Ruigrok, R. W. H.** (1994). Structure of influenza RNP.I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to solvent. *EMBO J.* **13**: 3158-3165
- Beaton, A. R.; Krug, R. M.** (1984). Synthesis of the template for influenza virion RNA replication in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4682-4686
- Beaton, A. R.; Krug, R. M.** (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6282-6286
- Biswas, S. K.; Boutz, P. L.; Nayak, D. P.** (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J. Virology* **72**: 5493-5501
- Blaas, D.; Patzelt, E.; Kuechler, E.** (1982a). Cap-recognizing protein of influenza virus. *Virology* **116**: 339-348
- Blaas, D.; Patzelt, E.; Kuechler, E.** (1982b). Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* **10**: 4803-4812
- Borowiec, J. A.; Dean, F. B.; Bullock, P. A.; Hurwitz, J.** (1990). Binding and unwinding-how T antigene engages the SV40 origin of DNA replication. *Cell* **60**: 181-184
- Bosch, F. X.; Garten, W.; Klenk, H-D; Rott, R.** (1981). Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza virus. *Med Welt* **32**:1008-1009
- Bouloy, M.; Plotch, S. J.; Krug, R. M.** (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4886-4890

- Braam, J.;** Ulmanen, I.; Krug, R. M. (1983). Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**:609-618
- Bui, M.;** Willis, E. G.; Helenius, A.; Whittaker, G. R. (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virology* **74**: 1781-1786
- Chalfie, M.;** Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805
- Chatterjee, S.;** Stochaj, U.(1996). Monitoring nuclear transport in HeLa cells using the green fluorescent protein. *BioTechniques* **21**: 62-63
- Chen, Z.;** Li, Y.; Krug, R. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly (A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* **18**: 2273-2283
- Cohen, S. N.;** Chang A. C.; Hsu, I. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in Bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2114
- Compans, R. W.;** **Choppin, P. W.** (1975). Reproduction of myxoviruses. In: Fraenkel-Conrat, H.; Wagnat, R. R., eds. *Comprehensive Virology IV*. New York: Plenum: 179-252
- Compans, R. W.;** Content, J.; Duesburg, P. H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Virology* **10**:795-800
- De la Luna, S.;** Fortes, P.; Beloso, A.; Ortin, J. (1995) NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virology* **69**: 2427-2433
- De la Luna, S.;** Martin, J.; Portela, A.; Ortin, J. (1993). Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from simian virus 40 recombinant viruses. *J. Gen. Virology* **74**: 535-539
- Dopheide, T. A.;** Ward, C. W. (1978). The carboxyl-terminal sequence of the heavy chain of a Hong Kong influenza hemagglutinin. *Eur J Biochem* **85**: 393-398
- Elder, K. T.;** Bye, J. M.; Skehel, J. J.; Waterfield, M. D.; Smith, A. E. (1979). In vitro synthesis, glycosylation, and membrane insertion of influenza virus haemagglutinin. *Virology* **95**: 343-350
- Elton, D.;** Medcalf, L.; Bishop, K.; Harrison, D.; Digard, P. (1999). Identification of amino Acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J. Virology* **73**: 7357-7367
- Enami, M.;** Luytjes, W.; Krystal, M.; Palese, P. (1990). Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3802-3805
- Enami, K.;** Sato, T. A.; Nakada, S.; Enami, M (1994). Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J. Virology* **68**: 1432-1437

