

**Das Virusprotein 1 des Virus der infektiösen Bursitis  
besitzt RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ursula Ingrid von Einem

**Aus dem**

Institut für Virologie am Fachbereich Veterinärmedizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

**und dem**

Institut für Molekularbiologie am Friedrich-Loeffler Institut

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Insel Riems

Betreuer: PD Dr. Egbert Mundt

**Das Virusprotein 1 des Virus der infektiösen Bursitis besitzt  
RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Ursula Ingrid von Einem**

Tierärztin aus Saarbrücken

Gießen, 2006

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan:**

**Prof. Dr. Manfred Reinacher**

**Gutachter:**

**Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel**

**PD Dr. Egbert Mundt**

**Tag der Disputation: 24.02.2006**

für Helena und Lea

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Virusstamm	15
2.2 Zelllinien und Kulturbedingungen	15
2.3 Bakterienstämme	16
2.4 Bakteriophagen	16
2.5 Plasmide	16
2.6 Radioaktive Substanzen	17
2.7 DNA-/Protein-Marker	17
2.8 Chemikalien	17
2.9 Enzyme	19
2.10 Antikörper	20
2.11 Kits	20
2.12 Geräte und Laborhilfsmittel	20
2.13 Lösungen, Medien und Puffer	21
2.13.1 Zellkultur	21
2.13.2 Bakterienkultur	22
2.13.3 Puffer und Lösungen	23
2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion	30
2.15 Indirekte Immunfluoreszenz	31
2.15.1 In Sf9-Zellsuspension	31
2.15.2 In BHK-21 Zellkultur	31
2.16 Bakterielle Expression und Reinigung der Proteine MBP und MBP-VP1	32
2.17 Faktor Xa-Spaltung der bakteriell exprimierten Proteine MBP und MBP-VP1	33
2.18 Umsalzen der bakteriell exprimierten Proteine MBP und MBP-VP1	33
2.19 Virusvermehrung in Sf9-Zellen	33
2.20 DNA-Transfektion in Sf9-Zellen	33
2.21 Expression von Fremdproteinen in Sf9-Zellen und Herstellung von Zelllysaten	34
2.22 <i>In vitro</i> -Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität	35
2.22.1 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1	35
2.22.2 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1	35

<b>2.23</b>	Inkubation der Reaktionsprodukte der Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität mit RNasen	<b>36</b>
<b>2.24</b>	<i>In vitro</i> -Transkription von RNA	<b>37</b>
<b>2.24.1</b>	RNA für Transfektion in Zellkultur	<b>37</b>
<b>2.24.2</b>	RNA für Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität	<b>37</b>
<b>2.24.3</b>	Radioaktiv markierte RNA für Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität	<b>38</b>
<b>2.25</b>	Transfektion von cRNA in Zellkultur	<b>39</b>
<b>2.26</b>	DNA-Sequenzierung	<b>39</b>
<b>2.26.1</b>	DNA-Sequenzierung mit T7 Sequenase v2.0 7-deaza-dGTP sequencing kit	<b>39</b>
<b>2.26.2</b>	DNA-Sequenzierung mit Thermo Sequenase labeled primer cycle sequencing-Kit	<b>40</b>
<b>2.27</b>	Ligation von DNA-Fragmenten	<b>41</b>
<b>2.28</b>	Ortsgerichtete Mutagenese	<b>42</b>
<b>2.29</b>	Herstellung kompetenter TB1-Zellen	<b>44</b>
<b>2.30</b>	Transformation kompetenter Bakterien	<b>45</b>
<b>2.30.1</b>	Bakterienstamm Top10F (Invitrogen)	<b>45</b>
<b>2.30.2</b>	Bakterienstamm TB1	<b>45</b>
<b>2.30.3</b>	Bakterienstamm XL1 Blue und CJ236	<b>45</b>
<b>2.31</b>	Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	<b>46</b>
<b>2.31.1</b>	Schnellpräparation	<b>46</b>
<b>2.31.2</b>	Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Biorad)	<b>46</b>
<b>2.32</b>	Restriktionsenzymspaltungen	<b>47</b>
<b>2.33</b>	Agarosegelelektrophorese	<b>47</b>
<b>2.34</b>	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	<b>47</b>
<b>2.35</b>	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	<b>48</b>
<b>2.36</b>	Herstellung von Proteinproben aus embryonalen Hühnerzellen für den Western Blot	<b>48</b>
<b>2.37</b>	Western Blot	<b>49</b>
<b>2.38</b>	Rechnerprogramme	<b>49</b>
<b>2.39</b>	Oligonukleotide	<b>50</b>

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b> Bakterielle Expression und Reinigung des Fusionsproteins MBP-VP1	<b>51</b>
<b>3.1.1</b> Konstruktion des rekombinanten Expressionsplasmids pMAL-VP1	<b>51</b>
<b>3.1.2</b> Expression und Reinigung des Fusionsproteins MBP-VP1	<b>53</b>
<b>3.2</b> Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1	<b>57</b>
<b>3.2.1</b> Herstellung eines cDNA-Konstrukts für Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1	<b>57</b>
<b>3.2.2</b> Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1	<b>59</b>
<b>3.3</b> Expression des VP1 des IBDV, eines mutierten VP1 (VP1-D416A) und des NS5B des Hepatitis C Virus in Baculovirus-infizierten Insektenzellen	<b>60</b>
<b>3.3.1</b> Konstruktion von rekombinanten Plasmiden zur Baculovirus-Expression des VP1 und eines mutierten VP1 (VP1-D416A)	<b>60</b>
<b>3.3.2</b> Generierung von rekombinanten Baculoviren zur Expression des VP1 und eines mutierten VP1 (VP1-D416A)	<b>64</b>
<b>3.4</b> Die Mutation D416A im VP1 verhindert die Generierung von infektiösem IBDV	<b>68</b>
<b>3.5</b> Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1	<b>70</b>
<b>3.5.1</b> Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1	<b>70</b>
<b>3.5.2</b> Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 mit radioaktiv markierter cRNA	<b>72</b>
<b>3.5.3</b> Charakterisierung der Reaktionsprodukte der RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1	<b>74</b>
<b>3.5.4</b> Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1	<b>76</b>
<b>3.5.5</b> Untersuchungen zur Abhängigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 von Mg <sup>2+</sup> -Ionen	<b>78</b>

<b>4. Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>6. Summary</b>	<b>92</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>8. Abkürzungen</b>	<b>109</b>

## 1. Einleitung

Die infektiöse Bursitis (Englisch: infectious bursal disease; IBD) ist eine hochkontagiöse Viruserkrankung des Hühnergeflügels, die durch ein relativ unspezifisches Krankheitsbild gekennzeichnet ist. Bei der Erstbeschreibung durch Cosgrove [20] wurde die Erkrankung aufgrund der makroskopisch-anatomischen Befunde zunächst als aviäre Nephritis bezeichnet. Da das am stärksten morphologisch und funktionell beeinträchtigte Organ neben anderen lymphatischen Organen jedoch die Bursa Fabricii (BF) ist [52], hat sich die Bezeichnung „infektiöse Bursitis“ durchgesetzt. Die ersten Fälle dieser Erkrankung traten in der Nähe der kleinen Stadt Gumboro im Bundestaat Delaware der Vereinigten Staaten von Amerika auf. Daher wird sie auch als „Gumboro“-Krankheit bezeichnet.

Die höchste Empfänglichkeit für eine Infektion mit klinischen Zeichen besteht bei Küken im Alter von drei bis sechs Wochen. Es wurden allerdings klinische Fälle bis zu einem Alter von maximal zwanzig Wochen beobachtet [63] [88]. Leichte Legerassen waren empfänglicher für die Erkrankung als die schweren Broilerrassen [15] [41] [123]. Es wurde beschrieben, dass die Übertragung horizontal und meist auf dem oro-fäkalen Weg erfolgte [125]. Infizierte Tiere waren nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Tagen matt, zeigten gesträubtes Gefieder und wässrige Diarrhöe [20]. Die Morbiditäten waren meist hoch, während die Mortalität abhängig von der Virulenz des Virusstammes bis zu 80 % betrug [6]. Bei nicht letalen Krankheitsverläufen und bei älteren Tieren, die mildere Verlaufsformen entwickelten, entstand eine humorale Immunsuppression infolge der Depletion der proliferierenden B-Zellen in der BF [16]. Die Ausprägung der Immunsuppression war um so stärker, je jünger die infizierten Tiere waren [33]. Nach überstandener Infektion mit einem virulenten Stamm des Virus der Infektiösen Bursitis (Englisch: infectious bursal disease virus; IBDV) waren die Tiere insbesondere gegenüber fakultativ pathogenen Keimen anfälliger (z.B. *Salmonella* spp. [95] und *E. coli*-Stämmen [101]). Außerdem bildeten diese Tiere nach Vakzinationen gegen andere Pathogene häufig keinen ausreichend schützenden Antikörpertiter aus, was zu erheblichen Verlusten bei Infektionen mit den entsprechenden Erregern führen kann. Dies wurde am Beispiel des Newcastle Disease Virus eindrucksvoll gezeigt [34]. Aus den Schäden, bedingt durch die Immunsuppression und den letal verlaufenden Erkrankungen, ergibt sich die wirtschaftliche Bedeutung der IBD in der Geflügelindustrie. Eine gezielte Bekämpfung war nach Ansicht von Saif [102] zur Reduzierung der Schäden und zur Erhaltung der Tiergesundheit unerlässlich.

Für die makroskopische Pathologie der IBD wurde in der Anfangsphase eine geschwollene BF, geschwollene Nieren, Ekchymosen in der Muskulatur und der Mukosa des Proventrikulus als charakteristisch beschrieben. Die Schwellung der BF wandelte sich zu einem späteren Zeitpunkt in eine mehr oder weniger starke Atrophie der BF. Es wurde infolge des Durchfalls auch eine generalisierte Dehydrierung beschrieben [71] [110] [126]. Mikroskopisch ließen sich Läsionen hauptsächlich in der BF, Milz, Thymus und Niere beobachten [43]. In den Lymphfollikeln der BF kam es bei einer IBDV-Infektion von drei bis sechs Wochen alten Küken ohne schützende Antikörper zu lymphozytären Nekrosen und massiven Infiltrationen durch mononukleäre Zellen, die letztlich zu einem Verlust der Struktur aus Rinde und Mark führten [12] [99] [131]. Hämorrhagische Läsionen konnten ebenfalls beobachtet werden [12]. Je nach Schwere der Schädigung in der BF wurden Punkte von 0 (unveränderte BF) bis 4 (schwere Veränderungen in der BF) vergeben [43]. Ähnliche Vorgänge wurden in weniger starker Ausprägung sowohl in Milz, Thymus als auch Niere infizierter und ungeschützter Tiere beobachtet [43].

Nach einer peroralen Infektion von Hühnerküken mit IBDV waren bereits nach vier bis fünf Stunden Viren in darmassoziierten Makrophagen und lymphatischen Zellen zu finden [52]. Hier erfolgte eine erste virale Replikation, die eine Virämie zur Folge hatte. Im Zuge dieser Virämie wurde die BF erreicht. In diesem Organ fand eine zweite Virusvermehrung statt, der eine weitere Virämie folgte. Das IBDV vermehrt sich bevorzugt in proliferierenden B-Zellen in der BF [74]. Die Replikationsfähigkeit in anderen lymphatischen Organen war deutlich geringer ausgeprägt [108] [121] [122]. Bei bursektomierten Tieren wurden keine Krankheitssymptome erzeugt, weil das Zielorgan des IBDV fehlte [52]. Auch die Tatsache, dass bei Küken bis zu einem Alter von drei Wochen keine klinischen Fälle beobachtet wurden [44], läßt sich durch die bevorzugte Replikation des IBDV in der BF erklären, da dieses Organ zwischen der dritten und sechsten Lebenswoche seinen höchsten Entwicklungsgrad erreicht hat und somit für eine massive Replikation des IBDV zur Verfügung steht.

Für das IBDV wurde eine hohe Tenazität beschrieben. Es war sehr stabil gegen Hitze, UV-Licht und photodynamische Inaktivierung [93]. Außerdem bestand eine Resistenz gegen Lösungsmittel wie Ether und Chloroform. Das Virus war empfindlich gegen Aldehyde und Natriumhydroxid und wurde bei einem pH von 12 völlig inaktiviert, nicht jedoch bei pH 2 [9]. Impfungen waren und sind daher die einzige wirksame Maßnahme, um den Ausbruch einer klinischen Erkrankung zu unterbinden.

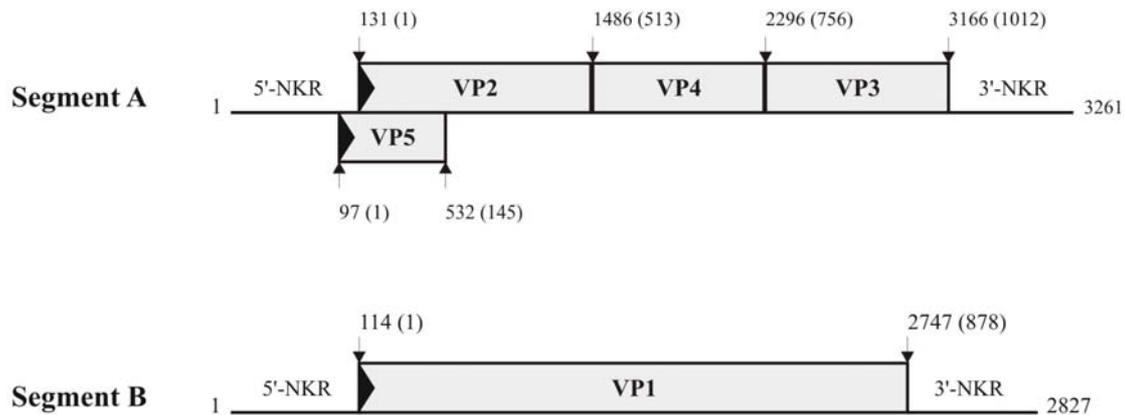
Die meisten IBDV-Feldisolate, insbesondere Isolate von sehr virulenten Stämmen, waren zunächst nicht in Zellkultur vermehrbar. Es bedurfte meist einiger Passagen in Zellkultur [40] oder Eipassagen [130] um eine Zellkulturadaptation zu erreichen.. Es wurde gezeigt, dass für diese Adaptation von IBDV an Zellkulturen die Aminosäureaustausche 253 Q→H und 284 A→T oder nur der Austausch der Aminosäure 284 im Virusprotein (VP) 2 notwendig waren [79]. Nach der Zellkulturadaptation von IBDV war eine Attenuierung der Viren *in vivo* zu beobachten [21] [40] [61] [130]. Der Replikationszyklus der IBDV war in Säugerzelllinien etwas verzögert gegenüber dem in Geflügelzellkulturen [48] [54]. Die maximale Virusbindung an kultivierte Zellen war nach sieben bis fünfundsiebzig Minuten erreicht [54] [66]. Nach 90 Minuten waren die ersten IBDV-spezifischen Proteine in den infizierten Zellen nachweisbar und bereits vier bis acht Stunden *post infectionem* befanden sich neugebildete infektiöse Viruspartikel im Zellkulturüberstand [75] [86]. Durch die Entwicklung von reversen genetischen Systemen für das IBDV [83] und das Virus der infektiösen Pankreasnekrose der Salmoniden (IPNV) [132] können Studien über Determinanten der Replikation dieser Viren in Zellkultur durchgeführt werden. Dies ermöglicht eine zielgerichtete Charakterisierung des Einflusses von spezifischen Mutationen im Genom der Viren.

Die Klassifizierung des IBDV in die Familie der *Birnaviridae* erfolgte 1984 [13]. Diese Virusfamilie besteht aus morphologisch, biophysikalisch und genetisch ähnlichen Viren mit einem bisegmentalen, doppelsträngigen (Englisch: double-stranded; ds) RNA-Genom [24]. Nach dem Wirtsspektrum der Viren wird die Familie der *Birnaviridae* in drei Genera unterteilt:

1. Genus *Aquabirnavirus*; Typvirus: Virus der infektiösen Pankreasnekrose der Salmoniden (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV);
2. Genus *Avibirnavirus*; Typvirus: Virus der infektiösen Bursitis der Hühner (infectious bursal disease virus, IBDV);
3. Genus *Entombirnavirus*; Typvirus: Drosophila X-Virus (DXV).

Es wurden bisher zwei Serotypen des IBDV beschrieben, die durch einen Serumkreuzneutralisationstest voneinander unterschieden wurden [72]. Nur IBDV des Serotyp I sind in der Lage eine Erkrankung bei Hühnern auszulösen. IBDV des Serotyp II wurden bei Hühnern, Puten und Enten isoliert und waren avirulent [7] [46] [50] [51] [72].

Aufgrund unterschiedlicher Virulenzen und Antigenitäten wurden IBDV-Stämme in virulente, sehr virulente und variante Stämme unterteilt. Die bis Mitte der achtziger Jahre beschriebenen Stämme waren durch eine Mortalität bei empfänglichen drei bis sechs Wochen alten SPF-Küken mit bis zu 80 % beschrieben [6]. Sie konnten aber durch Immunisierung beherrscht werden. Seit Mitte der achtziger Jahre kam es in Europa zum Auftreten von IBDV-Stämmen, die ein beträchtlich höheres Virulenzpotential besaßen [14]. Diese IBDV-Stämme waren zwar antigenetisch nicht von den klassischen Stämmen zu unterscheiden, besaßen aber die Fähigkeit, trotz bestehender Titer von maternalen Antikörpern, in kommerziellen Küken klinische Symptome der Erkrankung auszulösen, bei denen die bis dahin beschriebenen Stämme keine Klinik auszulösen vermochten. Die neuen Stämme wurden als „very virulent“ IBDV beschrieben und haben sich seitdem weltweit verbreitet (Asien [84], Südamerika [25] und Afrika [29]). Im gleichen Zeitraum wurden in den USA neue IBDV-Stämme isoliert, die Mortalitätsraten bis zu 5 % auslösten [100], sich aber antigenetisch von den bis dahin bekannten unterschieden [111]. Diese wurden als variante IBDV bezeichnet.



**Abb.1: Genomorganisation des IBDV, Stamm P2**

Das Segment A kodiert für ein Polyprotein, welches durch das VP4 autoproteolytisch in die viralen Proteine (VP) 2, 4 und 3 gespalten wird. Die Spaltstellen zwischen den einzelnen viralen Proteinen wurden mit einem nicht ausgefüllten Pfeil gekennzeichnet und die Aminosäuren (As) angegeben. In einem weiteren offenen Leserahmen wird auf diesem Segment das VP5 kodiert. Das Segment B kodiert für das VP1.

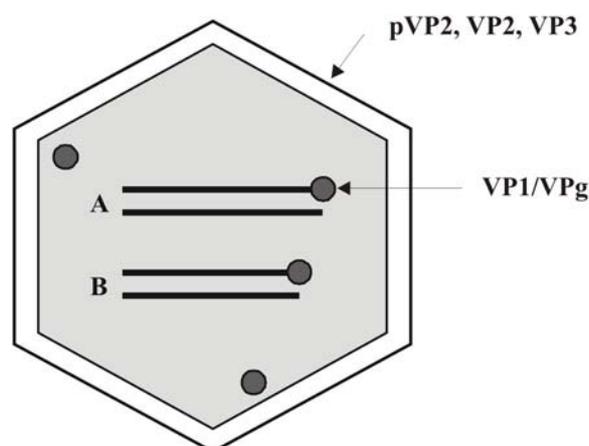
Die Nukleotidpositionen für die Start- und Stoppcodons der viralen Proteine bzw. des Polyproteins sind angegeben und mit ausgefüllten Pfeilen markiert. In Klammern erscheinen die Aminosäurepositionen der amino- und carboxyterminalen Enden der viralen Proteine bzw. des Polyproteins. (siehe nach: [24])

Das Genom des IBDV besteht aus zwei Segmenten doppelsträngiger RNA [77] (Abb. 1). Diese Segmente werden im 5'- und 3'-Bereich von terminalen nichtkodierenden Regionen (NKR) flankiert, deren Sequenzen von Mundt und Müller [82] für mehrere Virusstämme bestimmt wurden. Die NKR-Sequenzen waren nicht sehr stark konserviert, obwohl sie am extremen 5'-Ende große Homologien zwischen den Segmenten A und B aufwiesen. Die vorhergesagte Sekundärstruktur der NKR ist zwischen den beiden IBDV-Serotypen unterschiedlich [82].

Auf dem größeren Segment A des Stammes P2, welches 3261 Basenpaaren (bp) besitzt, werden die Virusproteine 2, 4 und 3 als Polyprotein in einem großen offenen Leserahmen (ORF) in der genannten Reihenfolge kodiert [82] (Abb. 1). Dieses Polyprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa wird ko- und posttranslational in die einzelnen Proteine prozessiert, wobei die virale Protease VP4 für diese Spaltung verantwortlich ist [10] [62]. VP4 ist eine ATP-unabhängige nicht-kanonische Lon-Protease mit einer katalytischen Dyade bestehend aus den Aminosäuren Ser652 und Lys692 [10].

Im ersten Spaltungsschritt entsteht ein unreifes VP2 (pVP2) von ca. 48 kDa, das VP4 selbst (28 kDa) und das VP3 (32 kDa). In einem zweiten Schritt, vermutlich erst nach der Kapsidbildung, wird dann die C-terminale Region des pVP2 weiterprozessiert und das nun reife VP2 mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa erzeugt [3] [24] [54] [75]. Dabei ist unklar, ob dieser Prozess durch virale oder zelluläre Komponenten beeinflusst wird. Kibenge *et al.* [56] vermuteten, dass keine zellulären Proteine beteiligt sind. Die Spaltstellen zwischen dem pVP2 und dem VP4 an der Stelle 512Ala/513Ala bzw. dem VP4 und dem VP3 an der Stelle 755Ala/756Ala wurden durch N-terminale Sequenzierung der Spaltprodukte nach procaryotischer Expression nachgewiesen [94].

VP2 und VP3 sind mit ihren 51 bzw. 40 % Anteilen am viralen Gesamtprotein die Hauptstrukturproteine des ikosaedrischen Kapsids [27] [31]. Das VP2 bildet vermutlich die äußere Schicht des Kapsids [11], welches einen Durchmesser von etwa 60nm aufweist [54]. Im VP2 befindet sich eine variable Region, in der konformationsabhängige Epitope für virusneutralisierende Antikörper positioniert sind [31] [32] [42] [90] [105] [111] [112]. Es wurde vermutet, dass sich durch einzelne Aminosäureaustausche in dieser Region die Antigenität des VP2 und damit die Virusneutralisation ändert [30] [49]. In diesem Sequenzabschnitt befinden sich auch die Aminosäuren 253 und 284, die für eine Zellkulturadaptation von IBDV verantwortlich waren [79].



**Abb.2: Schematische Darstellung des Virions des IBDV**

Die Virusproteine pVP2, VP2 und VP3 bilden das virale Capsid, in dessen Inneren die beiden doppelsträngigen RNA-Segmente A und B verpackt sind. Das VP1 ist kreisförmig in freier und in der VPg-Form, gebunden an die dsRNA-Segmente, dargestellt.

Das VP3 scheint neben der Bildung der inneren Kapsidschicht [11] auch für die Replikation von Bedeutung zu sein und interagiert sowohl mit dsRNA [18] [57] als auch mit VP1 [64] [119] [120]. Sehr wahrscheinlich ist die Interaktion des VP3 mit VP1 verantwortlich für den Einbau von VP1 in das Virion [120], der dabei unabhängig von einer gleichzeitigen Bindung an dsRNA ist [70]. Im VP3 sind serotyp- und subgruppenspezifische Epitope identifiziert worden [7] [69], die jedoch bei Vakzination mit in einem heterologen System erzeugtem VP3 keine belastbare Immunität induzierten [96]. Durch Zusammenlagerung von VP2 und VP3 im Zytoplasma entstehen häufig sogenannte Typ I-Tubuli, die aus regelmäßig geformten, 60 nm großen, virionähnlichen Untereinheiten bestehen [39] [91]. Ihre Funktion ist bisher unklar.

Die Funktion des VP4 als Protease des IBDV wurde durch die Untersuchungen von Birghan *et al.* im Jahr 2000 aufgeklärt [10]. Der Bildung von Typ II-Tubuli durch Zusammenlagerung von VP4-Molekülen unabhängig von Virionen im Zytoplasma und Nukleus von IBDV-infizierten Zellen wurde bisher keine Funktion zugewiesen [37].

In einem zweiten offenen Leserahmen des Segments A, der den des Polyproteins im N-terminalen Bereich überlappt, wird ein weiteres Protein (VP5) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 16,5 kDa kodiert [5] [80] [116]. Dieses Protein wurde in IBDV-infizierten Zellen und in Bursen von infizierten Küken nachgewiesen. Es besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 21 kDa und ist sehr wahrscheinlich neben dem VP4 ein Nichtstrukturprotein [80]. Das VP5 war weder für die virale Replikation in der Zellkultur [81], noch für die Replikation im Hühnerküken essentiell [131]. Lombardo *et al.* [65] zeigten, dass VP5 eventuell eine Funktion bei der Desintegration der Zellmembran spielt. VP5 wird wahrscheinlich über den Exozytoseweg an die Zellmembran von infizierten Zellen transportiert, um dort als sogenanntes "death protein" die Zellmembran zu verändern und den Austritt von Virionen zu ermöglichen [65].

Das kleinere Segment B des Stammes P2 besitzt 2827 bp [82] und kodiert in einem großen offenen Leserahmen für das VP1. Für dieses Protein wurde für den IBDV-Stamm P2 ein theoretisches Molekulargewicht von 98 kDa berechnet [78]. Das VP1 ist zwischen den verschiedenen IBDV-Stämmen hochkonserviert [55] [133]. Im viralen Partikel wurde VP1 im Vergleich zu den Strukturproteinen VP2 und VP3 in geringer Menge nachgewiesen [27]. Lombardo *et al.* zeigten 1996 eine Bindung an das VP3 im Inneren des Kapsids [64].

Außerdem wurde ein Protein mit einem ähnlichem Molekulargewicht beobachtet, bei dem es sich wahrscheinlich um das VP1 handelt, das mit beiden Segmenten (A und B) verbunden war und diese zirkularisierte [76]. Bei IPNV wurde eine Bindung des VP1 an die 5'-Enden der dsRNA-Segmente nachgewiesen [26]. Die Funktion dieser Bindung blieb unklar. Das VP1 könnte als "Proteinprimer" der RNA-Synthese in einem semikonservativen Mechanismus der RNA-Transkription dienen. Diese Proteinprimerfunktion wurde für das VPg von Picornaviren, das ebenfalls am 5'-Ende der viralen RNA bindet, gezeigt [92]. Als weitere Möglichkeit käme der Schutz der RNA vor dem Abbau durch zelluläre Proteine in Frage. Bei Plusstrang-RNA Viren wird diese Funktion von 5'-CAP und 3'-PolyA-Strukturen übernommen [4], welche beim IBDV bisher nicht nachgewiesen wurden.

Das VP1 weist Homologien zu viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRp) auf [35] [36] [73] [97] [109]. Matrizen-abhängige Polynukleotid-Polymerasen spielen im Replikationszyklus von Viren eine entscheidende Rolle [36]. Als Matrize dieser Enzyme können sowohl DNA als auch RNA dienen. Als Produkte der Polymeraseaktivität sind ebenfalls beide Arten von Nukleinsäure bekannt [23].