- Enami, M.;** Sharma, G.; Benham, C.; Palese, P. (1992). An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**: 1432-1437
- Finke, S.; Conzelmann, K. K.** (1997). Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: Random packaging of positive- and negativ-Strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. *J.Virology* **71**: 7281-7288
- Flick, R.** (1995). Diplomarbeit. Justus-Liebig-Universität-Gießen
- Flick, R.** (1998). Dissertation. Justus-Liebig-Universität-
- Flick, R.; Hobom, G.** (1999a). Interaction of Influenza virus polymerase with viral RNA in the „corkscrew“ conformation. *J. Gen. Virology* **80**: 2565-2572
- Flick, R.; Hobom, G.** (1999b). Transient bicistronic vRNA segments for indirect selection of recombinant influenza viruses. *Virology* **262**: 93-103
- Flick, R.;** Neumann, G.; Neumeier, E.; Hoffmann, E.; Hobom, G. (1996). Influenza vRNA interacts with viral polymerase in a *corkscrew* conformation
Option for the control of influenza III, Brown, L. E.; Hampson, A. W.; Webster, R. G., ed., *Elsevier Science B. V.*
- Fodor, E.;** Pritlove, D. C.; Brownlee, G. G. (1994). The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J. Virology* **68**: 4092-4096
- Fodor, E.;** Pritlove, D. C.; Brownlee, G. G. (1995). Characterization of the RNA-fork model of the virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J. Virology* **69**: 4012-4019
- Fodor, E.;** Seong, B. L.; Brownlee, G. G. (1993).Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter define a polymerase binding site at residues 9-12 of the promoter. *J. Gen. Virology* **74**: 1327-1333
- Follett, E. A.;** Pringle, C. R.; Wunner, W. H.; Skehel, J. J. (1974). Virus replication in enucleate cells: vesicular stomatitis virus and influenza virus. *J. Virology* **13**: 394-399
- Fortes, P.;** Beloso, A.; Ortin, J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* **13**: 704-712
- Garten, W.;** Bosch, F. X.; Linder, D.; Rott, R.; Klenk, H-D (1981). Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: the structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage. *Adv. Exp. Med. Biol.* **142**: 119-131
- Gautier, C.;** Mehtali, M.; Lathe, R. (1989). A ubiquitous mamalian expression vector, pHMG, based on a housekeeping gene promoter. *Nucleic Acid Res.* **17**: 83-89
- Gonzalez, S.;** Ortin, J. (1999a). Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: Two seperate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J. Virology* **73**: 631-637

- Gonzalez, S.; Ortin, J.** (1999b). Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunits recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* **18**: 3767-3775
- Gonzalez, S.; Zürcher, T; Ortin, J.** (1996). Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein responsible for interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acid Res.* **24**: 4454-4463
- Gruda, M. C.; Alwine, J. C.** (1991). Simian Virus 40 (SV40) T-Antigen transcriptional activation mediated through the Oct/SPH region of the SV40 late promoter. *J. Virology* **65**: 3553-3558
- Grummt, I.; Rosenbauer, H.; Niedermeyer, I.; Maier, U.; Öhrlein, A.** (1986). A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell* **45**: 837-846
- Hagen, M.; Chung, T. D. Y.; Butcher, J. A.; Krystal, M.** (1994). Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J. Virology* **68**: 1509-1515
- Haslam, E. A.; Hampson, A. W.; Radiskevics, L.; Whitte, D. O.** (1970). The polypeptides of influenza virus III. Identification of hemagglutinin, neuraminidase and nucleocapsid protein. *Virology* **42**: 566-575
- Hay, A. J.; Abraham, G.; Skehel, J. J.; Smith, J. C.; Fellner, P.** (1977). Influenza virus messenger RNAs are incomplete transcripts of the genome RNAs. *Nucleic Acid Res.* **4**: 4197-4209
- Hay, A. J.; Skehel, J. J.; McCauley, J.** (1982). Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* **116**: 517-522
- Hoffmann, E.** (1997): Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Hoffmann, E.; Neumann, G.; Hobom, G.; Webster, R. G.; Kawaoka, Y.** (2000). Ambisense approach for the generation of influenza A virus vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology* **267**: 310-311
- Honda, A.; Ueda, K.; Nagata, K.; Ishihama, A.** (1988). RNA-Polymerase of influenza virus: role of NP on RNA chain elongation. *J. Biochem.* **104**: 1021-1026
- Hsu, M.; Parvin, J. D.; Gupta, S.; Krystal, M.; Palese, P.** (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proceedings of the national academy of sciences. USA* **84**: 8140-8144
- Huang, T.-S.; Palese, P.; Krystal, M.** (1990). Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J. Virology* **64**: 5669-5673
- Hughes, M. T.; Matrosovich, M.; Rodgers, E.; McGregor, M.; Kawaoka, Y.** (2000). Influenza A viruses lacking Sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in Cell Culture, Eggs, or mice. *J. Virology* **74**: 5206-5212