Unterschieden werden nach Matritze und Produkt 4 Typen von Polymerasen [89]:

1. DNA-abhängige DNA-Polymerasen (DdDps), welche die Replikation der DNA-Genome zellulärer Organismen und vieler DNA-Viren bewerkstelligen [36];
2. DNA-abhängige RNA-Polymerasen (DdRps);
3. RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRps), die von RNA-Viren ohne DNA-Phase im Replikationszyklus genutzt werden [36];
4. RNA-abhängige DNA-Polymerasen (reverse Transkriptasen [RTs]), die bei RNA-Viren mit DNA-Phase im Replikationszyklus zu finden sind [36].

Aus Kristallisationsstudien war bekannt, dass die meisten Polymerasen die Struktur einer gewölbten rechten Hand aufweisen, die drei strukturelle Komponenten aufweist: je eine Daumen-, Finger- und Handflächen-Domäne [38] [58] [87] [89]. Trotz relativ geringer Konservierung der Aminosäuresequenzen von Polymerasen ließen sich insbesondere in der Handflächenregion vier hochkonservierte Motive nachweisen [23] [97]. Die Motive A, B und C (bzw. IV, V und VI) waren am stärksten konserviert [97]. Die Funktionen dieser Motive sind nur zum Teil bekannt.

So sind die Motive A (Aminosäuren: DX<sub>4-5</sub>D) und C (Aminosäuren GDD) verantwortlich für die Bildung einer Bindungsstelle für zwei Magnesiumionen, wobei auch andere zweiwertige Ionen gebunden werden. Diese Ionen fixieren wahrscheinlich das abgespaltene Pyrophosphat beim Einbau eines neuen NTPs in das entstehende RNA-Molekül [87] [118]. Diese Funktion gilt als essentiell für die Polymeraseaktivität [87] [97] [118]. Das Motiv B ist eventuell verantwortlich für die Unterscheidung zwischen NTPs und dNTPs [87]. Das Motiv C (auch als Motiv C bezeichnet) wurde im VP1 der Birnaviren bisher noch nicht verlässlich identifiziert. Da beim VP1 von IBDV [36] [109] und IPNV [28] das klassische GDD-Motiv fehlt, ist fraglich, welches Motiv seine Aufgabe bei diesen Polymerasen übernehmen könnte. Beim VP1 des IBDV befinden sich stromabwärts der gut konservierten Motive A und B an zwei Stellen im Protein jeweils zwei Aspartatmoleküle, die als Kandidaten für das Motiv C in Frage kommen könnten [109]. Die strukturellen Gegebenheiten der beiden Regionen um die Asp-Asp-Sequenzen stimmen in Sekundärstrukturvorhersagen jedoch nicht mit denen anderer RdRp überein. Die Umgebung des Motivs C der RdRp des Bakteriophagen phi6 war allerdings in den Sekundärstrukturvorhersagen ebenfalls nicht mit der bisher bekannten RdRp-Struktur in Übereinstimmung zu bringen [109]. Die Strukturanalyse von Kristallen des Proteins VP2 des Phagen phi6 ergab jedoch eine Ähnlichkeit zur allgemein angenommenen RdRp-Struktur [17] [109]. Ähnliches könnte auch für das VP1 von Birnaviren zutreffen. Gorbalenya *et al.* postulierten 2002 für das VP1 von Birnaviren eine Verlagerung und Mutation des Motives C anhand von computergestützten Analysen [36]. Diese gingen davon aus, dass sich das Motiv C stromaufwärts der Motive A und B befindet, die Aminosäuresequenz Ala-Asp-Arg aufweist und somit das VP1 eine andere Faltung zeigen würde, als die bisher bekannten RdRp, wie zum Beispiel die des HCV und des Poliovirus [36]. Spies und Müller (1987) zeigten RdRp-Aktivität an gereinigten Viruspartikeln [115], ohne sie einem spezifischen viralen Protein zuweisen zu können. Die Untersuchungen wurden nach Entfernung von Ca<sup>2+</sup>- und unter Zugabe von Mg<sup>2+</sup>-Ionen durchgeführt, da sonst keine RdRp-Aktivität nachweisbar war. Eine Analyse der Reaktionsprodukte durch Auftrennung in Acrylamidgelen war erst nach Proteinase K-Verdau möglich, was für eine intensive Bindung der Produkte an die Viruspartikel bzw -proteine sprach. Es wurden zwei Reaktionsprodukte beobachtet, die aus einzelsträngiger (Englisch: single-stranded; ss) RNA bzw. dsRNA bestanden und in Hybridisierungsversuchen als virale RNA identifiziert wurden. *In vitro*-Translationsversuche zeigten, dass die ssRNA translatiert wurde und damit *per definitionem* Plusstrang-RNA repräsentiert.

In weiteren Experimenten konnten Spies und Müller [114] an IBDV-Partikeln nachweisen, dass ein virales Protein mit einem Molekulargewicht von 90 kDa radioaktiv markiertes GTP inkorporierte. Diese Bindung war unempfindlich gegen die Behandlung des Reaktionsproduktes mit HCl und NH<sub>2</sub>OH, aber sensitiv gegen NaOH. Dies war ein deutliches Indiz für eine Phosphordiesterbindung zwischen dem GMP und einem Serin- oder Threoninmolekül des 90 kDa Proteins [114] und machte eine Guanylyltransferaseaktivität zum damaligen Zeitpunkt wahrscheinlich. Weitere Untersuchungen zeigten den Einbau von Tritium-markierten Methylgruppen in Trichloressigsäure-präzipitierbares Material aus *in vitro*-Transkriptionsversuchen. Daraus schlossen die Autoren auf Methyltransferaseaktivität des 90 kDa-Proteins VP1 von IBDV [114]. Guanylyl- und Methyltransferaseaktivität sind essentiell für die Bildung von CAP-Strukturen, ohne die mRNA im allgemeinen in der Zelle nicht translatiert wird. Für das VP1 von Birnaviren wurde bisher nur Transkriptaseaktivität nachgewiesen [26] [67], der Nachweis der Bildung von genomischer dsRNA steht noch aus. Das VP1 wurde *in vitro* guanyliert, besaß jedoch keine Guanylyltransferaseaktivität [26] [53] [54] [109]. Es wurde angenommen, dass das VP1 in der Form des VPg die Funktion von CAP-Strukturen bei der Translation von viraler RNA des IBDV übernimmt [68].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das VP1 in heterologen Systemen zu exprimieren und in *in vitro*-Untersuchungen RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität nachzuweisen. Die Etablierung dieser Untersuchungen und damit der Nachweis einer RdRp-Aktivität des VP1 ermöglicht eine weitere biochemische und molekularbiologische Charakterisierung des VP1 und erweitert erheblich den Kenntnisstand über die Replikation des IBDV. Dies kann einerseits interessante Aufschlüsse über die Evolution, Struktur und Ansprüche dieser RdRp geben und andererseits neue Möglichkeiten der Therapie und Vakzination eröffnen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Virusstamm

Der IBDV-Stamm P2 wurde von Schobries *et al.* 1973 aus einem Mastgeflügelbestand isoliert [106]. Anschließend wurde er durch mehrere Passagen in embryonalen Hühner- und Entenzellen attenuiert. Durch einen Virusneutralisationstest war die Zuordnung zum Serotyp I möglich [78].

### 2.2 Zelllinien und Kulturbedingungen

ZELLINIE	HERKUNFT	KULTURBEDINGUNGEN
BGM (Niere, Afrikanische Grüne Meerkatze)	Zellbank der BFAV, Insel Riems (CCLV RIE 136)	MEM, Hanks-Salze, 850 mg NaHCO <sub>3</sub> , 10 % fetales Kälberserum (FKS), Kulturgefäß mit Filterkappe (5 % CO <sub>2</sub> ), 37 °C
BHK-21 (Niere, Hamster)	Zellbank der BFAV, Insel Riems (CCLV RIE 194)	MEM, Hanks-Salze / Earles-Salze 1:1, 850 mg NaHCO <sub>3</sub> , 10 % FKS, Kulturgefäß mit Filterkappe (5 % CO <sub>2</sub> ), 37 °C
HEZ (embryonale Hühnerzellen)	Aus embryonierten SPF-Eiern (Lohmann, Cuxhaven), bereitgestellt durch die Zellbank der BFAV, Insel Riems	Anzuchtmedium: MEM, Hanks-Salze, 850 mg NaHCO <sub>3</sub> , 10 % FKS Erhaltungsmedium: MEM, Hanks-Salze, 850 mg NaHCO <sub>3</sub> , ohne FKS, Kulturgefäß mit Filterkappe (5 % CO <sub>2</sub> )
Sf 9 (Spodoptera frugiperda Klon 9)	Zellbank der BFAV, Insel Riems (CCLV RIE 352)	Graces Insektenmedium, 10 % FKS, 3,3 g/l LAH, 3,3 g/l Hefeextrakt, geschlossenes Kulturgefäß

## 2.3 Bakterienstämme

BAKTERIENSTÄMME	ANTIBIOTIKARESISTENZ (EINGESETZTE KONZENTRATION)
XL1 Blue (Stratagene)	Tetrazyklin (100 µg/ml)
Top10F (Invitrogen)	Keine
CJ236 (BIORAD)	Chloramphenicol (34 µg/ml)
TB1 (NEB)	Streptomycin (100 µg/ml)

## 2.4 Bakteriophagen

VCS M13 (Stratagene)

## 2.5 Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaft / Quelle
pBluescript II SK (pSK)	Phagemid mit T3/T7-RNA-Polymerase-Promotor und F- M13- Phagen Replikationsstart (Stratagene)
pUC18	Klonierungsvektor (Pharmacia Biotech)
pP2A	Vollständige cDNA-Sequenz des Segments A des IBDV-Stammes P2 unter Kontrolle des T7-Promotors in pUC18 [10]
pP2B	Vollständige cDNA-Sequenz des Segments B des IBDV-Stammes P2 unter Kontrolle des T7-Promotors in pUC18 [83]
ΔpP2A	cDNA-Sequenz des Segmentes A des IBDV-Stammes P2 ohne die Nukleotide 201 bis 3020 unter Kontrolle des T7-Promotors in pUC18
pMAL c2	Expressionsvektor mit kodierender Sequenz für Maltose-bindendes Protein (MBP)
pMAL-VP1	Vollständige cDNA-Sequenz der kodierenden Region für das VP1 des IBDV-Stammes pMAL c2

pAcSG2	Baculovirus Transfer Vektor mit Polyhedrin-Promotor (Pharmacia Biotech)
pBacVP1	Vollständige cDNA-Sequenz der kodierenden Region für das VP1 des IBDV-Stammes P2 unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors in pAcSG2
pBacVP1-D416A	Vollständige cDNA-Sequenz der kodierenden Region für das VP1 mit der Mutation D416A des IBDV-Stammes P2 unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors in pAcSG2

## 2.6 Radioaktive Substanzen

[ <sup>35</sup> S]-dATP (10 mCi/ml, 1.000 Ci/mM)	ICN
α-[ <sup>32</sup> P]-UTP (10 µCi/µl, 3.000 Ci/mM)	ICN

## 2.7 DNA-Marker

1 kbp Marker	NEB
100 bp Marker	NEB

## 2.8 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Reinheit/Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid	purum, 2x krist.	ROTH
Aceton	>99,5 %, p.a.	ROTH
Actinomycin D	98 %	SIGMA
Agarose	electrophorese grade	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat	analytical grade	SERVA
Amylose-Resin		NEB
ATP	100 mM	Roche
Benzylpenicillin-Natrium	599 mg (1 Mio. Einheiten)	Grünenthal
Binde-Silan		Pharmacia Biotech
Bromphenolblau		SIGMA

BSA	10 mg/ml	NEB
CTP	100 mM	Roche
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	reinst	SERVA
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat)	>98 %	SIGMA
dATP	100 mM	NEB
dCTP	100 mM	NEB
dGTP	100 mM	NEB
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	research grade	SERVA
Dimethyldichlorsilan		SIGMA
DTT (Dithiothreitol)	100 mM	Promega
dTTP	100 mM	NEB
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	reinst	SIGMA
Essigsäure	100 %, p.a.	ROTH
Ethanol	96 %	ROTH
Ethidiumbromid	reinst	Ferak
Formamid	>99,5 %	ROTH
Glycerin	99,5 %	SIGMA
Glycerol	>99,5 %	Invitrogen
Glycogen	20 mg/ml	Roche
GTP	100 mM	Roche
Harnstoff	99,5 %, p.a.	ROTH
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	>99 %	ROTH
Lipofectin	1 mg/ml	Gibco BRL
Lithiumchlorid	>99 % / 8 M Lösung	SIGMA
Lithiumdodecylsulfat	>99 %	SIGMA
$\beta$ -Mercaptoethanol	research grade	SERVA
Methanol	99,8 %	ROTH
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	2x krist.	ROTH
NaCl	99,5 %	ROTH
Na-Dodecylsulfat (SDS)	>99 %	MERCK
Nonidet P-40 (NP40)		ICN

PMSF (Phenylmethyl-sulfonylfluorid)	>99 %	SIGMA
RNA-CAP-Struktur Analog [m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G]	25 OD Einheiten	NEB
RNasin	40 U/μl	Promega
SeaPlaque GTG Agarose		Biozym
Streptomycinsulfat	700 U/mg	ICN
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	99 %	SIGMA
Trichlormethan (Chloroform)	99 %, p.a.	ROTH
Tris (Tris (hydroxymethyl)aminomethane)	99,9 %	ROTH
UTP	100 mM	NEB
Wasser	RNase frei	Gibco BRL
X-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	>98 %	ROTH
Xylencyanol	75 %	SIGMA

## 2.9 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
DeepVent DNA-Polymerase	NEB
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	NEB
DNase I, RNase frei	Roche
Faktor Xa	NEB
Proteinase K	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	Gibco BRL, NEB
Ribonuklease A (RNase A)	Promega
Ribonuklease I <sub>f</sub> (RNase I <sub>f</sub> )	NEB
Ribonuklease III (RNase III)	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB
T4-DNA-Polymerase	NEB
T4-Polynukleotidkinase	NEB
T7-RNA-Polymerase	Promega

## 2.10 Antikörper

### Antikörper

Meerettich-Peroxydase-konjugierte Ziege anti-Kaninchen IgG

Meerettich-Peroxydase-konjugierte Ziege anti-Maus IgG

monoklonaler Antikörper (Maus) gegen VP2 (IBDV)

polyklonales anti-VP1 Serum vom Kaninchen (Stamm P2; anti-VP1)

polyklonales anti-MBP Serum vom Kaninchen

### Hersteller

SIGMA

SIGMA

PD Dr. E. Mundt,  
BFAV, Insel Riems

PD Dr. E. Mundt,  
BFAV, Insel Riems)

NEB

## 2.11 Kits

### Kit

Baculovirus-Expressionsystem

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate

GLASSMAX DNA Isolation Spin Cartridge System

Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit

T7 Sequenase v2.0 7-deaza-dGTP sequencing kit

Thermo Sequenase labelled primer cycle sequencing kit

### Hersteller

PharMingen, Becton  
Dickinson Company

PIERCE

Gibco BRL

BIORAD

Amersham

LIFE SCIENCE

Amersham

LIFE SCIENCE

## 2.12 Geräte und Laborhilfsmittel

### Gerät/Laborhilfsmittel

BAS MS 2325 (Phosphoimager-Expositionsfolie)

Biofuge 13 (Tischzentrifuge)

Branson Sonifier 450

C25KC-Inkubator Shaker

Centrifuge 5403 (Zentrifuge)

### Hersteller

Raytest,  
Straubenhardt

Grant

Branson

New Brunswick  
Scientific

Eppendorf

Centrifuge 5415 C (Tischzentrifuge)	Heraeus
Centrisart C4	Sartorius AG
Dialyseschlauch VISKING Typ 20/32 MWCO 10.000-20.000	ROTH
Diaphot-Fluoreszenzmikroskop	NIKON
Homogenisator	unbekannt
MINI PROTEAN II (Elektrophoresekammer)	BIORAD
Optiphot-2-Fluoreszenzmikroskop	NIKON
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym
Phosphoimager FLA 3000	Fuji
Primus V 1.01 (Thermocycler)	MWG
Probe Quant G50-Micro Columns	Amersham
	LIFE SIENCE
PROTRAN (Nitrocellulosemembran)	Schleicher&Schuell
PROTEAN IIXi (Elektrophoresekammer)	BIORAD
SW28 Rotor	Beckman
	Instruments
SW40 Rotor	Beckman
	Instruments
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot SD (Elektroblot-Apparatur)	BIORAD
LE 60 (Ultrazentrifuge)	Beckman
	Instruments
X-OMAT AR (Film)	Eastman Kodak

## **2.13 Lösungen, Medien und Puffer**

### **2.13.1 Zellkultur**

MEM (minimal essential medium)	Gibco BRL
OPTI-MEM	Gibco BRL
Hanks-Salze	Gibco BRL
Earles-Salze	Gibco BRL
Grace's Insektenmedium	SERVA

### Versen/Trypsin (Feuchtrypsination)

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
Dextrose	1 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,58 g
Versen	0,2 g
Trypsin	0,2 g
A. dest.	ad 1 l

### **2.13.2 Bakterienkultur**

#### Antibiotika

Ampicillin (ROTH)	10 mg/ml A. dest., sterilfiltriert
Tetracyclin (SERVA)	10 mg/ml Ethanol (absolut)
Chloramphenicol (SERVA)	34 mg/ml Ethanol (absolut)

#### Luria-Bertani Broth (LB)

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
A. dest.	ad 1 l
Autoklavieren	

#### LB-Agar

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar Noble	15 g
A. dest.	ad 1 l
Autoklavieren	

### LB-Rich-Medium

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glukose	2 g
A. dest.	ad 1 l
Autoklavieren	

### SOA-Medium

Bacto-Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,58 g
A. dest.	ad 1 l
Autoklavieren	

### SOB-Medium

Steriles SOA-Medium wird vor Gebrauch mit sterilfiltrierten Lösungen ergänzt (Endkonzentration):

1 M MgCl <sub>2</sub>	(10 mM)
1 M MgSO <sub>4</sub>	(10 mM)

### SOC-Medium

SOB Medium wird vor Gebrauch mit sterilfiltrierter Glukose-Lösung ergänzt (Endkonzentration):

2 M Glukoselösung	(20 mM)
-------------------	---------

## **2.13.3 Puffer und Lösungen**

### 30 % Acrylamid-Stammlösung (SDS-PAGE)

Acrylamid	29 g
N,N'Methylen-bis-acrylamid	1 g
A. dest.	ad 100 ml

Lagerung in lichtundurchlässigen Flaschen

40 % Acrylamid-Stammlösung (SDS-PAGE, Sequenzgele und Gele zur Untersuchung von RdRp-Aktivität)

Acrylamid	38 g
N,N'Methylen-bis-acrylamid	2 g
A. dest.	ad 100 ml

Lagerung in lichtundurchlässigen Flaschen

ACG-Lösung

ATP	10 mM
CTP	10 mM
GTP	10 mM

ACU-Lösung

ATP	10 mM
CTP	10 mM
UTP	10 mM

Annealing-Puffer (ortsgerichtete Mutagenese)

1 M Tris-HCl (pH 7,4)	200 µl
1 M MgCl <sub>2</sub>	20 µl
5 M NaCl	100 µl
A. dest.	ad 1 ml

A-Puffer (Untersuchungen zur RdRP-Aktivität des VP1) [1]

MgCl <sub>2</sub>	5 mM
HEPES pH 7,5	50 mM
2β-Mercaptoethanol	10 mM
ZnCl	60 µM

a-Puffer (Untersuchungen zur RdRP-Aktivität des VP1) [8]

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
NaCl	10 mM

B-Puffer (Untersuchungen zur RdRP-Aktivität des VP1) [8]

Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
KCl	25 mM
Actinomycin D	50 µg/ml

5x C-Puffer (Proteinreinigung aus Bakterienlysaten)

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	1 M
DTT	5 mM
EDTA	5 mM

Denaturierungslösung (DNA-Sequenzierung)

NaOH	800 mM
EDTA	8 mM

Elu-C-Puffer (Elution der Proteine nach MBP-Reinigung)

1x C-Puffer	
+ Maltose	10 mM

Entfärber für Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte Acrylamidgele

Methanol	450 ml
A. dest.	450 ml
Essigsäure	100 ml

Fluoreszenzerhaltungspuffer

2,5 g 1.4.-Diazabicyclo(2.2.2.)-oktan (SIGMA) werden bei 37 °C in 90 ml Glycerin gelöst. Nach Zugabe von 10 ml phosphatgepufferter Saline (PBS) wird mit 1 N HCl der pH 8,6 eingestellt.

### Klenow-Puffer

1 M Tris-HCl (pH 8,0)	50 µl
1 M MgCl <sub>2</sub>	10 µl
10 mM dATP	10 µl
10 mM dCTP	10 µl
10 mM dGTP	10 µl
10 mM dTTP	10 µl
A. dest.	ad 1 ml

### Ladepuffer (Agarosegelelektrophorese)

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylenylanol	0,25 % (w/v)
Glycerin	30 % (v/v)
gelöst in A. dest.	

### 5x Laufpuffer (SDS-PAGE)

Tris	15,1 g
Glycin	94 g
SDS	5 g
A. dest.	ad 1 l

### Lösung I (Plasmid-Schnellpräparation)

Glukose	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM

### Lösung II (Plasmid-Schnellpräparation)

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

### Lösung III (Plasmid-Schnellpräparation)

5 M Kaliumacetat	60 ml
Essigsäure	11,5 ml
A. dest.	ad 100 ml

### Phosphatgepufferte Saline (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
A. dest.	ad 1 l

mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen

### PNK-Puffer

50 % PEG 8.000 (w/v)	250 µl
100 mM ATP	25 µl
100 mM DTT	25 µl
BSA (10 mg/ml)	50 µl
A. dest.	ad 500 µl

### 2x Proteinase-K-Puffer

NaCl	300 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
SDS	1 % (w/v)
DEPC-A. dest.	ad 1 ml

### RNA-Elutionspuffer [104]

Lithiumdodecylsulfat	5 %
Tris-HCl (pH 8,0)	100 mM
LiCl	0,5 M
EDTA	10 mM
DTT	5 mM

### RNA-Ladepuffer

Formamid	95 %
EDTA (pH 8,0)	20 mM
Bromphenolblau	0,05 %
Xylencyanol	0,05 %

### 2x SDS-Probenpuffer

Tris 1,51 g

Glycerin 20 ml

In 35 ml A. dest. lösen und mit 1 N HCl auf pH 6,7 einstellen

Zugabe:

SDS 4 g

2-Mercaptoethanol 10 ml

Bromphenolblau 2 mg

A. dest. ad 100 ml

### S-Puffer (Untersuchungen zur RdRP-Aktivität des VP1) [115]

MgCl<sub>2</sub> 4 mM

NaCl 100 mM

EGTA 0,01 mM

Tris-HCl (pH 8,5) 100 mM

### Stopp-Puffer (ortsgerichtete Mutagenese)

1 M Tris-HCl (pH 8,0) 10 µl

0,5 M EDTA 20 µl

A. dest. ad 1 ml

### Synthese-Puffer (ortsgerichtete Mutagenese)

1 M Tris-HCl (pH 7,4) 17,5 µl

1 M MgCl<sub>2</sub> 3,75 µl

100 mM ATP 7,5 µl

100 mM dATP 4 µl

100 mM dCTP 4 µl

100 mM dGTP 4 µl

100 mM dTTP 4 µl

A. dest. ad 100 µl

#### 50x TAE-Puffer (Agarosegelelektrophorese)

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
A. dest.	ad 1 l

#### 5x TBE-Puffer (Sequenzierung)

Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
mit 1 N HCl auf pH 8,3 einstellen.	

#### TBST-Puffer (Western Blot)

NaCl	150 mM
Tris	10 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
mit 1 N HCl auf pH 8,0 einstellen.	

#### Transferpuffer (Western Blot)

Tris	25 mM
Glycin	150 mM
Methanol	10 % (v/v)

#### Z-Puffer (Untersuchungen zur RdRP-Aktivität des VP1) [135]

MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	50 mM
HEPES pH 7,3	20 mM
Glycerol	0,05 %
DTT	7,5 mM

## 2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden zwei Oligonukleotide unterschiedlicher Orientierung genutzt, die eine Amplifikation von dazwischenliegender DNA ermöglichen. Diese Technik erlaubt es, DNA an ihren Enden mit Restriktionsendonukleasespaltstellen zu versehen, um diese dann gerichtet klonieren zu können. Sie wurde genutzt, um die Klonierung der kodierenden Sequenz des VP1 in den bakteriellen Expressionsvektor pMAL c2 bzw. den Baculovirus-Transfervektor pAcSG2 zu ermöglichen.

Die PCR besteht aus drei Reaktionsschritten: Der erste Schritt ist die Denaturierung der dsDNA bei 95 °C für 30 bis 60 Sekunden (s) (melting). Danach liegt die DNA in Einzelsträngen vor. Anschließend erfolgt im zweiten Schritt innerhalb eines Zeitraums von 30 s die Hybridisierung der Oligonukleotide (annealing) nach Abkühlung auf die entsprechende Hybridisierungstemperatur des Oligonukleotids. Im dritten Schritt werden die Oligonukleotide durch die thermostabile DNA-Polymerase am komplementären Strang verlängert (elongation). Für diesen Schritt wird eine Polymerisationsgeschwindigkeit von 1.000 Nukleotiden pro Minute angenommen. Die Zeit für diesen Schritt berechnet sich also aus der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die optimale DNA-Synthesetemperatur variiert zwischen den verschiedenen erhältlichen Polymerasen. Im Falle der hier eingesetzten Deep Vent DNA-Polymerase (NEB) waren es 72 °C. Diese drei Schritte können nun in dieser Reihenfolge beliebig oft wiederholt werden, um die Menge an Amplifikat zu steigern. Üblicherweise werden 20-30 Zyklen durchgeführt.

In einem 200 µl-PCR-Reaktionsgefäß (Biozym) wurden in einem 100 µl Reaktionsansatz 2 µl einer 10 mM dNTP-Lösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl jedes Oligonukleotids (100 pmol), 10 µl eines 10x Thermopol-Puffers (NEB), 84 µl steriles destilliertes Wasser, 1 µl Deep Vent DNA-Polymerase (NEB) und 1 µl DNA (1ng) pipettiert, kräftig gemischt und anschließend bei 15.000 x g für 2 Minuten (min) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. In einigen Fällen wurde zur Verbesserung des Reaktionsergebnisses DMSO in Konzentrationen von 5 % oder 10 % zugesetzt und dementsprechend weniger Wasser in das Gemisch pipettiert. Durchgeführt wurden 25 Reaktionszyklen in einem Primus-Thermocycler (MWG). Die Reaktionen fanden in folgender Reihenfolge statt:

Nach einem ersten Denaturierungsschritt für 1 min bei 97 °C folgten die 25 Zyklen nach folgendem Schema: 95 °C für 30 s, dann 55 °C für 30 s und danach 72 °C für 3 min. Dem schloss sich eine Nachbehandlung für 2 min bei 72 °C an, um unvollständig amplifizierte DNA-Fragmente zu vervollständigen. Die amplifizierte DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

## **2.15 Indirekte Immunfluoreszenz**

### **2.15.1 In Sf9-Zellsuspension**

1-1,5 ml einer Suspension Baculovirus-infizierter Sf9-Zellen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 700 x g zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig mit 100 µl PBS gewaschen und für weitere 3 min bei 700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Reste mit der Pipette abgenommen, bevor die Fixation der Zellen in 100 µl eines Aceton-Methanol-Gemisches (Verhältnis 60 %:40 %) für 1-2 min durchgeführt wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 700 x g. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig mit 100 µl PBS gewaschen und noch einmal für 3 min bei 700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl der Lösung mit dem ersten Antikörper resuspendiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Vorgang des Zentrifugierens (3 min bei 700 x g) und Waschens (in 100 µl PBS) zweimal wiederholt und das Pellet anschließend in 300 µl der Lösung mit dem Fluorochrom-konjugierten Spezies-Antikörper resuspendiert. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Suspension für 3 min bei 700 x g zentrifugiert, in 100 µl PBS gewaschen und nochmals 3 min bei 700 x g zentrifugiert. Zum Resuspendieren des Zellpellets wurde PBS genutzt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde anschließend auf Poly-L-Lysin vorbehandelte Deckgläschen getropft. Zur Sedimentation der Zellen wurde die Zellsuspension für 5 min auf den Deckgläschen belassen. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Zellen in einem leichten Luftstrom getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in Fluoreszenzerhaltungspuffer eingebettet. Ausgewertet wurde an Diaphot- bzw. Optiphot-2-Fluoreszenzmikroskopen.

### **2.15.2 In BHK-21 Zellkultur**

Um eine indirekte Immunfluoreszenz (IIFT) durchzuführen wurden BHK-21 Zellen auf Deckgläschen in 6-Loch-Zellkulturschalen transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (h) wurden die Zellen auf den Deckgläschen in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Die Gebrauchsverdünnung des Antiserums oder monoklonalen Antikörpers wurde mit PBS hergestellt und nach dem Trocknen der Zellen auf die Deckgläschen pipettiert. Nach der Inkubation der Deckgläschen für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer erfolgte dreimaliges Waschen in PBS zur Entfernung der ungebundenen Antikörper.

Anschließend wurden die Deckgläschen getrocknet und mit der entsprechenden Gebrauchsverdünnung von Fluorochrom-konjugierten Anti-Spezies Antikörpern in PBS bedeckt. Es fand eine weitere Inkubation in der feuchten Kammer für 1 h statt, gefolgt von zweimaligem Waschen in PBS und einmaligem Waschen in A. dest. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in Fluoreszenzerhaltungspuffer eingebettet. Ausgewertet wurde an Diaphot- bzw. Optiphot-2-Fluoreszenzmikroskopen.

## **2.16 Bakterielle Expression und Reinigung der Proteine MBP und MBP-VP1**

Zur Expression des Maltose-bindenden Proteins (MBP) und des MBP-VP1 in *E. coli* wurden die Plasmide pMAL c2 und pMAL-VP1 in kompetente TB1-Zellen transformiert. Eine Kolonie der transformierten TB1-Zellen wurde in ein Glasreaktionsgefäß mit 10 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert. Am folgenden Morgen wurden aus dieser Bakterienkultur 3-4 ml in 300 ml LB-Rich-Medium überführt und bei 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert, bis eine OD von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600nm erreicht war. Danach wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 0,3 mM zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 4 h oder bei 30 °C, 25 °C, 20 °C und 15 °C für 18 h im Schüttler inkubiert.

Nach der Inkubation wurden je 50 ml der Bakterienkultur abgenommen und bei 4.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden nach Verwerfen des Überstandes in 5 ml 4 °C kaltem C-Puffer resuspendiert und über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis folgte eine dreimalige Behandlung mit Ultraschall für 20 s mit maximaler Stärke und einer 3 mm Spitze des Branson Sonifier 450. Die Lysate wurden dann bei 9.000 x g und 4 °C für 30 min in einem SW28 Rotor (Beckman Instruments) zentrifugiert und anschließend der Überstand gewonnen. Die gewonnenen Überstände der Lysate wurden nun fünffach mit C-Puffer verdünnt. Parallel dazu wurden in einer Säule bei 4 °C 6 ml Amylose-Harz mit 50 ml C-Puffer äquilibriert. Nach dem Auslaufen des C-Puffers wurden 100 ml des verdünnten Proteinlysats auf das Amylose-Harz pipettiert. Nach dem Durchlaufen des Lysats erfolgte das Waschen der Säule mit 50 ml C-Puffer. Die Elution des MBP oder MBP-VP1 Fusionsproteins erfolgte mit 10 ml C-Puffer, dem 10 mM Maltose beigelegt wurde. Das Eluat wurde in 1,5 ml Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Analyse der gewonnenen Produkte erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung oder Western Blot. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden in 50 µl-Fraktionen geteilt und bei -70 °C gelagert.

### **2.17 Faktor Xa-Spaltung der bakteriell exprimierten Proteine MBP und MBP-VP1**

Zur Spaltung mit dem Faktor Xa aus der Blutgerinnungskaskade wurden 50 µl der bei -70 °C gelagerten Proteinlösung auf Eis aufgetaut und mit 1 µl 1:5 verdünnten Faktors Xa versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für zwei Tage bei 4 °C.

### **2.18 Umsalzen der bakteriell exprimierten Proteine MBP und MBP-VP1**

Das Umsalzen der in *E.coli* exprimierten Proteine MBP und MBP-VP1 erfolgte in Vorbereitung auf Untersuchungen zur RdRp-Aktivität. Dazu wurde Faktor Xa gespaltenes Protein in Centriscart C4 Filtern umgesalzen. Zunächst erfolgte die Zentrifugation von 50 µl der Proteinlösung bei 6.000 Umdrehungen/Minute (U/min) und 4 °C in der Eppendorf-Tischkühlzentrifuge 5403. Nach Zugabe von 50 µl A-, B-, S- oder Z-Puffer wurde bei 6.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Danach wurde das umgesalzene Protein per Pipette aus dem Filter entnommen und bei 4 °C gelagert.

### **2.19 Virusvermehrung in Sf9-Zellen**

Aus einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit frischem Medium durch den Strahl der Pipette abgelöst, 1:2 oder 1:3 verdünnt und in neue Zellkulturgefäße gegeben. Nach 5 min Ruhe zum Anheften der Zellen an den Zellkulturgefäßboden wurde Virussuspension mit einer Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, MOI) von 0,1-1 zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 4-5 Tage bei 28 °C.

### **2.20 DNA-Transfektion in Sf9-Zellen**

Zunächst wurden Sf9-Zellen 1:3 in T25 Zellkulturflaschen umgesetzt und 5 min zum Anhaften der Zellen an den Zellkulturgefäßboden bei Raumtemperatur inkubiert. 5 µl (0,5 µg) BaculoGold<sup>TM</sup> DNA und 2 µg des rekombinanten Baculovirus-Transfervektors wurden gemischt und nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur mit 1 ml Transfektionspuffer B (PharMingen, Becton Dickinson Company) aufgefüllt. Nach Absaugen des Mediums wurden die frisch ausgesäten Sf9-Zellen mit 1 ml Transfektionspuffer A (PharMingen, Becton Dickinson Company) überschichtet.

Die Mischung aus DNA und Transfektionspuffer B (PharMingen, Becton Dickinson Company) wurde dann tropfenweise hinzugegeben, wobei nach je 3-5 Tropfen sanft geschüttelt wurde. Die so behandelten Zellen wurden 4 h bei 28 °C inkubiert. Danach wurde der Transfektionsüberstand entfernt und durch 5 ml Graces-Insektenmedium ersetzt. Anschließend erfolgte eine 4- bis 5-tägige Inkubation bei 28 °C.

### **2.21 Expression von VP1 in Sf9-Zellen und Herstellung von Zelllysaten**

Zur Expression von Fremdproteinen in Sf9-Zellen wurden konfluente Sf9-Zellen in einem Verhältnis von 1:2 in T150 Zellkulturflaschen umgesetzt. Nach 5 min zum Anheften der Zellen an die Oberfläche des Zellkulturgefäßes wurde mit 2 ml Virussuspension (MOI 0,1) infiziert. Die darauf folgende Inkubationszeit bei 28 °C betrug 5 Tage. Danach wurden die Zellen von der Kunststoffoberfläche der Zellkulturflasche durch Abspülen mittels einer Pipette gelöst. Die Pelletierung der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 700 x g und 4 °C. Nach dem Waschen der Pellets mit PBS wurden sie in 1 ml a-Puffer resuspendiert und für 30 min zum Schwellen auf Eis inkubiert. Danach erfolgten 20 Stöße im Homogenisator auf Eis. Anschließend wurden Glycerol (10 % v/v), Nonidet P-40 (1 % v/v) und CHAPS (0,5 % w/v) zugesetzt. Das Homogenisat wurde unter gelegentlichem Schütteln für 1 h auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 1.000 x g und 4 °C wurden die Zellkerne sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf Eis gelagert. Die Pellets wurden in 500 µl a-Puffer mit den oben genannten Konzentrationen an Glycerol, Nonidet P-40 und CHAPS resuspendiert und wieder mit 20 Stößen im Homogenisator auf Eis homogenisiert. Nach einer weiteren Inkubation für 1 h auf Eis unter gelegentlichem Schütteln erfolgte die Sedimentation der Zellkerne für 10 min bei 1.000 x g und 4 °C. Die Überstände wurden vereint und weitere 10 min bei 8.000 x g und 4 °C unter Nutzung eines SW40 Rotors in der Ultrazentrifuge LE60 zentrifugiert. Der Überstand wurde in 50 µl Portionen geteilt und bei -70 °C gelagert.

## **2.22 *In vitro*-Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität**

### **2.22.1 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1**

Die Versuche wurden in vier verschiedenen Puffersystemen durchgeführt. Die Puffer erhielten ihre Bezeichnung nach dem Anfangsbuchstaben des Nachnamens des Erstautors der Publikation, aus der die Zusammensetzung entnommen worden war:

1. *A-Puffer*, Arnold *et al.* 1990 [1]
2. *B-Puffer*, Behrens *et al.* 1996 [8]
3. *S-Puffer*, Spies *et al.* 1987 [115]
4. *Z-Puffer*, Zhong *et al.* 2000 [135].

Es wurden 8 µl des entsprechenden 5x A/B/S/Z-Puffers, 2 µl DEPC-SDW, 25 µl ΔP2A-RNA, 10 µl umgesalzenes Proteinlysate, 2 µl RNasin, je 0,5 µl ATP, CTP, GTP (100 mM), 2 µl UTP (1 mM) und 1 µl α<sup>32</sup>P-UTP in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach einer Inkubation bei 30 °C oder 40 °C für 30 min erfolgte ein Proteinase K-Verdau für 30 min bei 37 °C. Dem schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion an. Die folgende Ethanol-fällung fand über Nacht und unter Zusatz von 1 µl Glykogen statt. Zur Analyse der Reaktionsprodukte wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation bei 13.000 x g sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, danach getrocknet und anschließend in 5 µl RNA-Ladepuffer resuspendiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 5 % Polyacrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff in TBE-Puffer mittels eines 60 cm Sequenzierapparates (Gibco BRL) bei 70W für 90 min. Nach Fixierung und Trocknung der Gele, die wie bei der DNA-Sequenzierung durchgeführt wurden (2.26.1), erfolgte eine Exposition auf X-OMAT AR Filmen. Zur Verstärkung des Signals wurden Verstärkerfolien verwendet. Die Exposition fand bei -70 °C für 7 Tage statt.

### **2.22.2 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

Die Durchführung dieser Experimente erfolgte in Anlehnung an die Charakterisierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis C-Virus [8].

Dazu wurden 8 µl 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 4 µl 10 mM Dithiothreitol (DTT), je 2 µl 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, Actinomycin D (50 µg/µl), 1 µl 1 M KCl, 0,8 µl 50 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 µl RNasin (40 U/µl), 5 µl ΔP2A-RNA, 10 µl Zellextrakt und 1 µl α<sup>32</sup>P-UTP (10 µCi) in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Bei Weglassen einer Komponente des *in vitro*-Reaktionsansatzes wurde die entsprechende Menge RNase-freien Wassers zugegeben. Wenn radioaktiv markierte cRNA eingesetzt wurde, erfolgte die Zugabe von 2 µl nicht radioaktiv markiertem 10 mM UTP anstelle des radioaktiv markierten UTP. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden auch bei anderen Temperaturen inkubiert, was entsprechend vermerkt wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 40 µl 2x Proteinase-K-Puffer und 50 µg Proteinase K. Der Proteinase K-Verdau erfolgte bei 37 °C für 30 min und wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion der Proteine gestoppt. Die anschließende Fällung der RNA erfolgte unter Zusatz von 2,5 Volumen Ethanol (96 %) und 1 µl Glykogen über Nacht. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte wie unter 2.22.1 beschrieben.

### **2.23 Inkubation der Reaktionsprodukte der Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität mit RNasen**

Zur Charakterisierung der Reaktionsprodukte der RdRp-Aktivität des VP1 wurden diese mit einzelstrangspezifischer RNase I<sub>f</sub> und doppelstrangspezifischer RNase III inkubiert. Dazu wurde die präzipitierte RNA für 10 min mit 13.000 x g sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nach Resuspension des Pellets in 20 µl Puffer (für RNase I<sub>f</sub>: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM NaCl; für RNase III: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM NaCl) wurden 20 U RNase I<sub>f</sub> bzw. 0,2 U RNase III zugegeben und der Reaktionsansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 20 µl 2x Proteinase K-Puffer und 25 µg Proteinase K zugefügt und der Ansatz bei 37 °C für weitere 30 min inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Präzipitation der RNA unter Zusatz von 2,5 Volumen 96 %igem Ethanol und 1 µl Glykogen über Nacht. Die Analyse der Reaktionsprodukte wurde wie unter 2.22.1 beschrieben durchgeführt.

## 2.24 *In vitro*-Transkription von RNA

### 2.24.1 RNA für Transfektion in Zellkultur

2 µg der Plasmid-DNA mit den viralen cDNA-Sequenzen der Segmente A (pP2A) bzw. B (pP2B) wurden in 100 µl Ansätzen mit Restriktionsendonukleasen *Bsr*G I bzw. *Pst* I für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Linearisierung der Plasmide wurde mittels Agarosegelelektrophorese eines Teils des Ansatzes kontrolliert. War sie erfolgreich, wurden Proteinase K (0,2mg/ml) und SDS (0,5 % w/v) zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion der Proteine und anschließender Präzipitation der linearisierten DNA in 2,5 Volumen absolutem Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (NaAc) (pH 5.3) wurde diese DNA für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15.000 x g, nach der die sedimentierte DNA getrocknet und in 5 µl DEPC-A. dest. (steril) resuspendiert wurde. Die so vorbereitete virale cDNA wurde mittels T7-RNA-Polymerase in folgendem Reaktionsansatz *in vitro* transkribiert:

5x TSC-Puffer (Promega)	10 µl
100 mM DTT	5 µl
1 mM GTP	5 µl
10 mM ACU-Lösung	2,5 µl
5 mM [m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G]	2,5 µl
DEPC-A. dest. (steril)	16 µl
DNA	5 µl
RNasin (40 U/µl)	2 µl
T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)	2 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 h. Das Ergebnis der Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese eines Teils des Ansatzes kontrolliert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70 °C.

### 2.24.2 RNA für Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität

Für die Herstellung von RNA für den Einsatz in Experimenten zur Untersuchung der RdRp-Aktivität des VP1 wurde eine modifizierte Transkriptions-Reaktion wie unter 2.24.1 beschrieben durchgeführt. Zunächst wurden 2 µg des Plasmides ΔP2A mit dem

Restriktionsenzym *Bsr*G I linearisiert und die linearisierte DNA wurde weiter behandelt wie unter 2.24.1 beschrieben.

Dabei wurden folgende Komponenten in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

5x TSC-Puffer (Promega)	10 µl
100 mM DTT	5 µl
10 mM ACGU-Lösung	2,5 µl
DEPC-A. dest. (steril)	18.5 µl
DNA ( $\Delta$ P2A)	5 µl
RNasin (40 U/µl)	2 µl
T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)	2 µl

Nach sechzigminütiger Inkubation bei 37 °C wurde dem Reaktionsansatz 1 µl DNase I zugeben und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Reinigung der RNA von den Nukleotiden durch einmalige Zentrifugation für 1 min bei 3.000 x g in Probe Quant G50-Micro-Säulen. Die gewonnene RNA wurde mit 28 µl 7 M Ammonium-Acetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol präzipitiert und über Nacht bei -20 °C inkubiert.

### **2.24.3 Radioaktiv markierte RNA für Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität**

Um radioaktiv markierte RNA für die Untersuchungen zur RdRp-Aktivität des VP1 zu erhalten, wurde linearisierte DNA des Plasmides p $\Delta$ P2A in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

5x TSC-Puffer (Promega)	5 µl
100 mM DTT	2,5 µl
10 mM ACG-Lösung	3 µl
1 mM UTP	1 µl
[ $\alpha$ <sup>32</sup> P]-UTP	5 µl
RNase-freies A. dest.	1,5 µl
DNA	5 µl
RNasin (40 U/µl)	1 µl
T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)	1 µl

Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionsprodukte in einem 1,5 %igem SeaPlaque GTG Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten, mit 400 µl RNA-Elutions-Puffer versetzt und anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung der RNA unter Zusatz von 2,5 Volumen 96 %igem Ethanol bei –20 °C über Nacht.

## **2.25 Transfektion von cRNA in Zellkultur**

Durch Transfektion von cRNA in Zellkultur nach der Methode von Mundt und Vakharia [83] wurden rekombinante IBDV erzeugt. Dazu wurde von 80-90 %ig konfluenten BHK-21 Zellen, gewachsen in 6-Loch-Zellkulturschalen, das Zellkulturmedium entfernt. Die Zellen wurden einmal mit OPTI-MEM gewaschen und anschließend mit 3 ml OPTI-MEM überschichtet und für 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. 45-55 min vor der Zugabe von cRNA wurden 12,5 µl Lipofectin (Gibco BRL) und 200 µl OPTI-MEM in einem 5 ml Polystyren-Röhrchen gemischt und bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die cRNA der Segmente A (pP2A) und B (pP2B) wurde nach 45-55 min gemeinsam in das Lipofectin/OPTI-MEM-Gemisch gegeben und kurz auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurde das OPTI-MEM von den Zellkulturen entfernt und durch 1,5 ml frisches OPTI-MEM ersetzt. Das cRNA/Lipofectin/OPTI-MEM-Gemisch wurde nun vorsichtig unter schwenken auf die Zellen getropft. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C im Brutschrank. Danach wurde der Überstand entfernt und durch antibiotikahaltiges Medium (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml) ersetzt. Die Überprüfung der Transfektion erfolgte 24 h nach Transfektion mittels IIFT (siehe 2.15.2).

## **2.26 DNA-Sequenzierung**

### **2.26.1 DNA-Sequenzierung mit T7 Sequenase v2.0 7-deaza-dGTP sequencing kit**

Dieser Kit diente der radioaktiven Sequenzierung von DNA mittels der Sanger-Kettenabbruchmethode. Dabei wurden Abbrüche der Polymerasereaktion durch den Einbau von Didesoxyribonukleotiden induziert. Die DNA wurde während der Reaktion mit <sup>35</sup>S-dATP radioaktiv markiert.

Zunächst erfolgte die Denaturierung der Plasmid-DNA für 30 min bei 37 °C durch Zugabe von 50 µl Denaturierungslösung und 35 µl SDW zu 15 µl Plasmid-DNA. Nach der Zugabe von 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 330 µl Ethanol (96 %) wurde die DNA für mindestens 30 min bei -20 °C präzipitiert. Die denaturierte DNA wurde anschließend bei 15.000 x g für 10 min sedimentiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Für die Reaktion wurde die DNA in 7 µl SDW aufgenommen. Die Sequenzreaktion erfolgte gemäß Angaben des Herstellers. Analysiert wurden die Reaktionsprodukte mittels eines 6 %igen Polyacrylamidgels mit 8 M Harnstoff in TBE-Puffer. Diese Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, von denen die längere Glasplatte mit 2 % Dimethylchlorosilan gelöst in 1.1.1.-Trichlorethan und die kürzere Glasplatte mit Binde-Silan behandelt wurde. Dimethylchlorosilan verhindert die Bindung des Gels an die größere der beiden Platten, während das Binde-Silan die Bindung des Gels an die kleinere Platte verstärkt. Die Elektrophorese erfolgte in Model SA-Elektrophoreseapparaturen (Gibco BRL) bei 70W für 2 bis 4 h. Als Laufpuffer wurde 1xTBE eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit der kleinen Platte für 20 min in einem Methanol (10 %) - Essigsäure (10 %) - Gemisch fixiert, anschließend für weitere 20 min gewässert und dann getrocknet. Exponiert wurde bei Raumtemperatur für 1 bis 4 Tage mit einem X-OMAT-Film von Kodak.

### **2.26.2 DNA-Sequenzierung mit Thermo Sequenase labeled primer cycle sequencing-Kit**

Diese nichtradioaktive Methode ist eine Kombination aus PCR mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Zur Sichtbarmachung der Reaktion sind die eingesetzten Oligonukleotide mit einem Fluorphor markiert, welches der Laser des LI-COR DNA-Analyzer (MWG) erkennt. Zum Beginn der Reaktion wurde folgender Prämix erstellt:

DNA	3 µl
Oligonukleotid (1pMol/µl)	4 µl
DMSO	0,7 µl
A. bidest.	ad 21 µl

4,5 µl dieses Primer/DNA-Gemisches wurden in 200 µl PCR-Reaktionsgefäße pipettiert, in die bereits je 1,5 µl der aus dem Kit stammenden G-, A-, C- bzw. T-Reagenzien pipettiert waren. Danach erfolgte die Sequenzierung im Primus Thermocycler (MWG).

Dabei erfolgte eine Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Anschließend wurden 30 Zyklen durchgeführt, die sich aus 30 s bei 95 °C (melting), 30 s bei 60 °C (annealing) und 2 min bei 70 °C (elongation) zusammensetzten. Die Reaktion wurde nach dem Ende des Programms durch Zugabe von 6 µl Stopplösung beendet. Zur Denaturierung der Doppelstränge folgte eine weitere Inkubation für 5 min bei 95 °C. Im LI-COR DNA-Analyzer (MWG) wurde je 1 µl der Proben analysiert.

## **2.27 Ligation von DNA-Fragmenten**

Diese Technik ermöglicht das gezielte Einfügen von DNA-Fragmenten in entsprechende Plasmide. Um passende DNA-Fragmente zu erzeugen, wurden Restriktionsendonukleasen genutzt. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und eluiert. Die Elution der DNA aus den Agarose-Stücken erfolgte in 400 µl-TAE Puffer-enthaltenden Elutionsschläuchen in Elektrophoresekammern mit TAE-Puffer bei 80 V für 30 min. Danach wurde der die DNA enthaltende Puffer aus dem Dialyseschlauch entnommen. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol (96 %) wurde dieses Gemisch je nach Größe der DNA 1 bis 18 h bei -20 °C inkubiert. Die Sedimentation der DNA erfolgte bei 15.000 x g für 10 min. Anschließend wurde die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Bei Ligationen von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden, sogenannten „sticky ends“, wurde die Plasmid-DNA und die zu inserierende DNA mit den gleichen Restriktionsendonukleasen gespalten, wie oben beschrieben eluiert und anschließend sedimentiert. Danach wurde die Plasmid-DNA in 30 µl SDW und die zu inserierende DNA in 7,5 µl SDW resuspendiert. Zu den 7,5 µl der Fragment enthaltenden DNA-Lösung wurden 1 µl resuspendierte Plasmid-DNA, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation von 5-10 µl dieses Ansatzes in kompetente *E. coli* (siehe 2.29).

Bei Ligationen von DNA-Fragmenten aus einer PCR wurde das Plasmid pUC18 verwendet, das zuvor mit *Sma* I gespalten und anschließend dephosphoryliert worden war (Pharmacia Biotech). Dieses Plasmid verfügte über glatte Enden („blunt ends“). Die PCR-Produkte wurden einer Behandlung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* unterzogen. Das Klenow-Fragment besitzt nur noch die 3'-5' Exonuklease- und Polymeraseaktivität nicht aber die 5'-3' Exonukleaseaktivität des Holoenzym. Dadurch erhielten auch die PCR-Produkte glatte Enden und konnten nach dieser Behandlung in das verwendete Plasmid ligiert werden.

Die amplifizierte DNA wurde zu diesem Zweck eluiert, sedimentiert und getrocknet und dann in 16 µl Klenow-Puffer resuspendiert. 2,5 Einheiten des Enzyms wurden zugegeben und der Ansatz bei 21 °C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 5 min. Anschließend wurden 4 µl PNK-Puffer und 5 Einheiten T4-DNA-Polynukleotidkinase (T4-PNK) zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min, wobei die 5'-Hydroxyl-Enden der DNA-Fragmente phosphoryliert wurden. Auch hier erfolgte die Inaktivierung des eingesetzten Enzyms bei 75 °C für 5 min. 12,5ng pUC18 Plasmid-DNA und 1 µl T4-DNA-Ligase wurden dem Ansatz hinzugefügt, der daraufhin über Nacht bei 16 °C inkubiert wurde. Von diesem Ansatz wurden 5-10 µl in kompetente *E. coli* transformiert. Das Plasmid pUC18 trägt das *Lac*-Operon von *E. coli*, welches eine Bindungsstelle für CAP-Protein, den Promotor  $P_{lac}$ , eine *Lac*-Repressor-Bindungsstelle und den 5'-terminalen Teil des *LacZ*-Gens besitzt, welches für den N-terminalen Teil der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Dieses Fragment ist in der Lage mit einer vom Wirt exprimierten, defekten  $\beta$ -Galaktosidase intrallelisch zu komplementieren. Unter Anwesenheit von IPTG werden beide Fragmente der  $\beta$ -Galaktosidase gebildet, wodurch auf X-GAL enthaltenden Nährböden blaue Bakterienkolonien entstehen. Die Klonierungsstelle mit einer Anzahl von Schnittstellen von Restriktionsendonucleasen, wie auch der von *Sma* I, die in diesem Plasmid nur einmal vorkommen, liegt innerhalb des 5'-terminalen Teils des *LacZ*-Gens. Durch Ligation eines DNA-Fragmentes in diesen Bereich wird dieses Fragment des *LacZ*-Gens inaktiviert und die Komplementierung findet nicht mehr statt. Kolonien von Bakterien, die ein solches Plasmid enthalten, bleiben daher auf X-GAL enthaltenden Nährböden weiß.

Die Transformationen von in pUC18 ligierten PCR-Fragmenten in *E. coli* wurden für diese Selektionsmethode auf 20 ml LB-Agar Platten mit 100 µg/ml Ampicillin, 4 mg IPTG und 1,6 mg X-GAL ausgestrichen.