- Inglis, S. C.;** Brown, C. M. (1981). Spliced and unspliced RNA encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nuclei Acid Res.* **9**: 2727-2740
- Inglis, S. C.;** Carroll, A. R.; Lamb, R. A.; Mahay, B. W. (1976). Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**: 489-503
- Ishihama, A.;** Nagata, K. (1988). Viral RNA polymerase. *Crit. Rev. Biochem.* **23**: 27-76
- Jennings, P. A.;** Finch, J. T.; Winter, G.; Robertson, J. S. (1983). Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide the sequence rearrangements in influenza viral RNA? *Cell* **34**: 619-627
- Jones, I. M.;** Reay, P. A.; Philpott, K. L. (1986). Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signals in polymerase PB2. *EMBO J.* **5**: 2371-2376
- Kawaoka, Y.;** Webster, R. G. (1988). Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 324-328
- Keitel, W. A.;** Piedra, P. A. (1998). In Textbook of influenza, eds. Nickolson, K. G.; Webster, R. G.; Hay, A. (Blackwell, Oxford): 373-390
- Kilbourne, E. D.** (1979). Molecular epidemiology-influenza as archetype. *Harvey Lect.* **73**: 225-258
- Kilbourne, E. D.** (1987). Influenza. New York: Plenum Medical Book Company
- Kimura, N.;** Nishida, M.; Nagata, K.; Ishihama, A.; Oda, K.; Nakada, S. (1992). Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J. Gen. Virology* **73**: 1321-1328
- Klenk, H-D;** Rott, R.; Orlich, M.; Blodorn, J. (1975). Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68**: 426-439
- Klump, K.;** Ruigrok, R. W. H.; Baudin, F. (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J.* **16**: 1248-1257
- Kobayashi, M.;** Toyoda, T.; Ishihama, A. (1996). Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch. Virology* **141**: 525-239
- Krug, R. M.;** Alonso-Caplan, F. V.; Julkunen, I.; Katz, M. G. (1989). Expression and replication of the influenza virus genome. The Influenza Viruses: 89-152. Edited by R. M. Krug. New York. Plenum Press
- Krug, R. M.;** Soeiro, R. (1975). Studies on the intranuclear localization of influenza virus-specific proteins. *Virology* **64**: 378-387
- Krug, R. M.;** Etkind, P. R. (1973). Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* **56**:334-348

- Kuhn, A.; Grummt, I.** (1989). 3'-end formation of mouse pre-rRNA involves both transcription termination: a specific processing reaction. *Genes Dev.* **3**: 224-231
- Lamb, R. A.; Choppin, P. W.** (1976). Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. *Virology* **74**: 504-519
- Lamb, R. A.; Choppin, P. W.** (1979). Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4908-4912
- Lamb, R. A.; Choppin, P. W.** (1981). Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology* **112**: 729-737
- Lamb, R. A.; Krug, R. M.** (1996). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology 3*: 1353-1445 eds. Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Chanock, R. M.; Meinick, J. L.; Monath, T. P.; Roizman, B.; Straus, S. E.
- Lamb, R. A.; Zebedee, S. L.; Richardson, C. D.** (1985). Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface. *Cell* **40**: 627-633
- La Volpa, A.; Simeone, A.; Desposito, M.; Scotto, L.; Fidanza, V.; De Falco, A.; Boncinelli, E.** (1985). Molecular analysis of the heterogeneity region of the human ribosomal spacer. *J. Mol. Biol.* **183**: 213-223
- Li, M. L.; Ramiraz, B. C.; Krug, R. M.** (1998). RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *EMBO J.* **17**: 5844-5852
- Lu, Y.; Wambach, M.; Katze, M. G.; Krug, R. M.** (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**: 222-228
- Luo, G.; Luytjes, W.; Enami, M.; Palese, P.** (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J. Virology* **65**: 2861-1867
- Luytjes, W.; Krystal, M.; Enami, M.; Parvin, J. D.; Palese, P.** (1989). Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell* **59**: 1221-1224
- Mahy, B. W. J.** (1983). Mutants of influenza virus In: Palese, P.; Kingsbury, D. W.; eds. *Genetics of influenza virus*. New York: Springer-Verlag: 192-254
- Martin and Helenius,** 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**:117-130
- Medcalf, L.; Poole, E.; Elton, D.; Digard, P.** (1999). Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J. Virology* **73**: 7349-7356