## 2.28 Ortsgerichtete Mutagenese

Diese Methode beruht auf Arbeiten von Kunkel *et al.* [59]. Die zu mutierende Plasmid-DNA wird in einen *E. coli*-Stamm (CJ236, BIORAD) transformiert, der weder dUTPase noch Uracil *N*-glycosylase exprimiert. Durch diese Eigenschaften des *E. coli*-Stammes CJ236 kommt es zu einem vermehrten Einbau von Uracil statt Thymidin in neusynthetisierte DNA. Hierbei entstehen keine Mutationen, da Uracil an der Stelle von Thymidin Basenpaarungen mit Adenosin eingeht. Der Stamm CJ236 exprimiert ausserdem den F-Faktor, dessen Vorhandensein Voraussetzung für Infektionen mit Bakteriophagen ist.

Zur Gewinnung uracilhaltiger einzelsträngiger DNA werden Plasmide genutzt, die den Replikationsstart von M13-Phagen und die zu mutierende Sequenz tragen. Diese werden in den Stamm CJ236 transformiert. Anschließend erfolgt eine Infektion mit dem VCS-Phagen, der ein Derivat des M13-Phagen ist. Bei der Replikation des Phagen entsteht uracilhaltige ssDNA, die in die Phagenhülle verpackt wird. Diese wird isoliert und dann durch Zugabe von einem die Mutation tragenden Oligonukleotid in entgegengesetzter Orientierung, unter Nutzung von T4-DNA Polymerase, wieder in doppelsträngige DNA umgewandelt. Die dsDNA besteht aus einem DNA-Strang mit Uracilbasen und einem Strang ohne Uracilbasen aber mit der Mutation. Wird diese DNA in einen Bakterienstamm transformiert, der sowohl dUTPase als auch Uracil *N*-glycosylase exprimiert, kommt es zu einem Abbau des Uracil-enthaltenden DNA-Stranges und die mutierte DNA wird bevorzugt bei der Zellteilung weitergegeben.

Der Phagemid-Vektor pBlueskript SK (Stratagene) trägt neben einem Ampicillinresistenzgen den Replikationsstart *f1* für den M13-Phagen und einen multiplen Klonierungsort. Nach Klonierung der zu mutierenden DNA-Sequenz in diesen Vektor erfolgte die Transformation des entsprechenden Plasmids in den Stamm CJ236. Dazu wurden 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) mit einer Kolonie beimpft und über Nacht im Bakterienschüttler bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 500 µl der über Nacht gewachsenen Kultur in 25 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{660nm} = 0,3$  geschüttelt. Anschließend erfolgte die Infektion dieser Kultur mit dem Phagen VCS M13 mit einer MOI von 20 und eine weitere Inkubation für 1 h bei 37 °C im Schüttler. Danach wurde Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben und die Kultur für 4 bis 6 weitere Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Isolation der Phagen-DNA erfolgte mit dem GLASSMAX DNA Isolation Spin Cartridge System (Gibco BRL) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in A. dest. aufgenommen. Für die *in vitro*-Mutagenese wurden 1 µl (1,2 µg/µl) eines Oligonukleotids mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) am 5'-Ende in folgendem Ansatz in einer Kinasereaktion phosphoryliert:

Oligonukleotid	1 µl
10x PNK-Puffer (NEB)	3 µl
10 mM ATP	3 µl
A. dest.	22 µl
T4-PNK (NEB)	10 Einheiten

Dieser Reaktionsansatz wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die T4-PNK bei 75 °C für 10 min inaktiviert. Das kinasierte Oligonukleotid und die ssDNA wurden in folgendem Ansatz miteinander hybridisiert (annealing):

ssDNA	3 µl
kinasiertes Oligonukleotid	1 µl
10x Annealing-Puffer	1 µl
A. dest.	5 µl

Dieser Ansatz wurde auf einen Heizblock mit einer Temperatur von 95 °C gestellt, dessen Heizung abgeschaltet wurde und auf 75 °C abgekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min. Daraufhin wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Die Synthese des zweiten Stranges fand in dem vorgekühlten Reaktionsansatz statt, nachdem 1 µl 10x Synthesepuffer, 200 Einheiten T4-DNA-Ligase und 1,5 Einheiten T4-DNA-Polymerase zugegeben wurden. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis folgten 10 min bei Raumtemperatur und 90 min bei 37 °C. Die Zugabe von 90 µl Stopp-Puffer beendete die Reaktion durch Entzug der für die Reaktion essentiellen  $Mg^{2+}$ -Ionen aus dem Reaktionsansatz durch Chelatbildung. Von diesem Ansatz wurden 10 µl in *E. coli* (Top10F) transformiert. Nach der Präparation von Plasmid-DNA wurde mittels Sequenzierung geprüft, ob die Mutagenese erfolgreich war.

## 2.29 Herstellung kompetenter TB1-Zellen

Um eine hohe Transformationsrate zu erzielen, werden Bakterien so behandelt, dass sie vermehrt Plasmid-DNA aufnehmen können. Dieser Zustand der Bakterien wird als Kompetenz bezeichnet.

200 µl einer frischen Übernachtskultur von TB1-Zellen in LB-Medium mit 100 µg/ml Streptomycin wurden in 20 ml LB-Medium überführt und für 1,5 h bei 37 °C in einem Bakterenschüttler inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Kulturen für 15 min bei 750 x g und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 20 ml 4 °C-kaltem, 0,1 M  $CaCl_2$  vorsichtig resuspendiert. Nach der anschließenden Inkubation für 30 min auf Eis fand eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 500 x g und 4 °C statt.

Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 0,5 ml 4 °C-kaltem, 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Lagerung der nun kompetenten *E. coli* bei 4 °C im Kühlschrank.

## **2.30 Transformation kompetenter Bakterien**

### **2.30.1 Bakterienstamm Top10F (Invitrogen)**

50 µl der bei -70 °C gelagerten Bakteriensuspension wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Danach wurde die zu transformierende DNA (1-5 µl) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Erwärmung für 30s auf 42 °C und einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien bei 37 °C für 60 min leicht geschüttelt. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum für das Plasmid ausgespatelt, worauf eine Inkubation bei 37 °C über Nacht erfolgte.

### **2.30.2 Bakterienstamm TB1**

Zu 100 µl der bei 4 °C gelagerten Bakterien wurde 1 µl Plasmid-DNA gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde zunächst für 30 min auf Eis, dann für 5 min bei 37 °C und anschließend weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium erfolgte eine dreißigminütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum für das Plasmid ausgespatelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.30.3 Bakterienstamm XL1 Blue und CJ236**

200 µl kompetenter Bakterien wurden in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorfgefäß gegeben und anschließend 1 µl Plasmid-DNA vorsichtig zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und dann für 2 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederum 2 min auf Eis gehalten, um anschließend mit 800 µl SOC-Medium bei 37 °C für 45 min unter leichtem Schütteln zu inkubieren. Die Zellen wurden dann mit 3.000 U/min für 5 min in der Eppendorf 5154C Tischzentrifuge sedimentiert und 850 µl des Überstandes

entfernt. Das Pellet wurde vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert und die Bakteriensuspension auf einer, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten, LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Petrischale wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## **2.31 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

### **2.31.1 Schnellpräparation**

Eine auf einer LB-Agarplatte gewachsene Bakterienkultur wurde in ein 20 ml Reaktionsglas mit 2 ml LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß dekantiert und bei 14.000 x g für 1 min in der Eppendorf Tischzentrifuge 5154C pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Bakterienpellet mittels Kolbenhubpipette in 100 µl Lösung I resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl frisch angesetzter Lösung II zugegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis folgte nach der Zugabe von 150 µl Lösung III und Mischen mit dem Reax 2000. Zur Extraktion bakterieller Proteine wurde die Suspension mit 400 µl Phenol-Chloroformlösung (v/v, 1:1) versetzt, kräftig geschüttelt und anschließend bei 14.000 x g für 5 min zentrifugiert. Danach wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml Ethanol (96 %) gemischt und für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation des Gemisches bei 15.000 x g für 10 min pelletiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 100 µl RNase A-Lösung (100 µg/ml) resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert, um die RNA zu hydrolysieren.

### **2.31.2 Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Biorad)**

Die DNA-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde allerdings mit sterilem und DEPC-behandeltem A. dest. eluiert, da die Plasmide auch für *in vitro*-Transkription verwendet wurden (siehe 2.24).

### **2.32 Restriktionsenzymspaltungen**

Restriktionsenzymspaltungen wurden zur Analyse von dsDNA eingesetzt, indem die entstehenden DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.33) mit einem bekannten Größenstandard verglichen wurden. Dazu wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II eingesetzt, die eine bestimmte, häufig palindromische DNA-Sequenz erkennen. Die Spaltung der Phosphodiesterbindung erfolgt dabei innerhalb dieser oder in deren unmittelbarer Umgebung in beiden Strängen einer dsDNA. Die entstehenden Enden der dsDNA können sich dabei gegenüber liegen oder versetzt sein. 2 µl einer DNA-Plasmid-Präparation wurden in dem vom Hersteller der Restriktionsendonuklease empfohlenen Puffer verdünnt und eine Einheit eines oder mehrerer Enzyme zugegeben. Meist fand die Inkubation in einem Reaktionsvolumen von 10 µl bei 37 °C für 1 h statt. Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte anschließend nach Zugabe von 1 µl Ladepuffer mittels Agarosegelelektrophorese.

### **2.33 Agarosegelelektrophorese**

Agarosegele wurden zur Analyse und Präparation von Nukleinsäuren genutzt. Durch Erhitzen im Mikrowellenofen wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer gelöst. Die Agarosekonzentrationen bewegten sich in einem Bereich zwischen 0,5-2 %, je nach Größe der zu trennenden Nukleinsäuren [103]. Zur Färbung der Nukleinsäurefragmente wurde der Agarose Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugegeben, das mit den Nukleinsäuren komplexiert. Dieser Nukleinsäure-Ethidiumbromid-Komplex wurde durch UV-Licht ( $\lambda=314\text{nm}$ ) sichtbar gemacht und mittels Foto dokumentiert.

### **2.34 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen wurde das diskontinuierliche Gelelektrophorese-System nach Laemmli [60] eingesetzt, wozu zwei Elektrophorese-Apparaturen zur Verfügung standen: die MINI PROTEAN II (BIORAD, Gelgröße 7x10 cm) und die PROTEAN IIxi (BIORAD, Gelgröße 16x16 cm). Falls nicht anders angegeben, wurde als Trenngel ein 10 %iges Acrylamidgel (pH 8,8) mit 0,1 % SDS verwendet. Das Sammelgel war immer ein 5 %iges Polyacrylamidgel (pH 6,8) mit 0,1 % SDS. Proteinproben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 2 Minuten gekocht.

Durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 2 min wurden nicht gelöste Bestandteile sedimentiert. Die Elektrophorese wurde bei 50-200 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Gel durchlaufen hatte.

### **2.35 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Zur Färbung nach der Elektrophorese (siehe 2.34) wurden die SDS-Polyacrylamidgele in einer Färbelösung (45 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), 0,25 % Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (w/v)) für 30 min bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte ein kurzes Waschen in Methanol. Danach wurde in Entfärbelösung (45 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)) entfärbt. Nachdem das Gel genügend entfärbt war, wurde es gewässert und dann zur Aufbewahrung auf Filterpapier getrocknet.

### **2.36 Herstellen von Proteinproben aus embryonalen Hühnerzellen für den Western Blot**

Von in T25-Zellkulturflaschen konfluent gewachsenen embryonalen Hühnerzellen (HEZ) wurde das Medium entfernt und der Zellrasen einmal mit frischem Medium gespült. Anschließend wurden die Zellen mit dem IBDV-Stamm P2 (bereitgestellt durch PD Dr. E. Mundt) mit einer MOI von 1 infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei RT auf einem Schwenker, wurde der virushaltige Überstand entfernt und die Zellkultur einmal mit Medium gespült. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen bei 37 °C im Brutschrank in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Tage inkubiert. Eine nicht infizierte Zellkultur wurde parallel mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen jeweils ins Medium geschabt und bei 1500 x g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 500 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Nach Erhitzen bei 95 °C über 5 min erfolgte eine Ultraschallbehandlung zur Zerkleinerung der chromosomalen DNA der eine fünfminütige Zentrifugation bei 15.000 x g folgte. Der erhaltende Überstand wurde für die Analyse im Western Blot genutzt.

### **2.37 Western Blot**

Der Western Blot ermöglicht die Identifizierung von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Dazu wurden Polyacrylamidgele mit Proteinproben nach der Elektrophorese (siehe 2.34) auf eine Nitrocellulosemembran verbracht, die mit Transferpuffer äquilibriert war und unter der sich 10 Schichten mit Transferpuffer getränktem Filterpapier befanden. Auf das Gel wurden weitere 10 Schichten Transferpuffer getränktem Filterpapiers geschichtet. Dieser Stapel wurde zwischen Anode und Kathode der "semi-dry" Elektroblot Apparatur (BIORAD) verbracht. Der Elektrotransfer fand bei 24 V für 1 h statt. Danach wurde die Nitrocellulosemembran für 30 min mit 5 %iger Magermilchlösung in TBST bei leichtem Schwenken und Raumtemperatur inkubiert. Dies führte zu einer Blockierung von den Teilen der Membran, an denen kein Protein gebunden war. Anschließend erfolgte, ebenfalls bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken, die Inkubation mit spezifischem Antiserum in angepasster Verdünnung über Nacht. Nicht gebundene Antikörper wurden am folgenden Morgen durch drei Waschvorgänge in TBST-Puffer für jeweils 10 min entfernt. Danach erfolgte eine weitere Inkubation mit 5 %iger Magermilchlösung in TBST für 30 min. Dieser schloss sich die 1,5 stündige Inkubation mit Meerrettichperoxydase (POD)-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen oder Ziege-anti-Maus Immunglobulinen an. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST erfolgte die Entwicklung mit dem Enhanced Chemoluminescence System (Pierce) nach den Anweisungen des Herstellers. Die Dokumentation erfolgte mittels Exposition eines Amersham MP-Films.

### **2.38 Rechnerprogramme**

Zur Analyse von DNA-Sequenzen wurde das Programm GCG (Genetics Computer Group) Version 8 verwendet.

Das Auslesen der exponierten Folien im Phosphoimager erfolgte mit dem Programm BAS Reader der Firma Raytest, Straubenhardt.

Die Quantifizierung der Stärke der Banden aus Untersuchungen zur RdRp- Aktivität des VP1 nach dem Auslesen im Phosphoimager wurde mit Hilfe des Programmes AIDA Bio-Package der Firma Raytest, Straubenhardt durchgeführt.

### 2.39 Oligonukleotide

BEZEICHNUNG (ORIENTIERUNG)	POSITION	SEQUENZ (5'-3')	VERWENDUNG
VP1-pMALf (+)	Nukleotide (nt) 112-134	Sac I <u>CGAGCTCG</u> AACAACAACA ATAACAATAACAACCTCG GGATCGAGGGAAGGatgagtgacatt ttcaacagtcc	PCR
VP1-pMALr (-)	nt 2734-2748	<i>Pst</i> I CTCTAG <u>ACTGCAG</u> ttagcggctctcctt ttggcgttgc	PCR
VP1bacf (+)	nt 101-129	EcoR I CTCGAG <u>GAAATTC</u> atgattctgccaccat gagtgacattttcaac	PCR
VP1bacr (-)	nt 2719-2748	<i>Pst</i> I GGTACC <u>CTGCAG</u> ttagcggctctcctttt ggcgttgccgccc	PCR
VP1-D416A (+)	nt 1347-1368	gatctcaatt <b>gct</b> tagagaag	ortsgerichtete Mutagenese

**Tabelle 1: Oligonukleotide für Amplifikation und ortsgerichtete Mutagenese.**

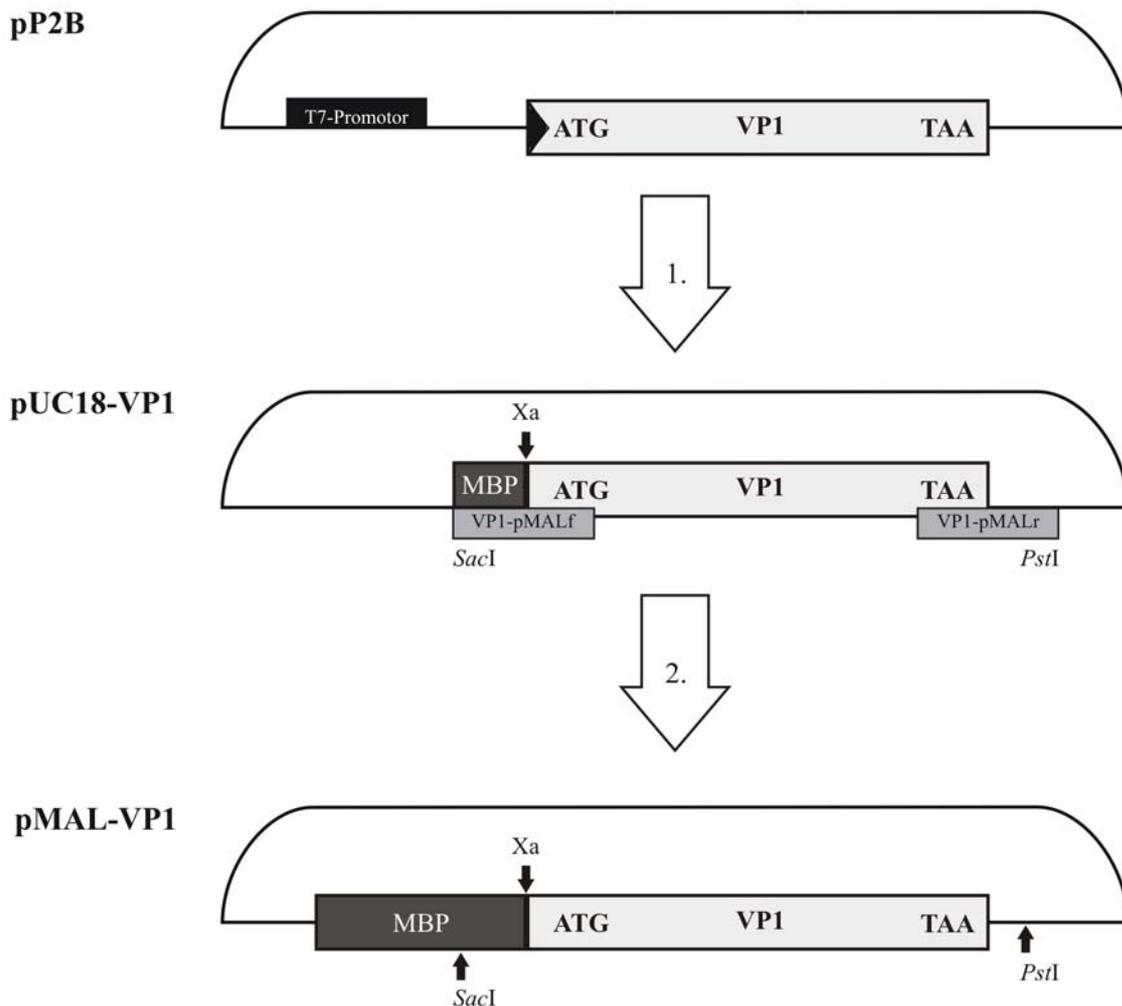
Die IBDV-spezifischen Sequenzen sind klein gedruckt dargestellt. Die für die Klonierung der PCR-Fragmente bezeichneten Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen sind unterstrichen dargestellt. Die für das Expressionsplasmid spezifischen Sequenzen sind in Großbuchstaben geschrieben. Die Position beschreibt den Bereich, an dem das Oligonukleotide am Segment B des Stammes P2 hybridisiert. Die Numerierung des Bindungsortes ist in Übereinstimmung mit der vollständigen Sequenz des Segments A des Stammes P2 [82]. Das substituierte Basentriplet im Oligonukleotid VP1-D416A ist fett hervorgehoben. Eine Plusstrang-Orientierung der Oligonukleotide wird durch „+“ dargestellt, eine Minusstrang-Orientierung durch „-“.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bakterielle Expression und Reinigung des Fusionsproteins MBP-VP1

##### 3.1.1 Konstruktion des rekombinanten Expressionsplasmids pMAL-VP1

Zur Expression des VP1 in *E. coli* wurde die kodierende Region des VP1 unter Nutzung des Plasmids pP2B in den Expressionsvektor pMAL c2 kloniert. Dazu wurde zunächst die kodierende Sequenz für das VP1 mittels einer PCR unter Verwendung der Oligonukleotide VP1-pMALf und VP1-pMALr (siehe Tabelle 1 unter 2.39), des Plasmids pP2B und der thermostabilen Deep Vent DNA-Polymerase amplifiziert. Das Oligonukleotid VP1-pMALf war so konzipiert, dass das Startkodon des VP1 direkt hinter der Schnittstelle des Faktors Xa im Maltose-bindenden Protein (MBP) positioniert war. Damit sollte die Expression des vollständigen VP1 sichergestellt werden. In der Sequenz der Oligonukleotide waren Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Sac* I (VP1-pMALf) und *Pst* I (VP1-pMALr) vorhanden, die eine spätere Ligation in den bakteriellen Expressionsvektor pMAL c2 ermöglichen sollte. Das amplifizierte PCR-Fragment wurde nach Elution aus dem Agarosegel mit dem Klenow-Fragment und der Polynukleotidkinase behandelt und in das *Sma* I-gespaltene und dephosphorylierte Plasmid pUC18 ligiert. Nach Schnellpräparation entsprechender Plasmide und anschließender analytischer Restriktionsenzymspaltung wurden PCR-Fragment-tragende rekombinante Plasmide zur Sequenzierung ausgewählt. Es wurde ein rekombinantes Plasmid ausgewählt (pUC18-VP1, Abb. 3), welches eine 100 %ige Homologie zu der kodierenden Sequenz des Segments B des IBDV-Stammes P2 aufwies. Anschließend wurde pUC18-VP1 mit den Restriktionsendonukleasen *Sac* I und *Pst* I gespalten und nach Elution des entsprechenden Fragments wurde dieses in das *Sac* I/*Pst* I-gespaltene Plasmid pMAL c2 ligiert. Zur Überprüfung der korrekten Orientierung des ligierten Fragments wurden Sequenzierungen durchgeführt. Das so erzeugte Plasmid pMAL-VP1 (Abb. 3) sollte die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus dem MBP und dem VP1 des IBDV-Stammes P2 im *E. coli*-Stamm TB1 ermöglichen.

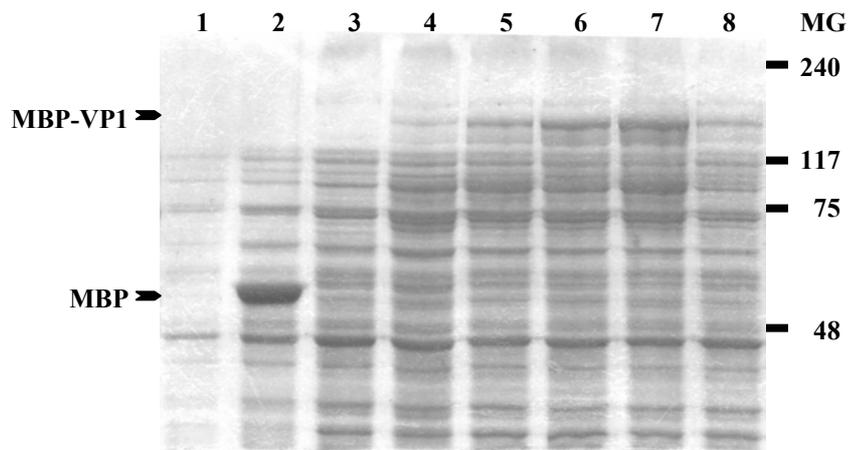


**Abb. 3: Schematische Darstellung der Klonierung der kodierenden Sequenz des VP1 des IBDV in den bakteriellen Expressionsvektor pMAL c2:**

Das PCR-Fragment der kodierenden Sequenz des VP1 wurde unter Nutzung des Plasmids pP2B [83] und zweier Oligonukleotide (VP1-pMALf, VP1-pMALr, grau unterlegt) amplifiziert. Nach Ligation des PCR-Fragments in das *Sma* I-gespaltene Plasmid pUC18 (Pfeil 1) wurde das so erzeugte rekombinante Plasmid pUC18-VP1 mit *Pst* I und *Sac* I gespalten und das erhaltene DNA-Fragment in das entsprechend gespaltene Expressionsplasmid pMAL c2 ligiert (Pfeil 2). Das erhaltene rekombinante Expressionsplasmid pMAL-VP1 kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem Maltose-bindenden Protein (MBP, anthrazitfarben dargestellt) und dem VP1 (hellgrau dargestellt). Die Spaltstelle des Faktors Xa für die Spaltung des VP1 vom MBP wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet. Im Plasmid pP2B wurde der T7-Promotor schwarz dargestellt.

### 3.1.2 Expression und Reinigung des Fusionsproteins MBP-VP1

Nach Transformation des Plasmids pMAL-VP1 in den *E. coli*-Stamm TB1 erfolgten Versuche zur Expression des Fusionsproteins MBP-VP1. Als Kontrolle für die Expression in diesem System wurde das Plasmid pMAL c2, welches für das MBP allein kodiert, ebenfalls in TB1-Zellen transformiert. In ersten Expressionsexperimenten wurde das Protokoll nach Herstellerangaben verwendet. Dies bedeutet, dass die Expression der Zielproteine nach Induktion mit IPTG bei 37 °C über einen Zeitraum von 2 h erfolgte. Der Erfolg der Expression wurde durch SDS-PAGE kontrolliert, wobei die Gele anschließend Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt wurden (Abb. 4). Die Expression des MBP (Molekulargewicht (MG) ca. 52 kDa) war bei der vom Hersteller empfohlenen Expressionstemperatur von 37 °C erfolgreich (Abb. 4, Spur 2), während bei dieser Temperatur unter Einsatz des Plasmids pMAL-VP1 eine schwache Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 145 kDa nachweisbar war, die dem Fusionsprotein entsprechen könnte (Abb. 4, Spur 4). Um eine höhere Expression des Fusionsproteins MBP-VP1 zu erreichen, wurde die Expression bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Die Inkubation bei 30 °C (Abb. 4, Spur 5), 25 °C (Abb. 4, Spur 6) und 20 °C (Abb. 4, Spur 7) führte zum Erscheinen eines Expressionsprodukts im Coomassie-gefärbten Gel, welches der Größe des erwarteten Molekulargewichts des Fusionsproteins MBP-VP1 entsprach. Dieses Produkt war nach Inkubation bei 20 °C am stärksten sichtbar. Nach Inkubation bei 15 °C war eine schwächere Bande des Fusionsproteins nach der Coomassie-Färbung nachweisbar (Abb. 4, Spur 8). Alle weiteren Expressionen des MBP-VP1 wurden aufgrund dieser Ergebnisse bei 20 °C durchgeführt.

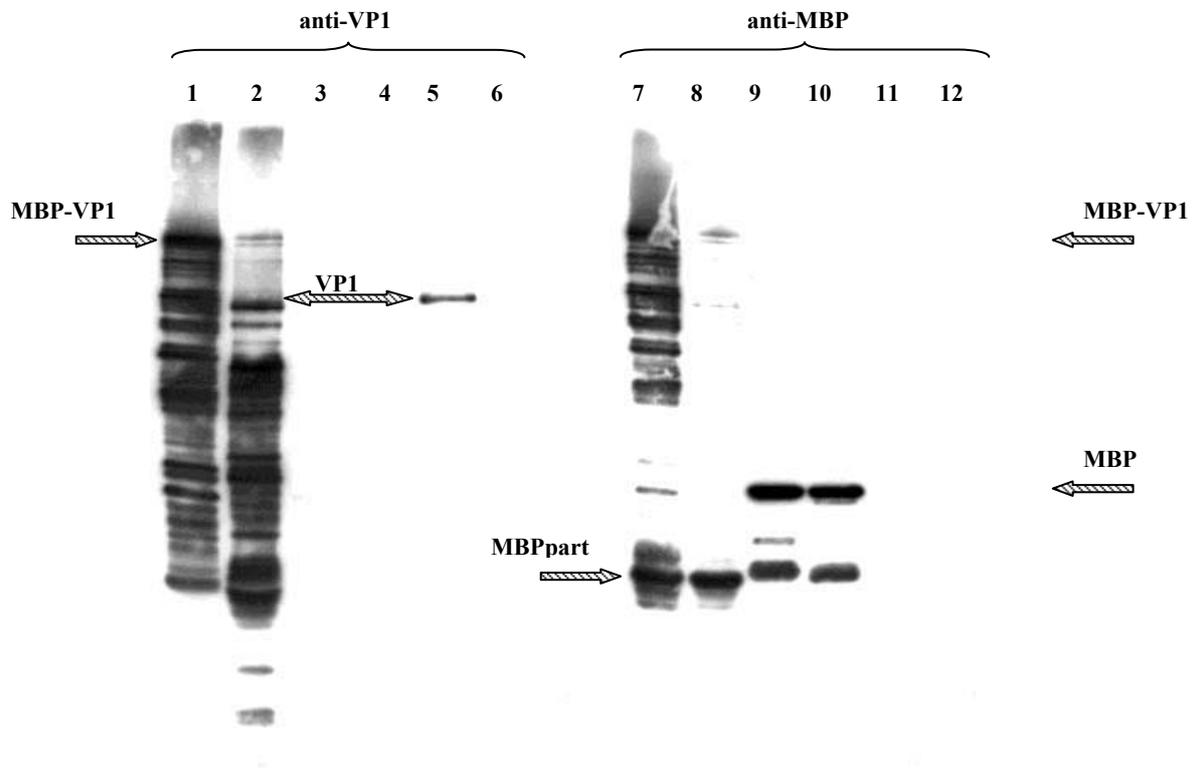


**Abb. 4: Expression des Fusionsproteins MBP-VP1 im *E. coli*-Stamm TB1.**

Zur Expression des rekombinanten Fusionsproteins MBP-VP1 wurde der *E. coli*-Stamm TB1 mit dem Plasmid pMAL-VP1 transformiert. Als Kontrolle wurde das für das MBP kodierende Plasmid pMAL c2 in den *E. coli*-Stamm TB1 transformiert. Nach IPTG-Induktion wurden die transformierten Bakterienzellen bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Weiterhin wurden als Kontrollen Proben vor der IPTG-Induktion genommen. Die gewonnenen Zellysate wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Die Pfeile markieren jeweils die Position des MBP bzw. des MBP-VP1. Die Molekulargewichte (MG) sind auf der rechten Seite angegeben.

- Spur 1: nicht induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL c2, 37°C;
- Spur 2: induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL c2, 37°C;
- Spur 3: nicht induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL-VP1, 37°C;
- Spur 4: induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL-VP1, 37°C
- Spur 5: induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL-VP1, 30°C
- Spur 6: induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL-VP1, 25°C
- Spur 7: induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL-VP1, 20°C
- Spur 8: induzierte *E. coli* mit dem Plasmid pMAL-VP1, 15°C

Zur Überprüfung der Spezifität des Proteins, welches das erwartete Molekulargewicht des Fusionproteins MBP-VP1 aufwies, wurde zunächst eine Reinigung mittels Amyloseharz durchgeführt. Als Kontrolle wurde das exprimierte MBP parallel mit Amyloseharz gereinigt. Die Spezifität der Expressionsprodukte wurde danach im Western Blot (Abb. 5) mit Hilfe von polyklonalem anti-VP1 Serum vom Kaninchen (Abb. 5, Spuren 1-6) und polyklonalem anti-MBP Serum vom Kaninchen analysiert (Abb. 5, Spuren 7-12). Es zeigte sich, dass nach Reinigung des MBP-VP1 eine Vielzahl von Banden nach Inkubation mit dem anti-VP1 Antiserum vorhanden waren (Abb. 5, Spur 1). Da nach Auftrag des gereinigten MBP (Abb. 5, Spur 3) mit dem anti-VP1 Serum keine Reaktivität beobachtet wurde und mit dem Lysat einer mit dem IBDV-Stamm P2 infizierten Zellkultur eine Reaktivität mit dem VP1 zu verzeichnen war, ist diese Vielzahl von Banden (Abb. 5, Spur 1) sehr wahrscheinlich auf verkürzte MBP-VP1-Fusionproteine zurückzuführen. Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Reaktivität des MBP-VP1 mit dem anti-MBP Serum (Abb. 5, Spur 7), da hier ebenfalls eine Vielzahl von Banden sichtbar war. Um diese näher zu untersuchen, wurden Proben beider Amyloseharz-gereinigten Proteine mit dem Faktor Xa behandelt und parallel im Western Blot untersucht. Nach der Spaltung mit dem Faktor Xa war mit beiden Seren eine Verkürzung der Proteine nachzuweisen. In der Spur des MBP-VP1 + Xa (Abb. 5, Spur 2) war nach der Spaltung ein Teil der Reaktivität im oberen Bereich des Gels nicht mehr zu beobachten und eine Anreicherung einer Bande auf der Höhe des apparenten Molekulargewichts des VP1 zu verzeichnen. Zusätzlich wurden kleinere Proteine sichtbar, die in der ungespaltenen Probe des MBP-VP1 nicht vorhanden waren. Es war also davon auszugehen, dass VP1 als Fusionsprotein mit MBP exprimiert wurde und eine C-terminale Verkürzung des Fusionsproteins erfolgte. Diese Vermutung wurde dadurch unterstützt, dass nach Inkubation der gleichen Probe mit dem anti-MBP Serum (Abb. 5, Spur 8) nur noch das Fusionsprotein MBP-VP1 und das verkürzte MBP nach der Xa-Spaltung sichtbar waren. Dass keine Verkürzung des MBP nach Spaltung mit dem Faktor Xa erfolgte (Abb. 5, Spur 9), zeigte das Fehlen einer zusätzlichen Bande nach Inkubation mit dem anti-MBP Serum.



**Abb. 5: Western Blot zur Untersuchung der Expressions des Maltose-bindenden Proteins (MBP) und des Fusionsproteins MBP-VP1 in *E. coli*.**

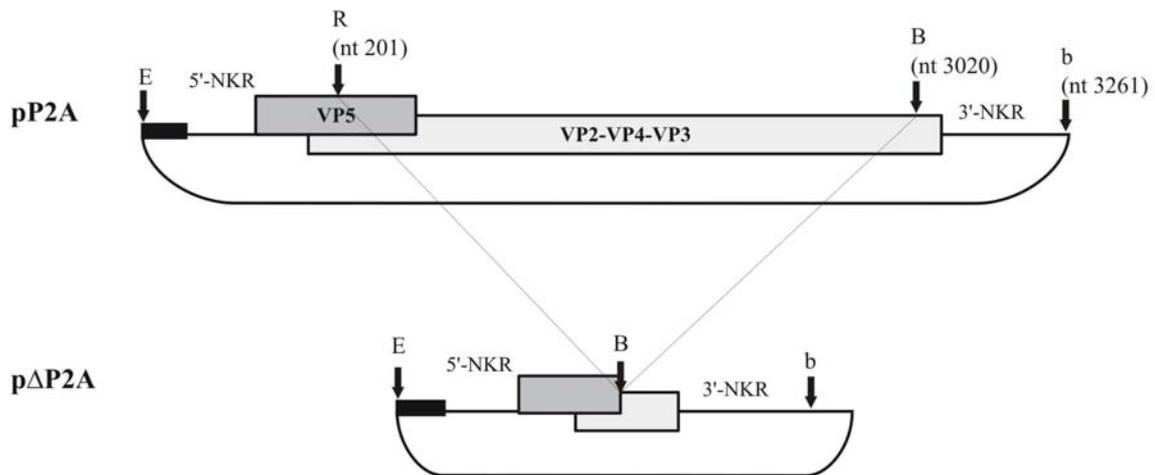
Amyloseharz-gereinigte Proteine (MBP; MBP-VP1) wurden entweder direkt oder nach Inkubation mit dem Faktor Xa in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und im Western Blot mit anti-VP1 Serum vom Kaninchen (Spuren 1-6), bzw. anti-MBP Serum (Spuren 7-12) vom Kaninchen untersucht. Als Kontrolle dienten IBDV-infizierte bzw. Mock-infizierte embryonale Hühnerzellen (HEZ). Die Bindung der Seren wurde mit einem Peroxydase-konjugierten anti-Kaninchen IgG, gewonnen von einer Ziege (Verdünnung 1: 50 000), unter Nutzung der „enhanced chemoluminescence“ nachgewiesen. Die Proben wurden folgendermaßen aufgetragen:

- Spuren 1 und 7: MBP-VP1
- Spuren 2 und 8: MBP-VP1 nach Faktor Xa-Spaltung
- Spuren 3 und 9: MBP
- Spuren 4 und 10: MBP nach Faktor Xa-Spaltung
- Spuren 5 und 11: Lysat IBDV-infizierter HEZ
- Spuren 6 und 12: Lysat MOCK-infizierter HEZ.

## **3.2 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1**

### **3.2.1 Herstellung eines cDNA-Konstrukts für Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1**

Zur Untersuchung der Polymeraseaktivität des VP1 wurde ein cDNA-Plasmid basierend auf dem Plasmid pP2A [10] erzeugt. Das Plasmid pP2A enthielt die vollständige Sequenz des Segments A des IBDV-Stammes P2. Dieses Plasmid wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Rsr* II und *Bgl* II gespalten. Die Erkennungssequenzen beider Restriktionsenzyme befanden sich als singuläre Schnittstellen im Plasmid pP2A und dort innerhalb der kodierenden Sequenz des Segments A. Mit der Nutzung dieser Enzyme wurde erreicht, dass die nichtkodierenden 5'- und 3'-lokalisierten Sequenzen des Segments A bei der Spaltung vollständig erhalten blieben. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit dem Klenow-Enzym, der sich nach Inaktivierung des Enzyms eine Ligationsreaktion anschloss. Nach Schnellpräparation mit anschließender Restriktionsenzymanalyse wurde ein Plasmid ausgewählt, welchem in der cDNA-Sequenz das entsprechende Fragment für den Großteil der kodierenden Sequenz fehlte, das aber noch eine singuläre *Bgl* II-Schnittstelle innerhalb der cDNA-Sequenz besaß. Damit stand ein Plasmid (p $\Delta$ P2A, Abb. 6) zur Verfügung, mit dessen Hilfe nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *Bsr*G I und unter Nutzung des T7-Promotors ein 444 nt cRNA-Transkript erzeugt werden konnte (siehe auch 2.24.2). Dieses Transkript wurde in den Experimenten zur Untersuchung der RdRp-Aktivität des VP1 genutzt.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pΔP2A aus dem Plasmid pP2A**

Das Plasmid pP2A [10] mit der vollständigen kodierenden Sequenz für das Segment A des IBDV-Stammes P2 einschließlich der nichtkodierenden Regionen (NKR) wurde unter Nutzung der Restriktionsendonukleasen *Rsr* II (R) und *Bgl* II (B) gespalten. Die Schnittstellen dieser Enzyme wurden mit Pfeilen markiert. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Eco*R I (E) und *Bsr*G I (b) wurden ebenfalls mit Pfeilen markiert. Der Leserahmen des VP5 wurde grau hinterlegt, der des Polyproteins VP2-VP4-VP3 wurde hellgrau markiert. Der T7-Promotor (T7) ist als schwarzes Rechteck unmittelbar an der Schnittstelle des Restriktionsenzym *Eco*R I dargestellt. Nach der Behandlung des gespaltenen Plasmids pP2A mit dem Klenow-Enzym erfolgte die Ligation. Danach wurde ein Plasmid ausgesucht, dem die *Bgl* II Schnittstelle erhalten geblieben war, das aber nicht mehr die vollständige kodierende Sequenz des Segmentes A enthielt (pΔP2A).

### 3.2.2 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des bakteriell exprimierten VP1

Die Versuche zur RdRp-Aktivität des bakteriell exprimierten VP1 wurden in vier verschiedenen in der Literatur beschriebenen Puffersystemen durchgeführt. Dabei wurden folgende Puffersysteme verwendet, die entsprechend dem Anfangsbuchstaben des Erstautors der entsprechenden Publikation bezeichnet wurden:

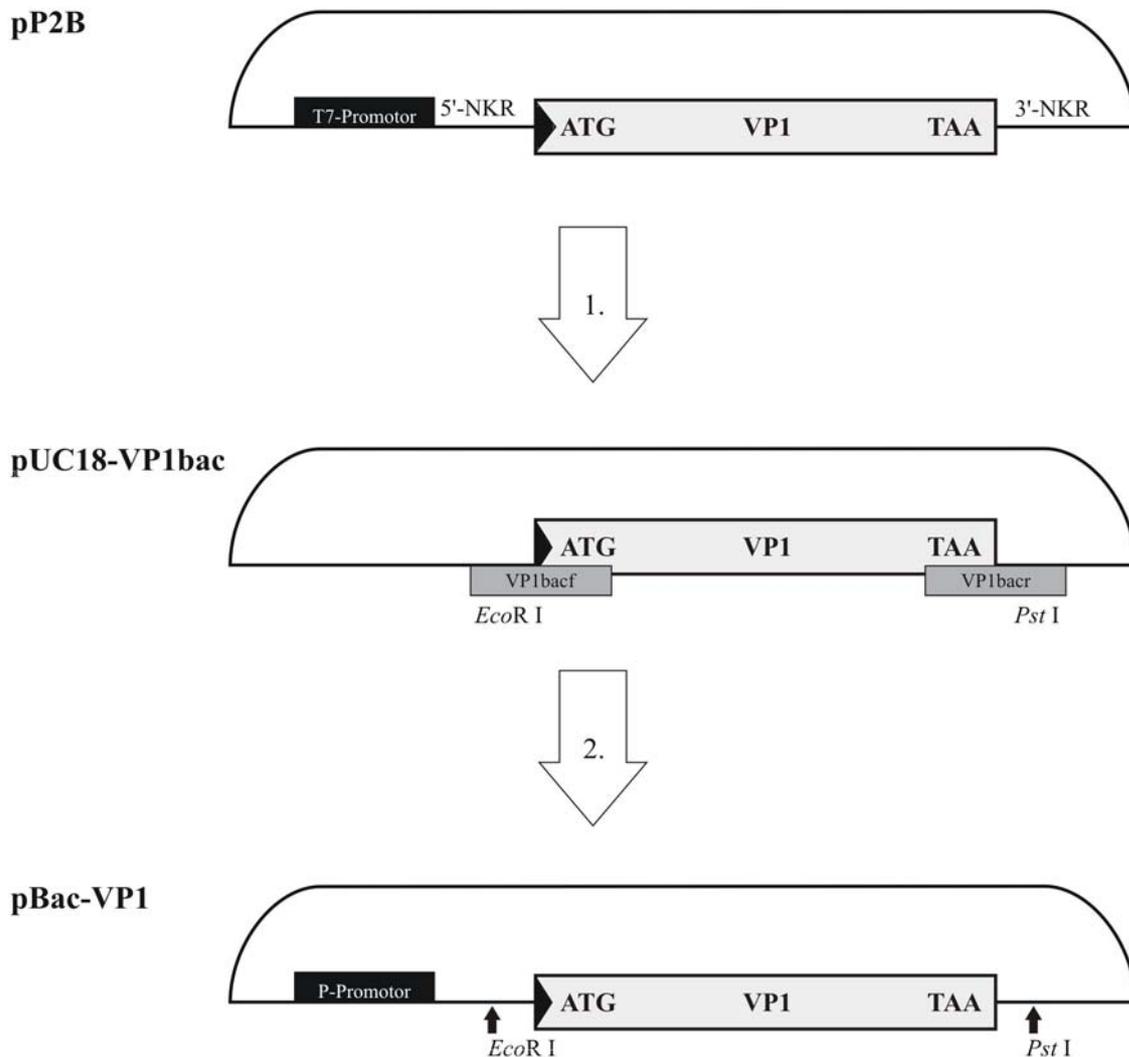
1. *A-Puffer*, Arnold *et al.* 1990 [1]
2. *B-Puffer*, Behrens *et al.* 1996 [8]
3. *S-Puffer*, Spies *et al.* 1987 [115]
4. *Z-Puffer*, Zhong *et al.* 2000 [135].

In allen Versuchen wurde das gereinigte 444 nt cRNA-Transkript des Plasmids p $\Delta$ P2A benutzt. In den Experimenten wurden alle vier Puffersysteme eingesetzt. Bei jeweils zwei verschiedenen Temperaturen (30 °C oder 40 °C) wurde das in *E. coli* exprimierte MBP-VP1 nach Umpufferung des Amyloseharz-gereinigten Proteins in das jeweilige Puffersystem auf eine Polymeraseaktivität untersucht. Da in diesen Untersuchungen in keinem Fall ein Reaktionsprodukt nach Elektrophorese in einem 5 %-Polyacrylamid-Harnstoff-Gel beobachtet wurde, erfolgte eine Spaltung des MBP-VP1 mit dem Faktor Xa. Die Reaktionsprodukte dieser Spaltung wurden ebenso nach Umpufferung in das jeweilige Puffersystem bei den zwei verschiedenen Temperaturen auf eine Polymeraseaktivität untersucht. In diesen Versuchen konnten auch nach vierwöchiger Exposition eines Röntgenfilms unter Nutzung einer Verstärkerfolie keine Reaktionsprodukte nachgewiesen werden. Dies bedeutete, dass weder mit dem bakteriell exprimierten MBP-VP1 noch den nach Faktor Xa-Spaltung erhaltenen Reaktionsprodukten eine Polymerase-Aktivität unter Nutzung des 444 nt cRNA-Transkripts festzustellen war.

### **3.3 Expression des VP1, eines mutierten VP1 (VP1-D416A) und des NS5B des Hepatitis C Virus in Baculovirus-infizierten Insektenzellen**

#### **3.3.1 Konstruktion von rekombinanten Plasmiden zur Baculovirus-Expression des VP1 und eines mutierten VP1 (VP1-D416A)**

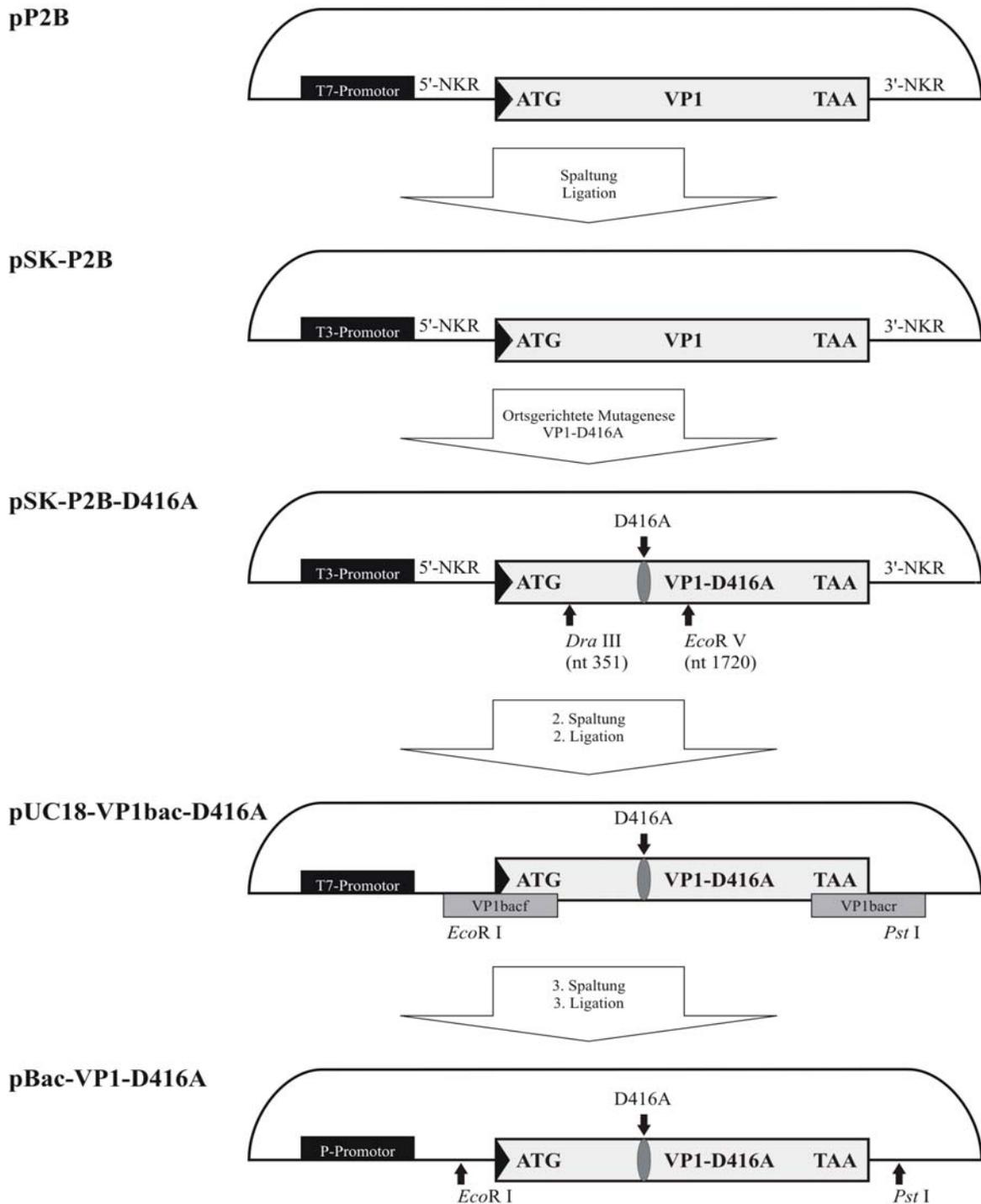
Zur Expression des VP1 mit Hilfe von Baculoviren in Sf9-Zellen wurde die kodierende Sequenz des VP1 des IBDV-Stammes P2 in den Baculovirus-Transfektor pAcSG2 kloniert. Dazu wurde die kodierende Sequenz aus dem Plasmid pP2B mit Hilfe der Oligonukleotide VP1bacf und VP1bacr (siehe Tabelle 1 unter 2.39) amplifiziert und nach Ligation in den *Sma* I-gespaltenen, dephosphorylierten Vektor pUC18 ein Plasmid mit einem entsprechenden Fragment (pUC18-VP1bac, Abb. 7) zur Sequenzierung genutzt. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz wurde mittels den Restriktionsendonukleasen *Eco*R I und *Pst* I aus diesem Plasmid pUC18-VP1bac das VP1-kodierende DNA-Fragment herausgespalten und in den entsprechend gespaltenen Transfektor pAcSG2 ligiert. Das erhaltene rekombinante Plasmid pBac-VP1 (Abb. 7) wurde mittels Sequenzierung auf die korrekte Lage der viralen cDNA überprüft.



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Klonierung der kodierenden Sequenz des VP1 des IBDV in den Expressionsvektor pAcSG2**

Das PCR-Fragment der kodierenden Sequenz des VP1 wurde unter Nutzung des Plasmides pP2B [83] und entsprechender Oligonukleotide (VP1bacf, VP1bacr grau unterlegt dargestellt) amplifiziert und anschließend in das *Sma* I-gespaltene Plasmid pUC18 ligiert (Pfeil 1). Das so erzeugte rekombinante Plasmid pUC18-VP1bac wurde mit *EcoR* I und *Pst* I gespalten und das erhaltene DNA-Fragment in das entsprechend gespaltene Expressionsplasmid pAcSG2 ligiert (Pfeil 2). Das damit erhaltene rekombinante Expressionsplasmid pBac-VP1 kodiert für das VP1 unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors (P-Promotor).

Gorbalenya *et al.* [36] ermittelten mittels computergestützten Strukturanalysen, dass die an Position 416 des VP1 befindliche Asparaginsäure vermutlich eine funktionell wichtige Aminosäure des Motivs A der Handflächenregion der RdRp darstellte. Um einerseits eine Negativ-Kontrolle für eine eventuell vorhandene Polymerase-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 zu besitzen und andererseits damit die vermutete Funktionalität dieser Aminosäure zu zeigen, wurde eine ortsgerichtete Mutagenese dieser Aminosäure durchgeführt. Dazu wurde die komplette cDNA des Segments B des IBDV-Stammes P2 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoR* I und *Pst* I aus dem Plasmid pP2B gespalten und nach Agarosegelelektrophorese eluiert. Das entsprechende cDNA-Fragment wurde in ein analog gespaltenes Plasmid pBluescript II SK ligiert. Die korrekte Orientierung des cDNA-Fragments im so erhaltenen Plasmid pSK-P2B (Abb. 8) wurde durch Sequenzierung überprüft. Nach Transformation des Plasmids pSK-P2B in den *E. coli* Stamm CJ236 wurde ssDNA für die darauf folgende ortsgerichtete Mutagenese hergestellt. Unter Nutzung des Oligonukleotids VP1-D416A (siehe Tabelle 1 unter 2.39) wurde das für die Asparaginsäure an Position 416 kodierende Nukleinsäuretriplett in ein für Alanin kodierendes Triplet mutiert. Nach Sequenzierung wurde ein Plasmid ausgewählt (pSK-P2B-D416A, Abb. 8) und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Dra* III und *EcoR* V gespalten. Das entsprechende die Mutation enthaltende DNA-Fragment wurde eluiert und in das analog gespaltene Plasmid pUC18-VP1bac ligiert. Sequenzierungen belegten die erfolgreiche Generierung des Plasmids pUC18-VP1bac-D416A (Abb. 8). Aus diesem Plasmid wurde nach einer *EcoR* I/*Pst* I-Restriktionsenzymspaltung die mutierte Sequenz des VP1 ausgeschnitten, eluiert und anschließend in den entsprechend gespaltenen Baculovirus-Transfervektor pAcSG2 ligiert. Das erhaltene rekombinante Plasmid pBacVP1-D416A (Abb. 8) wurde mittels Sequenzierung auf die korrekte Lage der viralen cDNA überprüft.