- Mena, I.;** Jambrina, E.; Albo, C.; Perales, B.; Ortin, J.; Arrese, M.; Vallejo, D.; Portela, A. (1999). Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J. Virology* **73**: 1186-1194
- Misteli, T.; Spector, D. L.** (1997). Application of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol.* **15**: 961-964
- Mitnaul, L. J.;** Castrucci, M R.; Murti, K. G.; Kawaoka, Y. (1996). The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. *J. Virology* **70**: 873-879
- Morise, H.;** Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aquorea*. *Biochem.* **13**: 2656-2662
- Mukaigawa, J.;** Nayak, D. P. (1991). Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J. Virology* **65**: 245-253
- Mullis, K. B.;** Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350
- Murti, K. G.;** Bean, W. J.; Webster, R. G. (1980). Helical ribonucleoproteins of influenza virus: An electron microscopy analysis. *Virology* **104**: 224-229
- Naeve, C. W.;** Williams, D. (1990). Fatty acids on the A/Japan/305/57 influenza virus hemagglutinin have a role in membrane fusion. *EMBO J.* **9**: 3857-3866
- Naim, H. Y.;** Roth, M.G. (1993). Basis for selective incorporation of glycoproteins into the influenza virus envelope. *J. Virology* **67**: 4831-4841
- Nakagawa, Y.;** Kimura, N.; Toyoda, T.; Mizumoto, K.; Ishihama, A.; Oda, K.; Nakada, S. (1995). The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis. *J. Virology* **69**: 728-733
- Nakagawa, Y.;** Oda, K.; Nakada, S. (1996). The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis and the PA subunit in addition to PB1 subunit is required for viral synthesis in replication of the influenza virus genome. *J. Virology* **70**: 6390-6394
- Nemeroff, M. E.;** Barabino, S. M. L.; Li, Y.; Keller, W.; Krug, R. M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the 30kD subunit of cleavage and specificity factor and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell* **1**: 991-1000
- Nemeroff, M. E.;** Utans, U.; Kramer, A.; Krug, R. M. (1992). Identification of cis-acting intron and exon regions in influenza virus NS1 mRNA that inhibit splicing and cause the formation aberrantly sedimenting presplicing complexes. *Mol. Cell Biol.* **12**: 962-970
- Neumann, G.;** Castrucci, M. R.; Kawaoka, Y. (1997). Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J. Virology* **71**: 9690-9700
- Neumann, G.;** Hobom, G. (1994). RNA polymerase I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology* **202**: 477-479

- Neumann, G.;** Watanabe, T.; Ito, H.; Watanabe, S.; Goto, H.; Gao, P.; Hughes, M.; Perez, D. R.; Donis, R.; Hoffmann, E.; Hobom, G. (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9345-9350
- Neumann, G.;** Zobel, A.; Hobom, G. (1995). Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo. *J. Gen. Virology* **76**: 1709-1717
- O' Neill, R. E.;** Talon, J.; Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* **17**: 288-296
- Palese, P.;** Muster, T.; Zheng, H.; O'Neil, R.; Garcia-Sastre, A. (1999). Learning from our foes: a novel vaccine concept for influenza virus. *Arch. Virol. Suppl.* **15**: 131-138
- Parvin, J. D.;** Palese, P.; Honda, A.; Ishihama, A.; Krystal, M. (1989). Promoter analysis of the influenza virus RNA polymerase. *J. Virology* **63**: 5142-5152
- Perales, P.;** de la Luna, S; Palacios, I; Ortin, J. (1996). Mutational analysis identifies functional domains in the influenza A virus PB2 polymerase subunit. *J. Virology* **70**: 1678-1686
- Perales, P.;** San-Ezquerro, J. J.; Gastaminza, P.; Ortega, J.; Santaren, J. F.; Ortin, J.; Nieto, A. (2000). The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J. Virology* **74**: 1307-1312
- Perez, D. R.;** Donis, R. O. (1995). A 48 amino acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J. Virology* **69**: 6932-6939
- Petri, T.;** Dimmock, N. J. (1981). Phosphorylation of influenza virus nucleoprotein in vivo. *J. Gen. Virology* **57**: 185-190
- Piccone, M. E.;** Fernandez-Sesma, A.; Palese, P. (1993). Mutational analysis of the influenza virus vRNA promoter. *Virus Res.* **28**: 99-112
- Pinto, L. H.;** Holsinger, L. J.; Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528
- Platt, T.** (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 339-372
- Pleschka, S.;** Jaskunas, S. R.; Engelhardt, O. G.; Zürcher, T.; Palese, P.; Garcia-Sastre, A. (1996). A Plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *J. Virology* **70**: 4188-4192
- Plotch, S. J.;** Bouloy, M.; Ulmanen, I.; Krug, R. M. (1981). A unique cap (m Gppp-pXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**: 847-858
- Poch, O.;** Sauvaget, I.; Delarue, M.; Tordo, N. (1990). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* **8**: 3867-3874

- Pons, M. W.** (1971). Isolation of influenza virus ribonucleoprotein from infected cells. Demonstration of the presence of negative-stranded RNA in viral RNP. *Virology* **46**: 149-160
- Poon, L. L. M.**; Pritlove, J.; Sharps, J.; Brownlee, G. G. (1998). The RNA Polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA. Acts in cis to polyadenylate mRNA. *J. Virology* **72**: 8214-8219
- Presley, J. F.**; Cole, N. B.; Schroer, T. A.; Hirschberg, K.; Zaal, K. J.; Lippincott-Schwarz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**: 81-85
- Pritlove, D. C.**; Fodor, E.; Seong, B. L.; Brownlee, G. G. (1995). In vitro transcription and Polymerase binding studies of the terminal influenza A virus cRNA: evidence for a cRNA panhandle. *J. gen. Virology* **76**: 2205-2213
- Qui, Y.**; **Krug, R. M.** (1994). The influenza virus NS1 protein is a poly A-binding protein that inhibits the nuclear export of mRNAs containing poly A. *J. Virology* **68**: 2425-2432
- Rees, P. J.**; **Dimmock, N. J.** (1981). Electrophoretic separation of influenza virus ribonucleoproteins. *J. Gen. Virology* **53**: 125-132
- Richardson, J. C.**; **Akina, R. K.** (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch. Virology* **116**: 69-80
- Ruigrok, R. W. H.**; Barge, A.; Durrer, P.; Brunner, J.; Ma, K.; Whittaker, G. R. (2000). Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* **267**: 289-298
- Sanger, F.**; Nickelen, S.; Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Schmidt, M.F. G.** (1982). Acylation of viral spike glycoproteins: a feature of enveloped RNA viruses. *Virology* **116**: 327-338
- Scholtissek, C.**; Rohde, W.; von Hoyningen, V.; Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **87**: 13-20
- Schulze, I. T.** (1970). The structure of influenza virus I., The polypeptides of the virion. *Virology* **41**: 890-904
- Segal, M.**; Bye, J.; Sambrook, J.; Gething, M. (1992). Disulfide bond formation during the folding of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* **118**: 227-244
- Seong, B. L.**; **Brownlee, G. G.** (1992a). A new method for reconstituting influenza polymerase and RNA in vitro: a study of the promoter elements for cRNA and vRNA synthesis in vitro and viral rescue in vivo. *Virology* **186**: 247-260
- Seong, B. L.**; **Brownlee, G. G.** (1992b). Nucleotides 9 to 11 of the influenza A virion promoter are crucial for activity in vitro. *J. Gen. Virology* **73**: 3115-3124