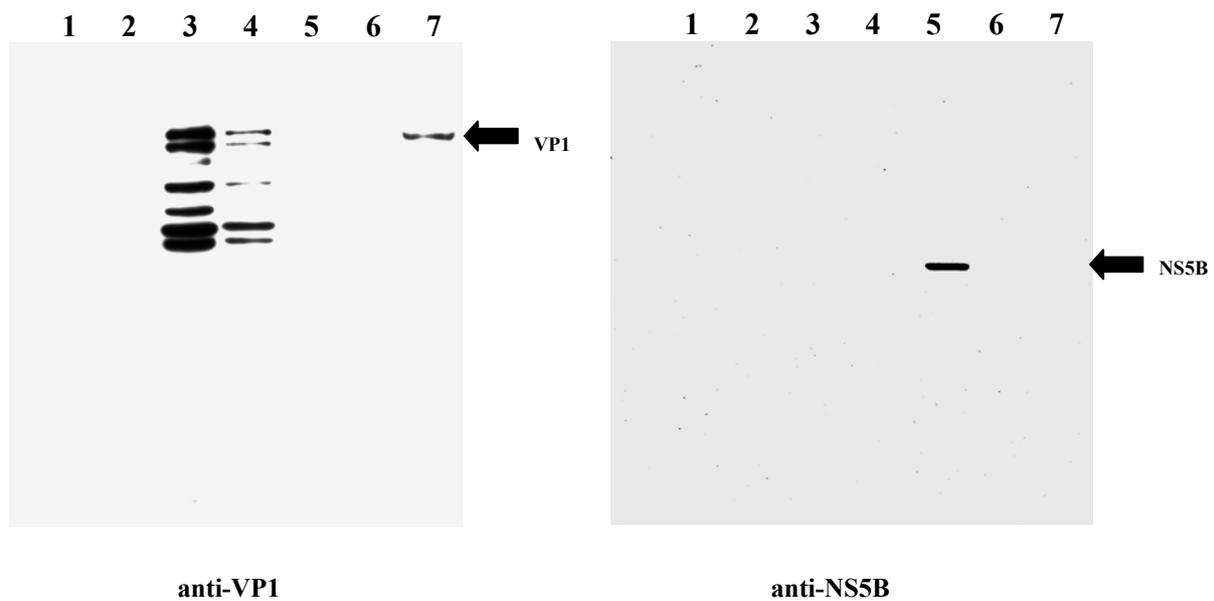
**Abb. 8: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pBacVP1-D416A.**

Die vollständige cDNA-Sequenz des Segments B des IBDV-Stammes P2 wurde durch Spaltung des Plasmides pP2B [83] mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*R I und *Pst* I erhalten und das eluierte DNA-Fragment in das entsprechend gespaltene Plasmid pSK ligiert (Pfeil: Spaltung, Ligation). An dem so erzeugten Plasmid pSK-P2B wurde mittels des Oligonukleotids VP1-D416A eine ortsgerechte Mutagenese durchgeführt. Aus dem daraus entstandenen Plasmid pSK-P2B-D416A wurde ein die Mutation tragendes DNA-Fragment durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Dra* III und *Eco*R V gewonnen und in das entsprechend gespaltene Plasmid pUC18-VP1bac ligiert (Pfeil: 2. Spaltung, 2. Ligation). Anschließend wurde das so erzeugte rekombinante Plasmid pUC18-VP1bac-D416A mit *Eco*R I und *Pst* I gespalten und das erhaltene DNA-Fragment in den entsprechend gespaltenen Expressionsvektor pAcSG2 ligiert (Pfeil: 3. Spaltung, 3. Ligation). Das entstandene Plasmid pBac-VP1-D416A kodierte für ein VP1 mit der Mutation D416A (graues Oval) unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors (P-Promotor).

### **3.3.2 Generierung von rekombinanten Baculoviren zur Expression des VP1 und eines mutierten VP1 (VP1-D416A)**

Die Plasmide pBac-VP1 und pBac-VP1-D416A wurden mit linearisierter Baculo Gold™ DNA in Sf9-Zellen kotransfiziert um rekombinante VP1-exprimierende Baculoviren zu generieren. Fünf Tage nach der Kotransfektion wurden nach niedertouriger Zentrifugation gewonnene Überstände portioniert und bei -70 °C gelagert. Danach erfolgte eine erste Passage dieser Überstände auf Sf9-Zellen. Fünf Tage nach Infektion wurden Passageüberstände durch Zentrifugation gewonnen und Proben in 2x Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse zum Nachweis der Expression des Baculovirus-exprimierten VP1 (Bac-VP1) und seiner Baculovirus-exprimierten Mutante VP1-D416A (Bac-VP1-D416A) durchgeführt. Als Kontrollen dienten entsprechend hergestellte Lysate nicht infizierter bzw. Wildtyp-Baculovirus (AcNPV)-infizierter Sf9-Zellen und Lysate nicht infizierter bzw. mit dem IBDV-Stamm P2-infizierter embryonaler Hühnerzellen (HEZ). Parallel dazu wurde ein rekombinantes Baculovirus zur Infektion von Sf9-Zellen verwendet, welches für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS5B) des Hepatitis C Virus kodierte. Dieses rekombinante Baculovirus (NS5B-Bac) wurde freundlicherweise von Dr. Sven-Erik Behrens (Universität Giessen, Institut für Virologie) zur Verfügung gestellt. Er stellte auch das anti-NS5B Serum zur Verfügung, mit dem die Expression des NS5B im Western Blot nachgewiesen werden sollte. Lysate von NS5B-Bac-infizierten Sf9-Zellen wurden ebenfalls im Western Blot untersucht. Mit dem anti-VP1 Serum (Abb. 9, linke Seite) war weder in dem Lysat der nicht infizierten Sf9-Zellen (Abb. 9, Spur 1) noch in dem der AcNPV-infizierten Sf9-Zellkultur (Abb. 9, Spur 2) eine Reaktion nachweisbar. Auch in den Lysaten der NS5B-Bac-infizierten Sf9-Zellen (Abb. 9, Spur 5) war keine Reaktivität zu beobachten. Das Lysat der nicht infizierten HEZ zeigte ebenfalls keine Reaktion (Abb. 9, Spur 6), während im Lysat der IBDV-infizierten HEZ eine einzelne, das natürliche VP1 (Wildtyp-VP1) repräsentierende Bande sichtbar war (Abb. 9, Spur 7). Im Lysat der Sf9-Zellen, die mit VP1-Bac (Abb. 9, Spur 3) bzw. seiner Mutante VP1-D416A-Bac (Abb. 9, Spur 4) infiziert waren, wurden mehrere Banden nachgewiesen. Die größte dieser Banden besaß das gleiche apparente Molekulargewicht wie das Wildtyp-VP1. Die Baculovirus-induzierte Expression von VP1 wurde daher als erfolgreich betrachtet. Das anti-NS5B Serum (Abb. 9, rechte Seite) zeigte keine Reaktivität bei Lysaten nicht infizierter (Abb. 9, Spur 6) oder IBDV-infizierter HEZ (Abb. 9, Spur 7), nicht infizierter (Abb. 9, Spur 1) oder AcNPV-infizierter Sf9-Zellen (Abb. 9, Spur 2)

oder bei Lysaten von Sf9-Zellen, die mit VP1- (VP1-Bac, Abb. 9, Spur 3) oder VP1-D416A-exprimierenden Baculoviren (VP1-D416A-Bac, Abb. 9, Spur 4) infiziert waren. Dagegen erschien eine einzelne Bande in der Spur, in der Lysate von NS5B-Bac infizierten SF9-Zellen aufgetrennt wurden (Abb. 9, Spur 5). Dieses Produkt zeigte ein apparentes Molekulargewicht von etwa 66 kDa, was dem Molekulargewicht des NS5B entspricht. Es wurde somit von einer erfolgreichen Expression des NS5B ausgegangen.



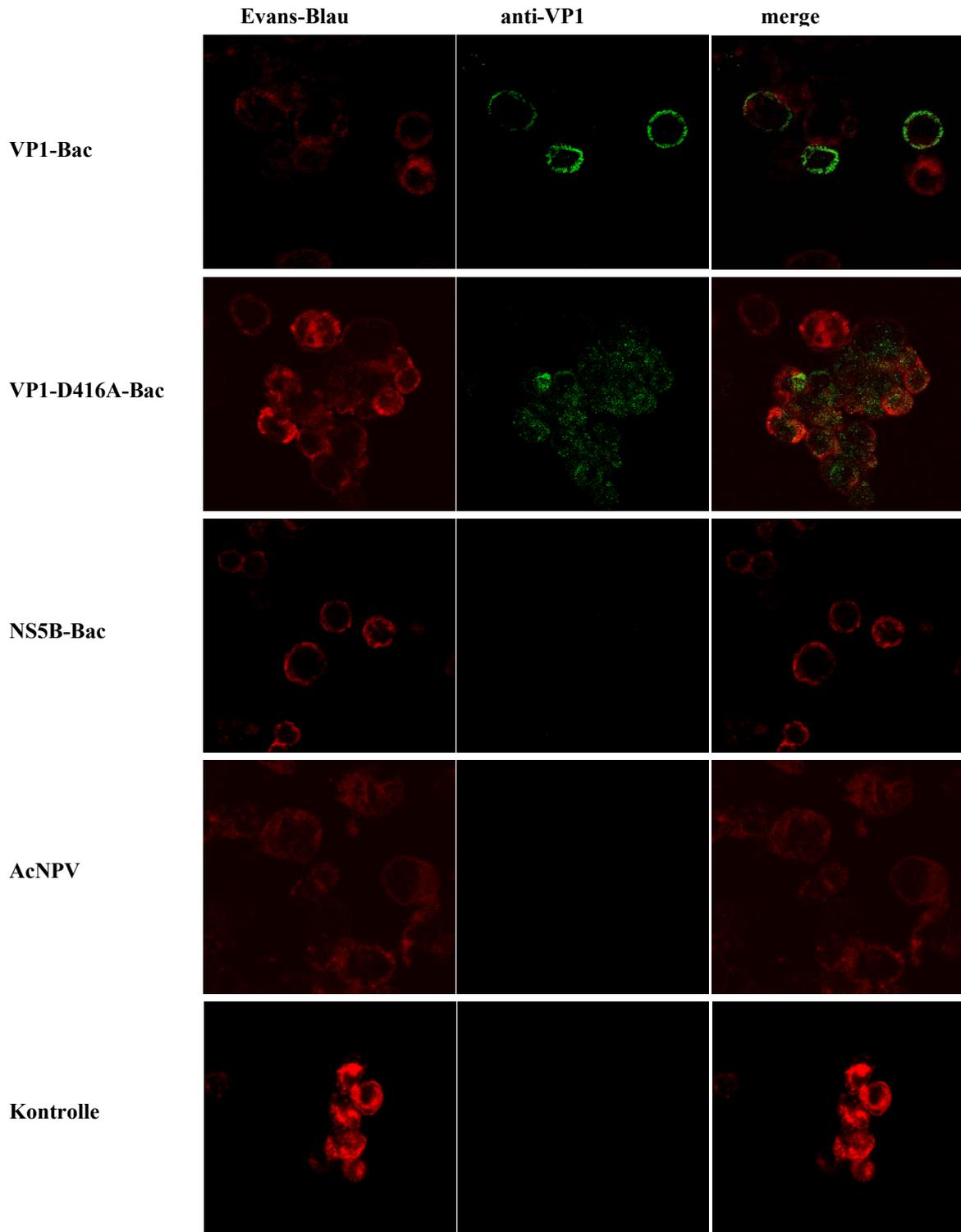
**Abb. 9: Western Blot unter Nutzung des anti-VP1 Serums (linke Seite) und des anti-NS5B Serums (rechte Seite) zum Nachweis der Expression von VP1, VP1-D416A und NS5B mittels rekombinanter Baculoviren.**

Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Der Nachweis der Antikörper erfolgte mit einem Peroxydase-konjugierten anti-Kaninchen IgG (1: 50 000) aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:50000. Mit Pfeilen wurden die Position des VP1, VP1-D416A bzw. NS5B markiert.

- Spur 1: Lysat nicht infizierter Sf9-Zellen
- Spur 2: Lysat AcNPV infizierter Sf9-Zellen
- Spur 3: Lysat von Sf9-Zellen, infiziert mit VP1-D416A-Bac
- Spur 4: Lysat von Sf9-Zellen, infiziert mit VP1-Bac
- Spur 5: Lysat von Sf9-Zellen, infiziert mit NS5B-Bac
- Spur 6: Lysat nicht infizierter HEZ
- Spur 7: Lysat IBDV-Stamm P2 infizierter HEZ

Eine indirekte Immunfluoreszenz an Zellsuspensionen von fixierten Sf9-Zellen (siehe 2.15.2) wurde als weiterer Nachweis der Spezifität der Expression des Bac-VP1 und des Bac-VP1-D416A mittels der rekombinanten Baculoviren VP1-Bac und VP1-D416A-Bac eingesetzt. Zum Nachweis VP1-spezifischer Fluoreszenz wurde ein anti-VP1 Serum vom Kaninchen eingesetzt, mit dessen Hilfe nur in Sf9-Zellen, die mit VP1- bzw. VP1-D416A-kodierenden Baculoviren infiziert waren, eine entsprechende Fluoreszenz nachweisbar war (Abb. 10). Weder in den nicht infizierten noch in den NS5B-Bac- oder AcNPV-infizierten Sf9-Zellkulturen konnte eine VP1-spezifische Immunfluoreszenz festgestellt werden.

Es standen somit rekombinante Baculoviren zur Verfügung, die zur Expression des VP1 des IBDV Verwendung finden sollten. Des Weiteren stand mit dem Western Blot eine Methode zur Verfügung, mögliche Kontaminationen des VP1-Bac bzw. VP1-D416A-Bac mit dem NS5B-Bac auszuschließen.

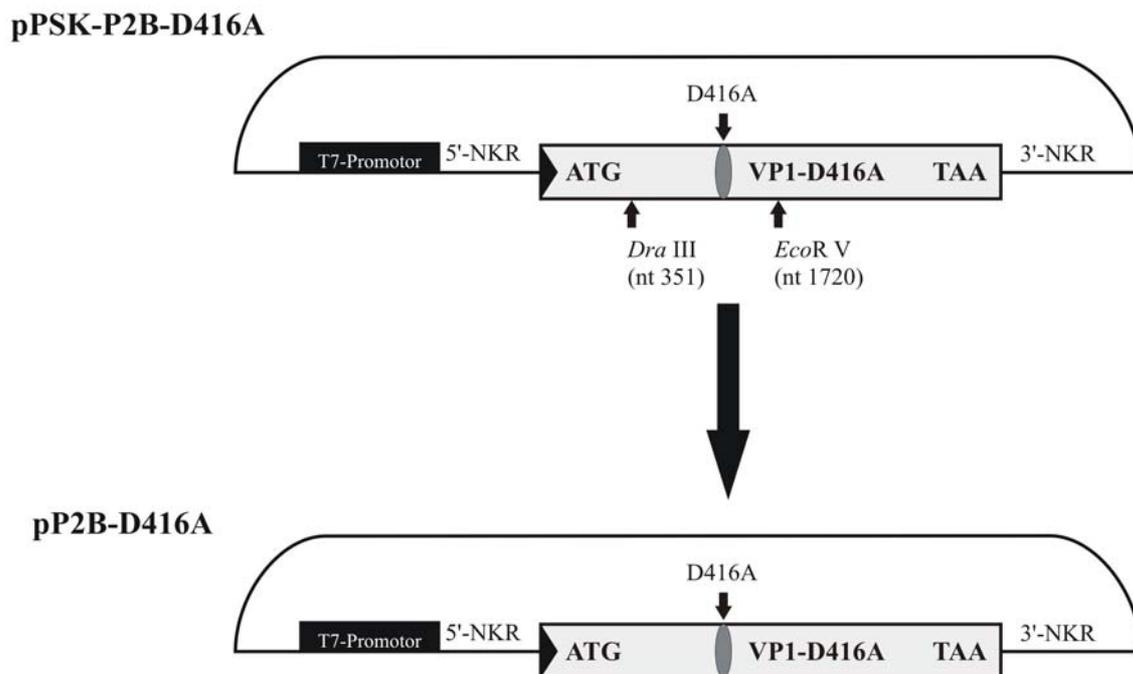


**Abb. 10: Indirekte Immunfluoreszenz an Sf9-Zellsuspensionen zum Nachweis der VP1-Expression mittels rekombinanter Baculoviren.**

Es wurden fünf Sf9-Zellsuspensionen eingesetzt, von denen eine nicht infiziert war, während die anderen vier mit VP1-Bac, VP1-D416A-Bac, NS5B-Bac bzw. AcNPV infiziert waren. Zum Nachweis der VP1-Expression wurde ein anti-VP1 Serum vom Kaninchen eingesetzt. Die Zellen wurden mittels einer Färbung mit dem Farbstoff Evans-Blau dargestellt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit einem DTAF-konjugierten anti-Kaninchen IgG vom Schwein in einer Verdünnung von 1:500.

### 3.4 Die Mutation D416A im VP1 verhindert die Generierung von infektiösem IBDV

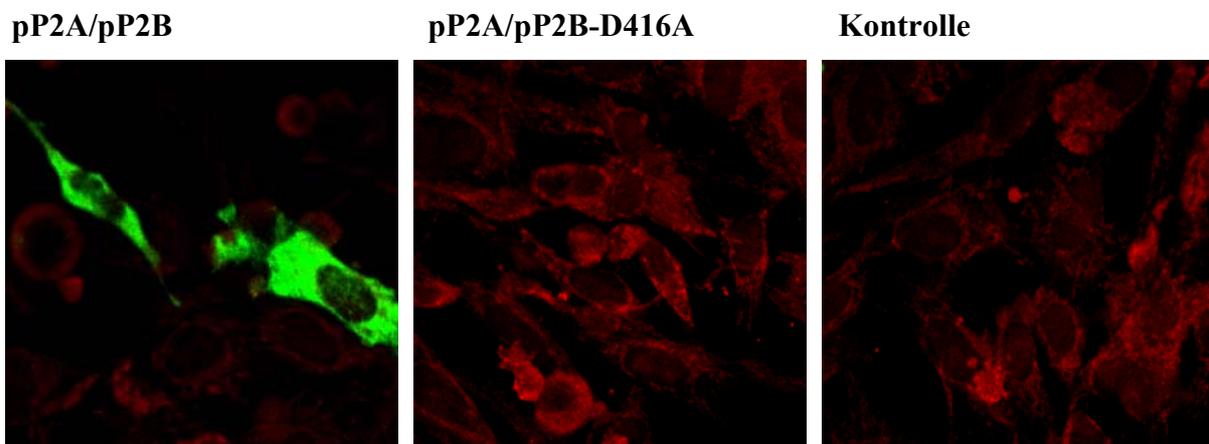
Um zu überprüfen, ob die Mutation des VP1 an der Stelle 416 von Asp zu Ala (D416A) einen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit rekombinanter IBDV besaß, wurden Kotransfektions-Experimente mit cRNA der Segmente A und B des IBDV-Stammes P2 in BHK-21 Zellen durchgeführt. Zunächst wurde das Plasmid pPSK-P2B-D416A mit den Restriktionsendonukleasen *Dra* III und *EcoR* V gespalten. Das die Mutation enthaltende DNA-Fragment wurde eluiert und in das entsprechend gesplattene Plasmid pP2B ligiert (Abb. 11). Die Insertion des entsprechenden DNA-Fragmentes wurde durch Sequenzierung bestätigt. Das entstandene Plasmid wurde als pP2B-D416A bezeichnet.



**Abb. 11: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pP2B-D416A**

Das Plasmid pPSK-P2B-D416A wurde *Dra* III und *EcoR* V gespalten und das erhaltene DNA-Fragment eluiert und anschließend in das entsprechend gesplattene Plasmid pP2B ligiert. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Dra* III und *EcoR* V wurden mit Pfeilen markiert und deren Position in der Nukleotidsequenz (nt) des Segments B wurde angegeben. Der T7-Promotor wurde als schwarzes Rechteck eingezeichnet. Die Stelle der Mutation D416A wurde durch ein graues Oval im Leserahmen des VP1 (hellgraues Rechteck) und einen Pfeil kenntlich gemacht.

Für die Kotransfektionen wurden das Plasmid pP2A [10] mit *Bsr*G I und die Plasmide pP2B bzw. pP2B-D416A mit *Pst* I linearisiert. Anschließend wurde mittels T7-RNA-Polymerase virale plus-strängige cRNA transkribiert. Es folgte eine Kotransfektion der cRNA transkribiert von pP2A/pP2B bzw. pP2A/pP2B-D416A in BHK-21 Zellkulturen. Als Kontrollen dienten mock-transfizierte BHK-21 Zellkulturen. Diese Kotransfektionen wurden zwei Tage nach der Transfektion einer Gefrier/Tau-Behandlung unterzogen und die Zellkulturüberstände auf embryonalen Hühnerzellen passagiert. Anschließend wurde eine IIFT unter Verwendung eines anti-IBDV Serums vom Kaninchen [80] zur Analyse genutzt. Dabei war zwei Tage nach Infektion der embryonalen Hühnerzellkulturen eine IBDV-spezifische Fluoreszenz nur in solchen Zellkulturen zu beobachten, die mit Zellkulturüberständen nach der cRNA-Kotransfektion pP2A/pP2B inkubiert wurden (Abb. 12). Selbst eine längere Inkubation bis zu fünf Tagen und dreimaliges Passagieren mit anschließender Kontrolle mittels IIFT änderten dieses Ergebnis nicht. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass die Mutation D416A im VP1 des IBDV die Generierung rekombinanter IBDV verhindert. Somit ergab sich ein starker Hinweis für die Funktionalität der Asparaginsäure an der Position 416 des VP1.



**Abb. 12: Indirekte Immunfluoreszenz an embryonalen Hühnerzellen zum Nachweis der Generierung infektiöser IBDV nach cRNA-Kotransfektion in BHK-21 Zellen**

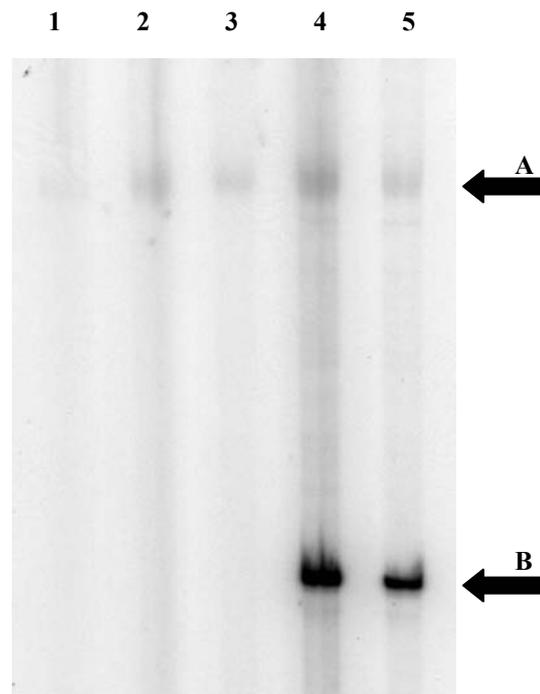
Embryonale Hühnerzellen wurden mit Überständen von BHK-21 Zellkulturen infiziert, die zwei Tage nach Ko-Transfektion von von cRNA von pP2A/pP2B bzw. pP2A/pP2B-D416A und einer mock-tranfizierten Zellkultur gewonnen wurden. Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen in der IIFT unter Nutzung eines anti-IBDV Serums vom Kaninchen untersucht. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem DTAF-konjugierten anti-Kaninchen IgG vom Schwein in einer Verdünnung von 1:500. Zur Gegenfärbung aller Zellen wurden die Proben mit einer Evans-Blue-Lösung (0,0002%ig) inkubiert

### **3.5 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

#### **3.5.1 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob das mittels rekombinanter Baculoviren exprimierte VP1 eine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität (RdRp-Aktivität) aufwies. Dazu wurden Sf9-Zellen mit dem AcNPV, den rekombinanten Baculoviren VP1-Bac, VP1-D461A-Bac bzw. NS5B-Bac mit einer MOI von 1 infiziert. Eine zusätzliche Sf9-Zellkultur wurde nicht infiziert. Fünf Tage nach Infektion wurden Homogenisate von den infizierten bzw. nicht infizierten Sf9-Zellkulturen hergestellt. Die erhaltenen zellulären Homogenisate wurden in den Versuchen mit cRNA unter Zusatz von radioaktiv-markiertem UTP inkubiert, die vorher vom Plasmid p $\Delta$ P2A transkribiert wurde. Nach Inkubation der cRNA mit den unterschiedlichen zellulären Homogenisaten wurden diese Reaktionsansätze mit Proteinase K inkubiert und anschließend einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach Ethanol-Präzipitation wurden die durch Zentrifugation sedimentierten Reaktionsprodukte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Exposition eines X-OMAT AR Films (Kodak) analysiert (Abb. 13). Ein Reaktionsprodukt, welches sich im oberen Bereich des Gels befand, wurde in allen Ansätzen nachgewiesen (Abb. 13, Pfeil A). Dieses Reaktionsprodukt entstand vermutlich durch eine in allen Homogenisaten vorhandene Enzymaktivität. Dabei wurde sehr wahrscheinlich die eingesetzte *in vitro* transkribierte cRNA des Plasmids p $\Delta$ P2A während der Inkubation radioaktiv markiert. Ein zusätzliches, offensichtlich schneller laufendes Reaktionsprodukt erschien nur in den Ansätzen, in denen das Baculovirus-exprimierte VP1 (Bac-VP1) des IBDV oder das Baculovirus-exprimierte NS5B (Bac-NS5B) des HCV eingesetzt wurden (Abb. 13, Spuren 4 und 5, Pfeil B). Dies gab einen Hinweis auf ähnliche Aktivitäten der Proteine VP1 und NS5B. Da für das Bac-NS5B bereits 1996 eine RdRp-Aktivität nachgewiesen wurde [8], handelte es sich sehr wahrscheinlich auch beim Bac-VP1 um eine entsprechende RdRp-Aktivität. Einen indirekten Beleg für diese RdRp-Aktivität lieferte das Fehlen des schneller laufenden Reaktionsproduktes in dem Ansatz, welcher das Baculovirus-exprimierte Protein VP1-D416A (Bac-VP1-D416A) enthielt (Abb. 13, Spur 3). Bei diesem Protein war die im Motiv A der RdRp wichtige Aminosäure Asparaginsäure an der Position 416 zu einem Alanin mutiert worden. Das Fehlen der RdRp-Aktivität des Bac-VP1-D416A schien die Theorie zu bestätigen, dass die Aminosäure D416 eine wesentliche Rolle im aktiven Zentrum der RdRp

des IBDV besitzt und das vermutete Motiv A [36] sich tatsächlich dort befand. Durch die fehlende RdRp-Aktivität in den Ansätzen, in denen Homogenisate der VP1-D416A-Bac infizierten Zellen eingesetzt wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass die Aktivität in dem Bac-VP1 enthaltenden Ansatz sehr wahrscheinlich durch das VP1 vermittelt wurde.