- Shapiro, G. I; Krug, R. M.** (1988). Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J. Virology* **62**: 2285-2290
- Shimizu, K.;** Iguchi, A.; Gomyou, R.; Ono, Y. (1999). Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology* **254**: 213-219
- Siemering, K. B.;** Golbik, R.; Sever, R.; Haseloff, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* **12**: 1653-1663
- Skehel, J. J.** (1972). Polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells. *Virology* **49**: 23-36
- Skehel, J. J.;** Schild, G. C. (1971). The polypeptide composition of influenza A viruses. *Virology* **44**: 396-408
- Smid, A.;** Finsterer, M; Grummt, I. (1992). Limited proteolysis unmask specific DNA-binding of the murine RNA polymerase I-specific transcription termination factor TTFI. *J. Mol. Biol.* **227**: 635-647
- Stephenson, J. R.;** Dimmock, N. I. (1974). Inhibition of the processing of ribosomal RNA in avian cells infected with an influenza virus. *Biochem-Biophys-Acta* **361**: 198-208
- Strayer, David S.** (1996). SV40 as an effective gene transfer vector *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**: 24721-24746
- Surgrue, R. J.;** Hay, A. J. (1991). Structural characteristics of the M2 protein of the influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* **180**: 617-624
- Tchatalbachev, S. D.,** 2000. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Thierry, F.;** Danos, O. (1982). Use of specific single stranded DNA probes cloned in M13 to study the RNA synthesis of four temperature-sensitive mutants of HK/68 influenza virus. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2925-2938
- Tiley, L. S.;** Hagen, M.; Mathews, J. T.; Krystal, M. (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J. Virology* **68**: 5108-5116
- Toyoda, T.;** Adyshev, D. M.; Kobayashi, M.; Iwata, A; Ishihama, A. (1996). Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J. Gen. Virology* **77**: 2149-2157
- Ulmanen, I.;** Broni, B. A.; Krug, R. M. (1981). Role of two of the influenza virus core P protein in recognizing cap I structure (m⁷GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7355-7359
- Ulmanen, I.;** Broni, B. A.; Krug, R. M. (1983). Influenza virus temperature-sensitive cap (m⁷GpppNm)-dependent endonuclease. *J. Virology* **45**: 27-35

- Varghese, J. N.;** Laver, W. G.; Colman, P. M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9°A resolution. *Nature* **303**: 35-40
- Vogelstein, B.;** Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619
- Wang, P.;** Palese, P.; O'Neil, R. E. (1997). The NPI-1/NPI-3 (karyopherin α) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J. Virology* **71**: 1850-1856
- Webster, R. G.;** Brown, L. E.; Laver, W. G. (1984). Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies. *Virology* **135**: 30-42
- Webster, R. G.;** Hinshaw, V. S.; Laver, W. G. (1982). Selection and analysis of antigenic variants of the neuraminidase of N2 influenza viruses with monoclonal antibodies. *Virology* **117**: 93-104
- Whittacker, G.;** Bui, M.; Helenius, A. (1996). The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell Biol.* **6**: 67-71
- Wolf, T.;** O'Neill, R. E.; Palese, P. (1998). NS1-binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J. Virology* **72**: 7170-7180
- Yamanaka, K.;** Ogasawara, N.; Yoshikawa, H.; Ishihama, A.; Nagata, K. (1991). In vivo analysis of the promoter structure of the influenza virus RNA genome using a transfection system with an engineered RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**: 8141-8146
- Yasuda, J.;** Nakada, S.; Kato, A.; Toyoda, T.; Ishihama, A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**: 294-255
- Yewdell, J. W.;** Hackett, C. J. (1989). Specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses. In: Krug, R. M. ed. *The Influenza viruses*. New York. Plenum Press: 361-429
- Young, R. J.;** Content, J. (1971). 5'-terminus of influenza virus RNA. *Nature New Biol.* **230**: 140-142
- Zebedee, S. L.;** Lamb, R. A. (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virology* **62**: 2762-2772
- Zhou, Y.;** König, M.; Hobom, G.; Neumeier, E. (1998). Membran-anchored incorporation of foreign protein in recombinant influenza virions. *Virology* **246**: 83-94
- Zobel, A.;** Neumann, G.; Hobom, G. (1993). RNA Polymerase I catalysed transcription of insert viral cDNA. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3607-3614
- Zürcher, T.;** de la Luna, S.; Saz-Ezquerro, J. J.; Nieto, A.; Ortin, J. (1996). Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negativ mutant. *J. Gen. Virology* **77**: 1745-1749

Zylka, M. J.; Schnapp, B. J. (1996). Optimized filter set and viewing conditions for the S65T mutant of GFP in living cells. *BioTechniques* **21**: 220-226

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend entnommen wurden, habe ich durch Quellenangaben kenntlich gemacht.

Diese Arbeit oder Teile davon haben noch keiner anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegen.

Maysa Azzeh

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dr. G. Hobom für den mir zur Verfügung gestellten Laborplatz und Thema und die ständige Diskussionsbereitschaft, die für das Gelingen dieser Arbeit wichtig waren.

Ich danke Prof. Dr. T. Chakraborty für die Bereitschaft, als zweiter Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Dr. R. Flick danke ich für die Betreuung zu Beginn dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Dr. Flick und S. Tchatalbachev für den Gedanken- und Erfahrungsaustausch während dieser Arbeit.

Noelia Pohl, Ulrike Ruppert und Susanne Heck danke ich für ihre technische Hilfe. Susanne Heck möchte ich weiterhin für die Sequenzierungen der zahlreichen Klone und PCR-Produkte, vor allem bei der RACE-Analyse, danken.

Aus unserem Labor und den Nachbar-Labors möchte ich mich bei S. Tchatalbachev, S. Lutz, J. Sauer, A. Irmeler (vor allem für die langen „angenehmen“ Labor-Nächte), Yan Zhou, Jessica Wagner, Peter Jackstadt, Jens Kriese, Manuella, Abdulmawjud, Amer, Malek und Kerstin bedanken.

Prof. Dr. K. Forchhammer, Prof. Dr. M. Kröger und Prof. Dr. Klug möchte ich für die Ermöglichung meiner Arbeit im Labor 532 nach dem Umzug zum IFZ danken.

Elisabeth Passarge und Daniel Saarbourn möchte ich für die Hilfe beim Scannen meiner GFP-Bilder danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Freunden, Bekannten und Verwandten in Deutschland und außerhalb in der Ferne bedanken, die mein Leben in Deutschland einfach gemacht haben:

Meinen Eltern, meinen Schwestern und meinem Bruder für die Unterstützung während meines 10-jährigen Aufenthaltes in Deutschland. Musa für seine Geduld und die Unterstützung in all den Jahren. Marina und Jürgen Groß für alles, was sie für mich getan haben, soviel, dass ich es nicht aufzählen kann. Marina möchte ich vor allem für Leihgabe des Druckers, Kristen Reynolds für die Leihgabe des Computers danken. Dazu Sahar, Samar, Reema, Ruba, Yvonne, Dörte, Veronique, Stephanie, Vera, Carola, Iara, Kristen, Nahla, Aishy, Knut, Zina, Ahamd Aldam und alle anderen Ahmads und Muhammads, Maeve, Ella, Jochen, Jan-Jacob, Foad, Susanna, Amal, Iman. Elisabeth, Christel und Rainer für die angenehme Freundschaft und Nachbarschaft.

Dem DPSG-Team (katholische Pfadfinder-Schwanheim-Frankfurt), vor allem bei den Freunden Silvia, Regina, Angelika und Martina, bei Peter und Volker Kneisel für die schönen und gelungenen Zeltlager.

Dem Einrad-Hockey-Team in Frankfurt (Radlos Lila und Gelb), vor allem Joachim, Conny, Elke, Betty, Ulla, Robert, Günther und Meike. Das Einrad-Hockey-Spielen war die beste Ablenkung von den Laborsorgen und gab mir immer neue Power.

Maysa Azzeh, August 2000