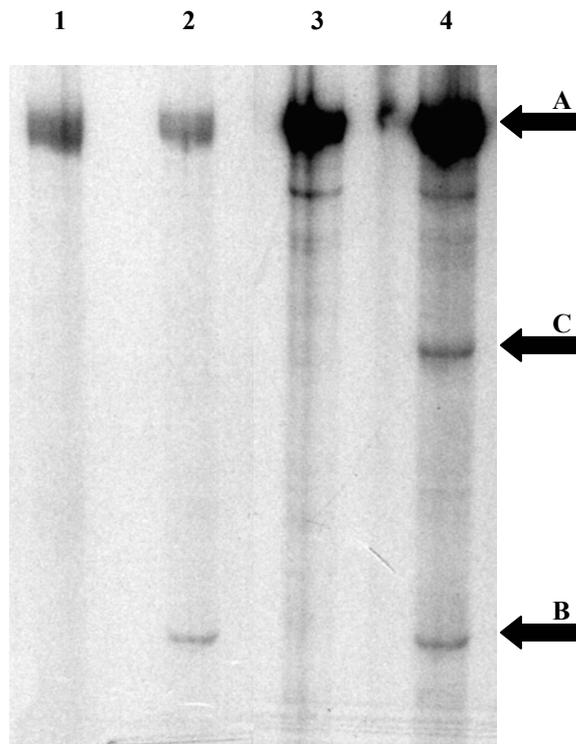
**Abb. 13: Analyse der RdRp-Aktivität unter Nutzung verschiedener Sf9-Zelllysate**

Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 5% Acrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff. Der obere Pfeil (A) markiert das in allen Ansätzen vorhandene Reaktionsprodukt. Der untere Pfeil (B) markiert das Reaktionsprodukt, welches nach Inkubation mit den Lysaten von Bac-VP1 und Bac-NS5B infizierten Sf9-Zellkulturen auftrat.

- Spur 1: Lysat nicht infizierter Sf9-Zellen
- Spur 2: Lysat AcNPV-infizierter Sf9-Zellen
- Spur 3: Lysat VP1-D416A-Bac-infizierter Sf9-Zellen
- Spur 4: Lysat VP1-Bac-infizierter Sf9-Zellen
- Spur 5: Lysat NS5B-Bac-infizierter Sf9-Zellen.

### **3.5.2 Untersuchungen zur RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 mit radioaktiv markierter cRNA**

Das in allen Reaktionsansätzen entstehende und in den Gelen langsamer laufende Reaktionsprodukt repräsentierte sehr wahrscheinlich die eingesetzte cRNA, die während der Experimente durch die in den Lysaten eventuell vorhandene Aktivität zellulärer Enzyme radioaktiv markiert wurde. Dabei ist eine Aktivität einer zellulären Terminalen Nukleotidyl-Transferaseaktivität (TNT-Aktivität) denkbar. Um dies zu untersuchen, wurden die Experimente vergleichend einerseits mit  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>] UTP-markierter und andererseits mit nicht radioaktiv markierter Substrat-cRNA durchgeführt. Dabei kamen Homogenisate von Sf9-Zellen zum Einsatz, die entweder mit AcNPV oder VP1-Bac infiziert worden waren (Abb. 14). Die Auswertung des exponierten Filmes zeigte, dass beim Einsatz radioaktiv markierter cRNA als Substrat für die Enzymaktivität des Bac-VP1 ein Produkt im oberen Bereich und ein Produkt im unteren Bereich des Gels zu beobachten war. Reaktionsprodukte mit gleichem Laufverhalten waren auch in den Versuchen zu beobachten, die mit nicht markierter Substrat-cRNA durchgeführt wurden. Da bei den Versuchen mit radioaktiv markierter Substrat-cRNA keine radioaktiv markierten Nukleotide zugesetzt wurden, war das Produkt mit der schnelleren elektrophoretischen Mobilität sehr wahrscheinlich ein Derivat der radioaktiv markierten Substrat-cRNA, erhalten durch die RdRp-Aktivität des im zellulären Lysat vorhandenen Bac-VP1. Das nach Inkubation mit der nicht radioaktiv markierten Substrat-cRNA entstehende und langsamer laufende Reaktionsprodukt repräsentierte demnach sehr wahrscheinlich die durch zelluläre Enzymaktivität, wie zum Beispiel der TNT-Aktivität, nun 3'-terminal radioaktiv markierte Substrat-cRNA. Diese Hypothese fand dadurch Unterstützung, dass in den Reaktionsansätzen unter Zusatz von Lysaten aus AcNPV-infizierten Sf9-Zellen nach Einsatz nicht radioaktiv markierter cRNA ebenfalls ein Reaktionsprodukt im oberen Bereich des Gels zu beobachten war. Dieses zeigte die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die radioaktiv markierte cRNA nach Inkubation mit Lysaten aus AcNPV-infizierten Sf9-Zellen. Die Natur einer weiteren Bande in den Versuchen mit radioaktiv markierter Substrat-cRNA war nicht zu erklären.



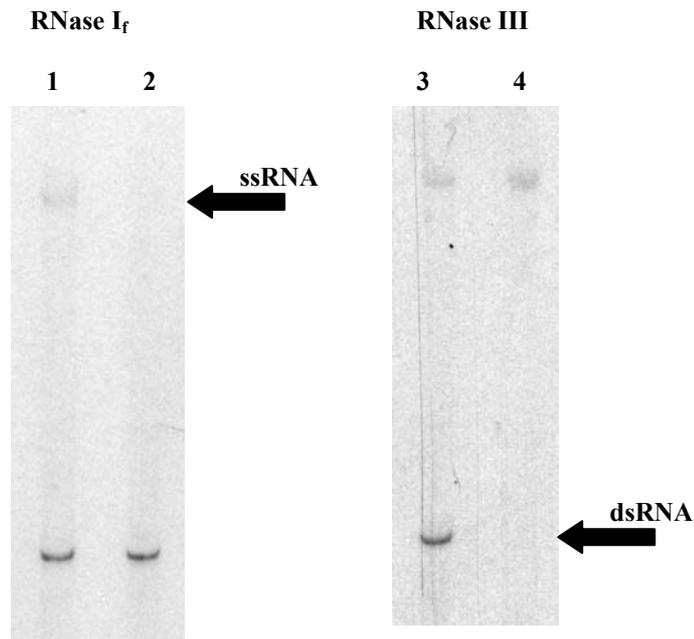
**Abb. 14: Analyse der RdRp-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 mit  $^{32}\text{P}$ -markierter und nicht markierter Substrat-cRNA mittels Homogenisaten VP1-Bac- bzw. AcNPV-infizierter Sf9-Zellkulturen**

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 5 % Acrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff. Der obere Pfeil (A) markiert die Substrat-cRNA und der untere Pfeil (B) markiert das Reaktionsprodukt der RdRp-Aktivität des VP1. Der Pfeil (C) in der Mitte markiert ein weiteres Reaktionsprodukt.

- Spur 1: Lysat AcNPV-infizierter Sf9-Zellen unter Einsatz nicht markierter cRNA
- Spur 2: Lysat VP1-Bac-infizierter Sf9-Zellen unter Einsatz nicht markierter cRNA
- Spur 3: Lysat AcNPV-infizierter Sf9-Zellen unter Einsatz radioaktiv markierter cRNA
- Spur 4: Lysat VP1-Bac-infizierter Sf9-Zellen unter Einsatz radioaktiv markierter cRNA.

### **3.5.3 Charakterisierung der Reaktionsprodukte der RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

Eine weitere Charakterisierung der Reaktionsprodukte nach Inkubation der Substrat-cRNA mit Bac-VP1-enthaltenden Sf9-Zelllysaten erfolgte mit Hilfe von speziellen RNasen. Dazu wurden Enzyme eingesetzt, die entweder spezifisch einzelsträngige (ss) RNA (RNase I<sub>f</sub>) oder spezifisch doppelsträngige (ds) RNA (RNase III) hydrolysieren. Nach Inkubation der sedimentierten Reaktionsprodukte der Versuche zur RdRp-Aktivität mit RNase I<sub>f</sub> war das obere Reaktionsprodukt nicht mehr nachweisbar, während in der parallel behandelten Probe ohne Zugabe der RNase beide Reaktionsprodukte sichtbar waren (Abb. 15, linke Seite). Es handelte sich damit bei dem oberen Reaktionsprodukt sehr wahrscheinlich um ssRNA. Im Gegensatz dazu war nach Inkubation der sedimentierten Reaktionsprodukte mit RNase III die untere Bande nicht mehr zu beobachten (Abb. 15, rechte Seite), die damit sehr wahrscheinlich aus dsRNA bestand. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass es sich bei beiden sichtbaren Reaktionsprodukten nach Inkubation mit Homogenisaten von VP1-Bac-infizierten Sf9-Zellkulturen um RNA handelte. Dabei handelte es sich bei dem oberen Reaktionsprodukt sehr wahrscheinlich um die eingesetzte Substrat-cRNA, welche durch eine zelluläre Enzymaktivität, vermutlich TNT-Aktivität, radioaktiv markiert wurde. Da das untere Reaktionsprodukt dsRNA repräsentierte und nur dort zu beobachten war, wo Bac-VP1 eingesetzt wurde, handelte es sich dabei um das Produkt einer VP1-abhängigen RdRp-Aktivität.



**Abb. 15: Darstellung der Reaktionsprodukte der RdRp-Reaktion nach Inkubation mit verschiedenen, Substrat-spezifischen RNasen**

Reaktionsprodukte wurden nach Inkubation nicht markierter Substrat-cRNA mit Bac-VP1-enthaltenden Sf9-Zelllysaten entweder mit einzelstrang-spezifischer RNase I<sub>f</sub> oder doppelstrang-spezifischer RNase III inkubiert. Sowohl Mock-inkubierte als auch RNase-behandelte Proben wurden nach Proteinextraktion in einem 5% Acrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff aufgetrennt. Die einzelsträngige RNA (ssRNA) bzw. doppelsträngige RNA (dsRNA) wurde jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

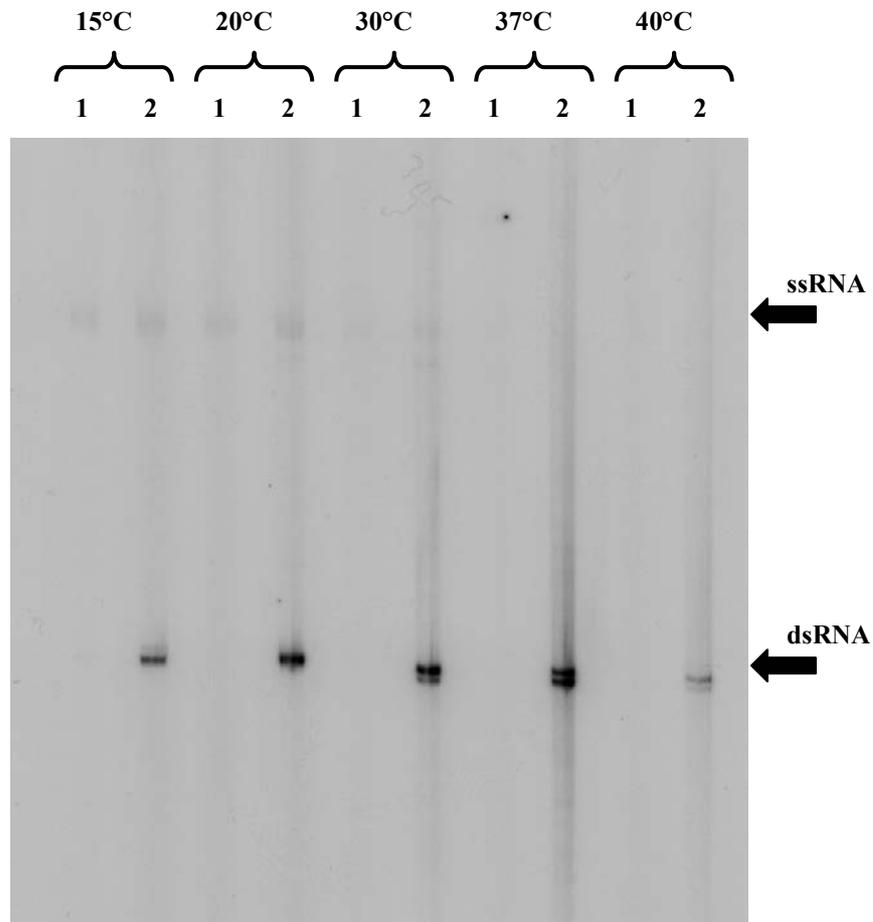
- Spur 1: Mock-behandeltes Reaktionsprodukt (RNase I<sub>f</sub>)
- Spur 2: RNase I<sub>f</sub>-behandeltes Reaktionsprodukt
- Spur 3: Mock-behandeltes Reaktionsprodukt (RNase III)
- Spur 4: RNase III-behandeltes Reaktionsprodukt

### **3.5.4 Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

Zur weiteren Charakterisierung der enzymatischen RdRp-Aktivität des Bac-VP1 wurde die Temperaturabhängigkeit untersucht. Dazu wurden die Experimente bei 15 °C, 22 °C, 30 °C, 37 °C und 40 °C mit Homogenisaten von AcNPV- und VP1-Bac-infizierten Sf9-Zellen durchgeführt. Nach Elektrophorese und Trocknung des Gels wurde eine Expositionsfolie dem Gel exponiert und dann mittels Phosphoimager ausgewertet. Diese Versuche wurden dreifach wiederholt. Als beispielhaft für die erzielten Ergebnisse wurde das in der Abbildung 16 dargestellte Gel ausgewählt. Bei Inkubationstemperaturen von 15 °C bis 37 °C wurde eine Zunahme des Signals des Reaktionsprodukts im unteren Teil des Gels beobachtet. Dieses Produkt repräsentierte sehr wahrscheinlich das an der Substrat-cRNA synthetisierte Reaktionsprodukt, welches nun als doppelsträngiges RNA-Reaktionsprodukt vorlag. Es handelte sich bei diesen Versuchen um ein Produkt der RdRp-Aktivität des Bac-VP1, da es nur nach Inkubation mit den entsprechenden Lysaten zu beobachten war. Die Stärke des Signals dieses Reaktionsprodukts nahm bei 40 °C wieder ab.

Auffällig war, dass die Signalintensität des oberen Reaktionsproduktes bis zu einer Inkubationstemperatur von 30 °C abnahm und dieses Signal ab 37 °C nicht mehr nachweisbar war. Aus den vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass es sich bei diesem Reaktionsprodukt sehr wahrscheinlich um die radioaktiv markierte Substrat-cRNA handelte, die hier als einzelsträngige RNA vorlag. Die graduelle Abnahme der Intensität des entsprechenden Signals wies auf eine Temperatursensitivität der enzymatischen Aktivität hin, die zur radioaktiven Markierung der eingesetzten Substrat-cRNA führte. Dies lieferte einen weiteren Hinweis auf die vermutlich zelluläre Natur der Markierungsaktivität, da Sf9-Zellen bei Temperaturen von etwa 28 °C optimal wachsen [124].

Zusätzlich erschien ab einer Temperatur von 30 °C ein weiteres Reaktionsprodukt, welches geringfügig schneller lief als das schon aus vorhergehenden Versuchen bekannte dsRNA-Produkt. Der Ursprung dieses Reaktionsprodukts konnte nicht geklärt werden. Da es aber nur in den Versuchen mit Bac-VP1 enthaltendem Sf9-Homogenisat nachweisbar war, wurde sein Auftreten der RdRp-Aktivität des VP1 zugeschrieben. Die Analyse der erhaltenen dsRNA-Banden mit dem Computerprogramm AIDA ergab, dass die optimale Temperatur für die Durchführung der Tests auf RdRp-Aktivität für das Bac-VP1 bei 37 °C lag. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurden nachfolgende Experimente zur weiteren Charakterisierung der RdRp-Aktivität des VP1 bei 37 °C durchgeführt.



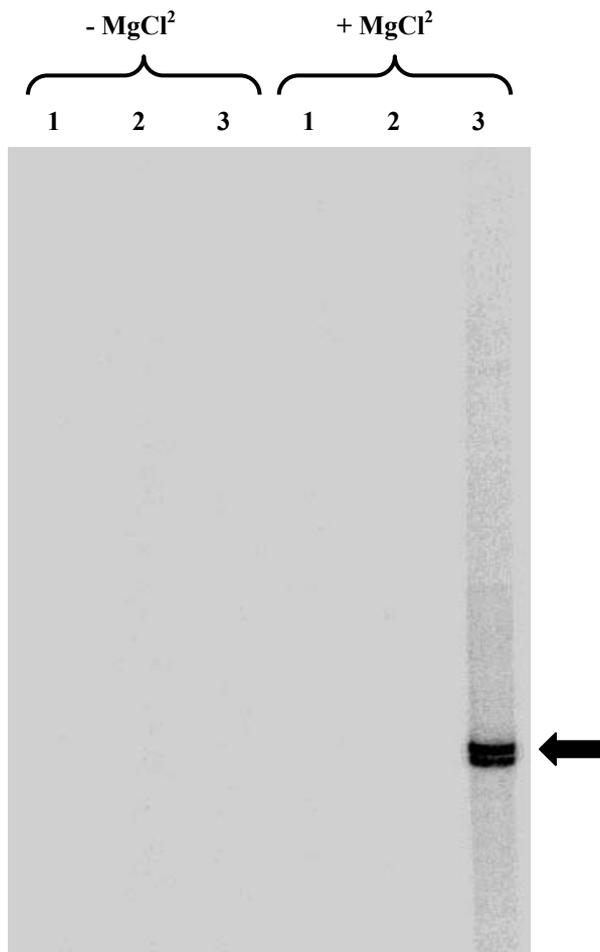
**Abb. 16: Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die RdRp-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

Substrat-cRNA wurde mit Lysaten AcNPV-infizierter (Spur 1) bzw. VP1-Bac-infizierter (Spur 2) Sf9-Zellen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die jeweilige Inkubationstemperatur ist oberhalb der Spuren angegeben. Die Reaktionsprodukte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 5% Acrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff.

### **3.5.5 Untersuchungen zur Abhängigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 von Mg<sup>2+</sup>-Ionen**

Die Konservierung der aktiven Domäne bei den DNA-Polymerasen der B (Pol $\alpha$ )-Familie [128], der T7-RNA-Polymerase [113], der Reversen Transkriptase des Humanen Immundefizienzvirus [58] und den RdRp des Poliovirus [38] und des HCV [8] und die Bindung von zwei Magnesiumionen durch diese Polymerasen lassen vermuten, dass alle Polynukleotid-Polymerasen den gleichen „Zwei-Metallionen“-Mechanismus in ihrer Polymerasereaktion nutzen [118]. Auch für die RdRp-Aktivität des VP1 lagen Hinweise auf die Abhängigkeit von Magnesiumionen durch Untersuchungen an gereinigten Viruspartikeln vor, bei denen eine Aktivität nur nach Entfernung von Ca<sup>2+</sup>- und unter Zugabe von Mg<sup>2+</sup>-Ionen nachweisbar war [115]. Daher wurden Experimente zur Untersuchung der Magnesiumabhängigkeit der RdRp-Aktivität des Bac-VP1 unter Nutzung der nicht markierten Substrat-cRNA durchgeführt. Es wurden Homogenisate nicht infizierter, AcNPV-infizierter bzw. VP1-Bac-infizierter Sf9-Zellen eingesetzt. In zwei parallelen Reaktionsansätzen wurde ein Ansatz mit 5 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)-Zusatz und ein Ansatz ohne Zusatz von MgCl<sub>2</sub> verwendet (Abb. 17). In diesen Experimenten wurde bei Fehlen des MgCl<sub>2</sub> in keinem Fall ein Reaktionsprodukt nachgewiesen, das für eine RdRp-Aktivität gesprochen hätte. Im Gegensatz dazu wurde in dem Reaktionsansatz, in dem Bac-VP1-haltiges Lysat unter Zusatz von MgCl<sub>2</sub> Verwendung fand, das erwartete Reaktionsprodukt im unteren Bereich des Gels nach Exposition eines Films beobachtet. Dieses Resultat war ein deutlicher Hinweis darauf, dass die beobachtete RdRp-Aktivität des Bac-VP1 Magnesium-abhängig war.

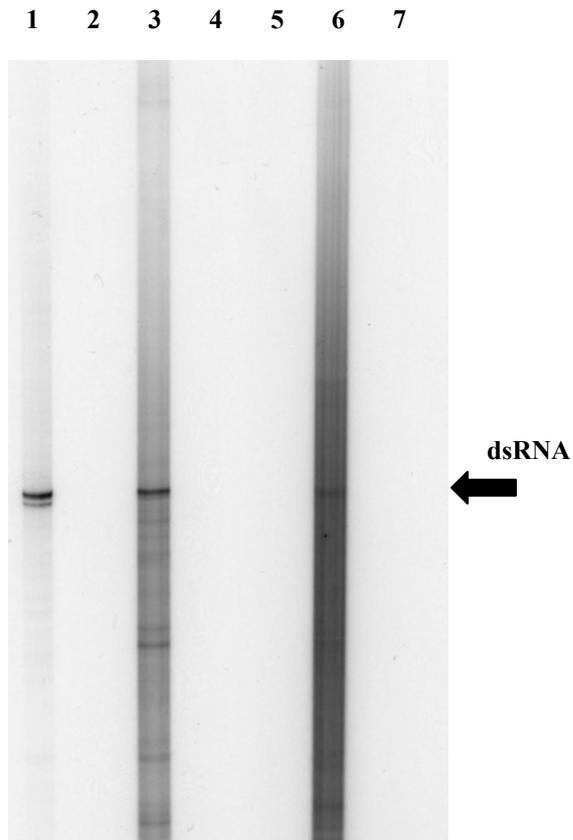
Zur weiteren biochemischen Charakterisierung der Abhängigkeit der RdRp-Aktivität des VP1 von zweiwertigen Ionen wurde in nachfolgenden Experimenten das MgCl<sub>2</sub> durch andere zweiwertige Kationen-enthaltende Verbindungen ersetzt (Abb. 18). Dazu wurden CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> in gleicher Molarität wie MgCl<sub>2</sub> (5 mM) in den Bac-VP1-enthaltenden Reaktionsansätzen eingesetzt. Dabei wurde nur nach Einsatz von MnCl<sub>2</sub> oder CoCl<sub>2</sub> ein Reaktionsprodukt nachgewiesen, das dem der Reaktion mit MgCl<sub>2</sub> entsprach. Die Effizienz der Reaktion war jedoch in beiden Fällen geringer als die in dem MgCl<sub>2</sub>-enthaltenden Ansatz.



**Abb. 17: Untersuchungen zur MgCl<sub>2</sub>-Abhängigkeit der RdRp-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

Zelllysate nicht infizierter und AcNPV- bzw. VP1-Bac-infizierter Sf9-Zellen wurden in Experimenten mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> (+) oder ohne MgCl<sub>2</sub> (-) auf RdRp-Aktivität untersucht. Die Analyse erfolgte in einem 5% Acrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff. Das Reaktionsprodukt wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet.

- Spur 1: Lysat nicht infizierter Sf9-Zellen
- Spur 2: Lysat AcNPV-infizierter Sf9-Zellen
- Spur 3: Lysat VP1-Bac-infizierter Sf9-Zellen



**Abb. 18: Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher zweiwertiger Ionen auf die RdRp-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1**

Die Experimente wurden in einem Standardtest unter Nutzung von Lysaten VP1-Bac-infizierter Sf9-Zellen durchgeführt. Es wurden anstelle von 5 mM  $\text{MgCl}_2$  andere chemische Verbindungen mit zweiwertigen Ionen in gleicher Molarität eingesetzt. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 5% Acrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff. Das Reaktionsprodukt wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet.

- Spur 1:  $\text{MgCl}_2$
- Spur 2:  $\text{CuCl}_2$
- Spur 3:  $\text{CoCl}_2$
- Spur 4:  $\text{FeSO}_4$
- Spur 5:  $\text{NiCl}_2$
- Spur 6:  $\text{MnCl}_2$
- Spur 7:  $\text{CaCl}_2$

#### 4. Diskussion

Bisher ist wenig über die molekularen Mechanismen der viralen Replikation der Mitglieder der Familie *Birnaviridae* bekannt. Bereits in den späten achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts ergaben computergestützte Vergleiche der Aminosäuresequenzen des VP1 von Birnaviren mit denen von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRp) plussträngiger RNA-Viren, dass es sich bei diesem Protein vermutlich um eine RdRp handelt [35] [73]. Es wurden vier Motive identifiziert, die den RdRp plussträngiger RNA-Viren in ihrer Primärstruktur ähnlich waren. Neuere Studien gingen davon aus, dass eines dieser vier Motive, das Motiv C, bei Birnaviren nicht in der von anderen RdRp bekannten Form und Lokalisation vorkommt [36] [109]. Dabei ergab die computergestützte Analyse von Gorbalenya *et al.* [36], dass das Motiv C im Gegensatz zu anderen RdRp [87] [97] [118] im VP1-Molekül stromaufwärts des Motivs A positioniert sein könnte. Weiterhin wurde für die in anderen RdRp im Motiv C vorhandene funktionell wichtige Aminosäuresequenz GDD bei Birnaviren die Aminosäuresequenz ADN vorhergesagt [36]. Solche computergestützten, theoretischen Vorhersagen bedürfen der Überprüfung in entsprechenden *in vitro*-Studien unter Nutzung der entsprechenden Proteine.

Eine Polymerase-Aktivität wurde beim IBDV bisher an gereinigten Viruspartikeln nachgewiesen [115]. Diese Aktivität konnte jedoch keinem viralen Protein des IBDV zugewiesen werden. Dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten VP1 wurde bereits vorher eine Transkriptionsaktivität *in vitro* zugeordnet [26] [67]. Außerdem wurde das VP1 *in vitro* guanyliert, besaß aber keine Guanylyltransferaseaktivität [26] [54] [109]. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Protein mit einem Molekulargewicht von 90 kDa an das virale Genom des IBDV bindet [76] und dieses zirkularisiert. Die Identität dieses Proteins wurde nicht gezeigt. Das mit 90 kDa angegebene Molekulargewicht kam jedoch dem des VP1 (98 kDa) sehr nah. Beim IPNV war das VP1 mit der plussträngigen RNA des Doppelstranges der genomischen RNA assoziiert [68]. Somit bildet das VP1 sowohl beim IBDV, als auch bei IPNV vermutlich ein genomassoziiertes Virusprotein (VPg, viral protein, genome-linked). Es besteht die Möglichkeit, dass die Bindung dieses Proteins an die genomische RNA eine Funktion während der Replikation der Birnaviren besitzt. Eine entsprechende Funktion eines VPg wurde erstmals für das Poliovirus gezeigt [129]. Dagegen besitzt das VPg des Norwalk-Virus (NV), einem Vertreter der Familie *Caliciviridae*, sehr wahrscheinlich eine andere Aufgabe [22]. Das Genom des NV besteht, wie das Genom des Poliovirus, aus plussträngiger RNA.

Am 5'-Ende des NV-Genoms wurden keine Cap-Strukturen oder „internal ribosomal entry sites“ (IRES) nachgewiesen, sondern ein kovalent gebundenes virales VPg [19]. Dieses VPg interagiert mit dem eukaryoten Transkriptionsinitiationsfaktor eIF3 und inhibiert die Translation von Reporter-RNAs mit CAP-Strukturen oder IRES-Elementen in *in vitro*-Translationsversuchen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass das VPg des NV eine Rolle bei der Initiation der Translation des viralen Genoms spielt. Ob solche Funktionen auch für das VP1 als VPg der Birnaviren zutreffen, blieb bisher unklar.

In den hier vorgestellten Untersuchungen sollte die lange vermutete RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität (RdRp-Aktivität) des VP1 untersucht werden. Dafür sollte das VP1 exprimiert werden. Eine Expression des VP1 wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Expressionssystemen und bei verschiedenen Vertretern der *Birnaviridae* erfolgreich durchgeführt [26] [67] [109]. Bisher wurde in keinem Fall eine RdRp-Aktivität für das VP1 gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde das VP1 zunächst als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) mit Hilfe des pMAL-Systems in *E. coli* exprimiert. Zunächst wurde bei der vom Hersteller des pMAL-Expressionssystems empfohlenen Inkubationstemperatur von 37 °C keine erfolgreiche MBP-VP1-Expression nachgewiesen. Da die alleinige Expression des MBP in entsprechenden Kontrollexperimenten funktionierte, war die Ursache für die ungenügende Expression des MBP-VP1 sehr wahrscheinlich beim VP1 zu suchen. Durch das Senken der Inkubationstemperatur während der Expression konnte die Ausbeute an MBP-VP1-Fusionsprotein verbessert werden. Zufriedenstellende Mengen des MBP-VP1 wurden bei einer Temperatur von 20 °C erhalten, so dass weitere Expressionsversuche des MBP-VP1 in *E. coli* bei dieser Temperatur durchgeführt wurden. Als mögliche Ursache für dieses Expressionsverhalten war zu vermuten, dass eine durch den hohen Gehalt des VP1 an basischen Aminosäuren bedingte eventuelle Toxizität des VP1 für *E. coli* bei 20 °C geringer war als bei höheren Temperaturen. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass das VP1 bei 37 °C, im Gegensatz zu 20 °C, in biologisch aktiver Form vorlag und dadurch für die exprimierenden *E. coli*-Zellen schon in geringsten Mengen toxisch wirkte.

Wie sich in Western Blot-Analysen des *E. coli*-exprimierten MBP-VP1 herausstellte, war eine erhebliche Anzahl von Produkten zu beobachten, die aufgrund ihrer Reaktivität mit einem anti-VP1 Serum als VP1-spezifisch anzusehen waren. Die meisten dieser Produkte wiesen dabei ein kleineres als das erwartete Molekulargewicht des MBP-VP1 auf. Nach Spaltung des affinitätschromatografisch gereinigten MBP-VP1 mit dem Faktor Xa wurde mittels des

anti-VP1 Serums gezeigt, dass die Banden in ihrem apparenten Molekulargewicht in ihrer Gesamtheit abnahmen. Aufgrund der Vielzahl der Banden war eine genaue Zuordnung nicht möglich. Wurde ein anti-MBP Serum verwendet, war nach der Spaltung des MBP-VP1 mit dem Faktor Xa nur noch die Bande des durch die Klonierung der kodierenden Sequenz des VP1 in das Expressionsplasmid pMAL c2 verkürzten MBP sichtbar. Zusätzlich blieb eine schwache Bande im oberen Teil des Gels erhalten, welche sehr wahrscheinlich ungespaltenes Fusionsprotein MBP-VP1 repräsentierte. Damit war es sehr wahrscheinlich, dass Verkürzungen im C-terminalen Bereich des VP1 stattgefunden hatten. Diese Vermutung wurde auch dadurch erhärtet, dass sich das für die Affinitätschromatografische Reinigung notwendige MBP-Protein im N-terminalen Bereich des Fusionsproteins befand und somit N-terminale Verkürzungen nicht gereinigt werden konnten. Die C-terminalen Verkürzungen könnten durch Translationsabbrüche während der Expression des Fusionsproteins bedingt worden sein. Weiterhin wäre es möglich, dass verkürzte Boten-RNA synthetisiert wurde, die anschließend zu einem verkürzten Fusionsprotein translatiert wurde. Eine stichhaltige Erklärung für das Expressionsmuster des MBP-VP1-Fusionsproteins in *E. coli* konnte im Verlauf der hier vorgestellten Untersuchungen nicht gefunden werden.

Das über die Amylose-Harz-Matrix gereinigte Fusionsprotein MBP-VP1 zeigte weder bei 30 °C noch bei 40 °C und in keinem der vier verwendeten Puffersysteme eine RdRp-Aktivität. Auch nach der Spaltung des Fusionsproteins MBP-VP1 mit dem Faktor Xa wurde keine RdRp-Aktivität in den *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen. Da das Protein in erheblichem Umfang auch in verkürzter Form vorhanden war, fand eventuell eine Konkurrenz der unterschiedlich langen VP1-Moleküle um die in den Versuchen eingesetzte RNA-Matrize statt. Dadurch standen möglicherweise für enzymatisch aktives, vollständig translatiertes VP1 nicht genügend Matrizen für eine nachweisbare RdRp-Reaktion zur Verfügung. Weiterhin ist denkbar, dass das VP1 entweder durch die Fusion mit dem MBP oder durch die Expression in einem prokaryotischen System nicht in seiner für eine RdRp-Aktivität notwendigen Konformation vorlag, also keine enzymatisch aktive Form des VP1 erhalten wurde. Da keine funktionelle Kontrolle für dieses System vorlag, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Reaktionsbedingungen für die RdRp-Aktivität von VP1 nicht optimal waren und dadurch eine Einschränkung oder völlige Verhinderung der Aktivität eintrat. Gegen diese These spricht jedoch, dass in später unter den Bedingungen des B-Puffers erfolgten Untersuchungen eine RdRp-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 nachgewiesen wurde. Vielleicht lag das Scheitern des Nachweises von RdRp-Aktivität mit

bakteriell exprimiertem MBP-VP1 in diesen Versuchen auch darin begründet, dass eventuell eine Oligomerisation mehrerer VP1-Moleküle stattfinden muss, um RdRp-Aktivität zu erhalten. Für die RdRp von Polioviren ( $3D^{Pol}$ ) wurde beschrieben, dass Interaktionen zwischen mehreren RdRp-Molekülen stattfinden, die einen positiven Einfluss auf die Effektivität der Polymerasereaktion hatten [45]. RdRp-Aktivität war bei der  $3D^{Pol}$  der Polioviren jedoch auch ohne Komplexbildung nachweisbar. Damit ist es denkbar, dass die Zusammenlagerung mehrerer VP1-Moleküle auch für die RdRp-Aktivität des VP1 des IBDV von Bedeutung ist. Es besteht also die Möglichkeit, dass die im Reaktionsansatz vorhandenen verkürzten VP1-Fragmente sich zwar mit den vollständigen VP1-Molekülen zusammenlagerten, es aber infolge fehlender Konformationsänderungen nicht zur Bildung der aktiven Zentren kam oder keine ausreichende Zusammenlagerung von VP1-Molekülen stattfinden konnte. In Anbetracht der Tatsache, dass eine Komplexbildung für das VP1 bisher nicht beschrieben wurde und das VP1 nur einen sehr geringen Anteil des reifen Virions darstellt, erscheint die Aggregation mehrerer VP1-Moleküle zu einem funktionellen Komplex jedoch eher unwahrscheinlich. Für das Hepatitis C Virus (HCV), welches wie das Poliovirus ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Orientierung aufweist, ist eine Interaktion zwischen mehreren RdRp-Molekülen aufgrund struktureller Unterschiede zwischen NS5B und der  $3D^{Pol}$  des Poliovirus ebenfalls unwahrscheinlich [45]. Auch beim NS5B des HCV wurde bisher keine Komplexbildung nachgewiesen. Es scheint sich bei der Zusammenlagerung mehrerer RdRp-Moleküle in der Poliovirusreplikation also nicht um ein allgemeines Prinzip der RNA-Virus-Replikation zu handeln. Zur Klärung dieser Sachverhalte müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Nach dem erfolglosen Versuch an bakteriell exprimiertem VP1 RdRp-Aktivität nachzuweisen, wurde eine Expression des VP1 mit Hilfe von Baculoviren in Sf9-Zellen durchgeführt. Es bestand die Hoffnung in diesem viralen Expressionssystem in Insektenzellen ein enzymatisch aktives VP1 zu erhalten, welches für den Nachweis der RdRp-Aktivität des VP1 im *in vitro*-Experiment besser geeignet sein würde als das bakteriell exprimierte MBP-VP1. Die Expression des VP1 mittels rekombinanter Baculoviren wurde in diesem Fall ohne eine Fremdsequenz durchgeführt, um so einen eventuell vorhandenen negativen Einfluss dieser Fremdsequenz auf die RdRp-Aktivität auszuschließen. Die Aufarbeitung der zellulären Sf9-Lysate erfolgte in Anlehnung, an die von Behrens *et al.* [8] publizierten Ergebnisse. Dort wurde erstmals RdRp-Aktivität für das NS5B des HCV nachgewiesen. Nach Expression des VP1 im Baculovirussystem wurden im Western Blot mit VP1-spezifischem Antikörper,

ähnlich wie bei der Expression des MBP-VP1, mehrere Banden beobachtet. Diese waren jedoch weniger zahlreich als nach der Expression des MBP-VP1 in *E. coli*. Da in Lysaten von IBDV-infizierten Hühnerembryozellen nur eine stringente Bande mit dem anti-VP1 Serum sichtbar wurde, blieb unklar, warum sowohl bei der Expression von MBP-VP1 in *E. coli* als auch von VP1 in Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen verkürzte VP1-Moleküle zu beobachten waren. Möglicherweise kommt es während einer IBDV-Infektion zu einer Stabilisierung des translatierten VP1 durch ein anderes, entweder virales oder zelluläres Protein. Mittels Co-Lokalisation in der infizierten Zelle und nach Präzipitationsexperimenten wurde gezeigt, dass das VP3 des IBDV mit dem VP1 interagiert [64] [119] [120]. Gleichzeitig wurde dort aber auch gezeigt, dass ein in eukaryotischen Zellen allein exprimiertes VP1 keinerlei Verkürzungen wie in den hier beschriebenen Experimenten aufwies. Damit kommt auch ein zellulärer Faktor in Betracht, der weder in den zur Expression eingesetzten Bakterien noch in den Insektenzellen vorhanden war. Im Gegensatz zum Expressionsmuster des VP1 zeigte das NS5B des HCV, für dessen Expression und Untersuchung NS5B-kodierendes Baculovirus und anti-NS5B Serum von Herrn PD Dr. Behrens (Universität Giessen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, in Western Blot-Analysen nur eine singuläre Bande. Dieses Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin, dass die Ursache für das Auftreten mehrerer verkürzter VP1-Moleküle in den Expressionsversuchen entweder im VP1 selbst liegt oder das Auftreten einer singulären Bande des VP1 im Zusammenhang mit der Replikation des IBDV stehen kann.

Die Experimente zur Untersuchung einer eventuell vorhandenen RdRp-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1 zeigten, dass in allen Ansätzen ein Reaktionsprodukt im oberen Teil des Gels sichtbar wurde. Experimente zur Bestimmung der optimalen Temperatur für die RdRp-Aktivität des VP1 zeigten jedoch, dass dieses Produkt nur bis zu einer Reaktionstemperatur von 30 °C zu beobachten war. Weiterhin wurde dieses Reaktionsprodukt mit einer ssRNA-spezifischen RNase hydrolysiert und bestand somit aus ssRNA. Wie sich in Versuchen mit *in vitro* markierter cRNA unter Verwendung von unmarkierten Nukleotiden zeigte, war diese ssRNA in den Gelen auf der Höhe der eingesetzten *in vitro* transkribierten cRNA sichtbar. Daher war es wahrscheinlich, dass es sich bei dieser Bande um die *in vitro* transkribierte cRNA handelte. Diese wurde durch eine nicht näher charakterisierte zelluläre Aktivität markiert, bei der es sich um Terminale-Nucleotidyl-Transferase-Aktivität (TNT-Aktivität) handeln könnte. TNT-Aktivität wurde auch für die RdRp des HCV [8] [98] und des Poliovirus [85] nachgewiesen. Daher wäre es denkbar, dass auch das VP1 eine solche

TNT-Aktivität besitzt. Zur Abklärung dieses Sachverhaltes müsste das VP1 gereinigt dargestellt und in entsprechenden Experimenten eingesetzt werden.

Ein zweites Reaktionsprodukt war nur bei Einsatz von VP1- bzw. NS5B-enthaltenden Lysaten nachweisbar. Dieses Produkt wurde nach Exposition eines Films im unteren Teil des Gels sichtbar. Das dort befindliche Reaktionsprodukt bestand aus dsRNA. Dieser Sachverhalt wurde nach Verdau mit einer dsRNA-spezifischen RNase gezeigt. Es könnte sich bei dieser dsRNA um ein Hybridmolekül aus der eingesetzten *in vitro* transkribierten cRNA und einem *de novo* synthetisierten Minusstrang handeln. Dafür spricht die stärkere Intensität dieser dsRNA-Bande, die einen Einbau von mehr radioaktiv markierten Nukleotiden impliziert als bei der im oberen Teil des Gels befindlichen schwächeren ssRNA-Bande. Da sich der T7-Promotor im viralen cDNA-enthaltenden Plasmid unmittelbar stromaufwärts zu der Sequenz von  $\Delta P2A$  befand, wurde bei der Transkription von cDNA zu cRNA mittels T7-RNA-Polymerase eine ssRNA in positiver Orientierung erzeugt. Diese wurde dann in den Versuchen eingesetzt. Damit ist die Neusynthese eines komplementären RNA-Stranges zum eingesetzten *in vitro* transkribierten plussträngigen cRNA-Strang durch die Aktivität von VP1 bzw. NS5B sehr wahrscheinlich. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich beim VP1 des IBDV um die virale RdRp handelt. Da ein Reaktionsprodukt mit einer gleichen elektrophoretischen Mobilität auch nach Einsatz von NS5B-haltigen Zelllysaten gefunden wurde, lässt dies auch einen Analogieschluss zur RdRp-Aktivität des NS5B des HCV zu [8]. Diese Annahme wurde von Beobachtungen bei anderen viralen RdRp unterstützt. So wurde für die Familie der *Flaviviridae* gezeigt, dass *in vitro* ein intramolekulares Priming an der 3'-Hydroxylgruppe der RNA-Matrize stattfand [117]. Danach erfolgte die Transkription eines komplementären Stranges durch NS5B [117] und eine Hairpin-RNA entstand, die aus der in diesen Versuchen eingesetzten cRNA und dem neusynthetisierten Komplementärstrang bestand. Für das Virus der Poliomyelitis und das Virus der Enzephalomyocarditis wurde die Bildung von solchen Hairpin-RNAs bereits in infizierten Zellkulturen nachgewiesen [107] [134]. Es war damit anzunehmen, dass auch das VP1 von IBDV einer vergleichbaren Funktionsweise folgt. In weiteren Untersuchungen unter Nutzung des hier beschriebenen VP1-Bac wurde dieses hier vermutete Modell bestätigt [127]. Da das Produkt der *in vitro*-Aktivität des VP1 damit aus der eingesetzten *in vitro* transkribierten cRNA und dem neusynthetisierten Komplementärstrang besteht, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um ein Zwischenprodukt der IBDV-Replikation. Weitere virale und/oder zelluläre Faktoren müssen an der Replikation der IBDV-RNA beteiligt sein, da das Hairpinmolekül prozessiert werden muss, um für weitere Schritte in der viralen Replikation zur Verfügung zu stehen.

Wie bei der RdRp-Aktivität des VP1 eine spezifische Replikation viraler RNA erreicht werden kann, ist bisher unklar. Das NS5B des HCV ist, wie die hier vorgestellten Versuche und die von Behrens *et al.* [8] publizierten Ergebnisse zeigten, offensichtlich in der Lage auch HCV-fremde RNA-Matrizen als Matrize für die RdRp-Aktivität zu nutzen. Bei den beschriebenen Experimenten wurde ein Transkript genutzt, welches die 3'-nichtkodierende Region des Segments A trug. Damit kann davon ausgegangen werden, dass diese RNA als Matrize genutzt wurde. Ob das VP1 auch RNA transkribieren kann, welche nicht die 3'-nichtkodierende Region des IBDV enthält, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ein weiterer interessanter Befund war, dass in Versuchen mit Zelllysaten, die ein mutiertes VP1 (VP1-D416A) enthielten, kein doppelsträngiges Reaktionsprodukt erhalten wurde. In der kodierenden Region des VP1 war mittels ortsgerichteter Mutagenese ein Nukleotidaustausch durchgeführt worden, der in einem Austausch der Aminosäure 416 von Asparaginsäure (D) zu Alanin (A) im translatierten VP1 resultierte. Diese Aminosäure spielt nach Computeranalysen [36] wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Funktionalität des VP1. Sie stellt vermutlich einen wesentlichen Bestandteil des vorgeschlagenen RdRp-Handflächen Motivs A dar, welches wahrscheinlich an der Bildung einer Bindungsstelle für zwei zweiwertige Metallionen beteiligt ist. Dadurch wäre es für die enzymatische Aktivität des VP1 essentiell [36] [87] [118]. Theoretisch sollte der Austausch D416→A daher zu einer Blockade der RdRp-Aktivität des VP1 führen. Diese Theorie fand erste Unterstützung dadurch, dass bei Transfektionsversuchen mit cRNA von unverändertem Segment A und Segment B mit der Mutation D416A kein vermehrungsfähiges Virus erhalten wurde. Die fehlende RdRp-Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1-D416A und die Ergebnisse der Transfektionsversuche unterstützen somit die von Gorbalenya *et al.* [36] aufgestellte Vermutung, dass das Asp416 eines der wesentlichen Elemente des aktiven Zentrums des VP1 darstellt. Darüber hinaus zeigten diese Ergebnisse, dass das Motiv A der vermuteten aktiven Domäne des VP1 in der Tat sehr wahrscheinlich an dieser Stelle im Molekül des VP1 lokalisiert ist. In weiteren Experimenten mit VP1 in diesem *in vitro*-System kann nun untersucht werden, ob und welche anderen Aminosäuren an dem komplexen Vorgang der Polymerasereaktion des VP1 beteiligt sind. Auch die von Gorbalenya *et al.* [36] postulierte Vermutung, dass das Motiv C der RdRp von IBDV dem Motiv A vorgelagert und darüber hinaus durch eine andere Aminosäuresequenz (ADN anstelle von GDD) charakterisiert sein soll, kann nun mit diesem *in vitro*-System untersucht werden.

Die weiteren hier vorgestellten Experimente befassten sich mit genaueren Charakterisierungen der enzymatischen Aktivität des Baculovirus-exprimierten VP1. Das Temperaturoptimum der VP1-Aktivität lag in den vorliegenden Experimenten bei 37 °C. Dieses Optimum weicht von den Ergebnissen der Untersuchungen von Spies *et al.* 1987 [115] ab. Dort lag das Optimum für eine RdRp-Aktivität bei Nutzung gereinigter viraler Partikel bei 40 °C. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass Spies *et al.* [115] kein *in vitro* exprimiertes VP1, sondern gereinigte Viruspartikel in den Experimenten einsetzten. Ein weiterer Unterschied waren sicherlich auch die dort verwendeten Reaktionsbedingungen, die von denen der hier vorgestellten Untersuchungen abwichen. Die Temperatur von 40 °C entspricht in etwa der Körperkerntemperatur von Hühnern und erscheint damit physiologischer als ein Optimum von 37 °C. Die Temperaturoptima für RdRp-Aktivitäten anderer Viren in den dort verwendeten *in vitro*-Testsystemen lagen unterhalb des Optimums von VP1. So beobachteten Behrens *et al.* in ihren *in vitro*-Untersuchungen ein Temperaturoptimum von 22 °C für das NS5B des HCV [8], während das Optimum für die in Bakterien exprimierte RdRp des Poliovirus, 3D<sup>Pol</sup>, in ähnlichen Untersuchungen bei 30 °C lag [1]. Diese *in vitro*-Temperaturoptima stimmten nicht mit den für die optimale virale Replikation benötigten Bedingungen *in vitro* und *in vivo* überein. Sie sind jedoch für die Optimierung der Reaktionsbedingungen in den *in vitro*-Untersuchungen von Bedeutung.

Die Entstehung eines weiteren Reaktionsprodukts unterhalb des bereits vorher beobachteten dsRNA-Produkts bei Reaktionstemperaturen ab 30 °C kann nicht schlüssig erklärt werden. Das Auftreten dieses Produktes hing von der Anwesenheit des VP1 und Mg-Ionen ab und kann damit als Reaktionsprodukt der RdRp-Aktivität des VP1 betrachtet werden. Eventuell handelte es sich dabei um das Produkt einer abortiven Polymerasereaktion.

Wie bei vielen der bisher untersuchten RdRp (s. z.B. [2] [8] [135]) war auch die Aktivität des VP1 abhängig von der Anwesenheit zweiwertiger Metallionen positiver Ladung. Bei Versuchen ohne Zusatz von MgCl<sub>2</sub> zeigte das VP1 keinerlei RdRp-Aktivität. Dies lässt darauf schließen, dass auch bei der Polymerase des IBDV das Zwei-Metall-Ionen-Konzept Anwendung finden kann, welches bereits für die meisten anderen Polymerasen postuliert wurde [118]. Dieses Konzept geht davon aus, dass in der Handflächenregion des Polymerasemoleküls zwei zweifach positiv geladene Magnesium-Ionen an drei Asparaginsäuremoleküle binden. Das erste Magnesium-Ion soll dabei für die Verfügbarkeit der  $\alpha$ -Phosphatgruppe des Nukelotidtriphosphats (NTP) während der Polymerasereaktion entscheidend sein, indem es die Affinität für das Wasserstoffatom aus der

3'-Hydroxyl-Gruppe des Nukleotidmonophosphats (NMP) herabsetzt und damit das negativ geladene Sauerstoffatom aus der 3'-Hydroxyl-Gruppe des NMP mit der Phosphatgruppe des NTP in Kontakt treten kann [118]. Das zweite Magnesium-Ion dient nach dieser Theorie der Stabilisierung und Entfernung des abgespaltenen Pyrophosphatrestes [118].

In einer Untersuchung von Jablonski *et al.* [47] wurde beobachtet, dass 3D<sup>Pol</sup>, die RdRp des Poliovirus, in *in vitro*-Tests in der Lage war, statt Mg<sup>2+</sup>-Ionen auch Mn<sup>2+</sup>-, Co<sup>2+</sup>-, Cu<sup>2+</sup>-, Fe<sup>2+</sup>-, Ni<sup>2+</sup>-, Zn<sup>2+</sup>-Ionen in der Polymerasereaktion zu nutzen. Eine Mutation des Motivs C von GDD zu GDN in 3D<sup>Pol</sup> führte zu einer veränderten Metallionennutzung [47]. Diese mutierte RdRp war nicht mehr in der Lage Mg<sup>2+</sup>-Ionen zu nutzen. Sie zeigte aber eine Polymeraseaktivität bei Einsatz von Mn<sup>2+</sup>-Ionen und bei Fe<sup>2+</sup>-Ionen aus der Verbindung FeC<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>5</sub> [47]. Auch für das VP1 wurde die Aktivität bei Anwesenheit anderer zweiwertiger Metallionen als Mg<sup>2+</sup>-Ionen getestet. Die Polymeraseaktivität des VP1 konnte nur nach Zugabe von Mn<sup>2+</sup>- oder Co<sup>2+</sup>-Ionen teilweise wieder hergestellt werden. Im Unterschied dazu war bei der 3D<sup>Pol</sup> des Poliovirus die Nutzung von Mn<sup>2+</sup>-Ionen förderlich für die Effizienz der Polymerasereaktion [2]. Die bessere Effizienz der Polymeraseaktivität der 3D<sup>Pol</sup> des Poliovirus bei der Nutzung von Mn<sup>2+</sup>- gegenüber Mg<sup>2+</sup>-Ionen wurde damit erklärt, dass Mn<sup>2+</sup>-Ionen dort fester an die Phosphordiesterkette der Nukleinsäure binden kann. Der Komplex zwischen Polymerase, RNA-Matrize und Metallionen soll dadurch stabiler werden und es finden weniger Reaktionsabbrüche statt [2]. Dieser Mechanismus scheint für das VP1 jedoch keine Rolle zu spielen. Ob auch bei VP1 gleichzeitig mit der Substitution der Mg<sup>2+</sup>-Ionen durch Mn<sup>2+</sup>-Ionen die Affinität für entsprechende Nukleotide sinkt, muss an gereinigtem VP1 untersucht werden.

Abschließend kann anhand der vorliegenden Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem VP1 des IBDV um die RNA-abhängige RNA-Polymerase dieses Virus handelt. Damit konnte die seit langem vermutete Funktion des VP1 [35] erstmals experimentell nachgewiesen werden. Das VP1 weist sehr wahrscheinlich eine ähnliche Funktionsweise auf wie die schon charakterisierten RdRp anderer RNA-Viren. Die Etablierung eines experimentellen Testsystems für die Polymeraseaktivität des VP1 bedeutet einen entscheidenden Fortschritt in der Untersuchung der Replikation der *Birnaviridae*. Es können nun die postulierten funktionellen Domänen des VP1 [35] [36] [109] nach entsprechenden Mutationen der Aminosäuresequenz des VP1 untersucht werden. Dabei können katalytisch aktive Aminosäuren des VP1 und damit die entscheidenden Angriffspunkte zur Beeinflussung der Replikation des IBDV charakterisiert werden.

Weitere Einblicke in die Funktionsweise von RdRp und eventuell eine phylogenetische Verbindung zwischen den RdRp verschiedener RNA-Viren könnten ebenfalls Ergebnis solcher Untersuchungen sein. Die Identifizierung der Motive A, B und C kann außerdem Bedeutung für eine weitere phylogenetische Einordnung der *Birnaviridae* haben.

Des Weiteren eröffnen sich durch diese Untersuchungen eventuell neue Möglichkeiten bei der Prävention von IBDV-Erkrankungen. Impfviren könnten nun mit Hilfe von gezielten Mutationen in der kodierenden Region des VP1 so gestaltet werden, dass die Virusreplikation mit sehr geringen negativen Effekten im Tier stattfindet und trotzdem hohe Antikörpertiter induziert werden.

## 5. Zusammenfassung

Das VP1 des IBDV-Stammes P2 wurde als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein in *E. coli* in ausreichender Quantität bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C exprimiert. Die nachfolgende Analyse des mittels Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteins ergab, dass neben dem vollständigen Fusionsprotein auch C-terminal verkürzte Fusionsproteine vorhanden waren. Mit diesem gereinigten VP1-enthaltenden Fusionsprotein wurde keine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität nachgewiesen.

Anschließend wurde das VP1 des IBDV-Stammes P2 unter Nutzung eines rekombinanten Baculovirus in eukaryoten Sf9-Zellen exprimiert. Dabei wurde ebenfalls eine Expression C-terminal verkürzter VP1-Proteine neben dem vollständigen VP1 beobachtet. Das Baculovirus-exprimierte VP1 zeigte *in vitro* RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität. Damit wurde erstmalig eine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität für das VP1 des IBDV nachgewiesen. Das Reaktionsprodukt der VP1-abhängigen Polymeraseaktivität war eine doppelsträngige RNA, welche an einer IBDV-spezifischen Matrize synthetisiert wurde. Die optimale Reaktionstemperatur für die Polymeraseaktivität war unter den gewählten *in vitro*-Bedingungen 37 °C. Die Anwesenheit von zweiwertigen Metallkationen war notwendig, wobei nach Zusatz von Mg<sup>2+</sup>-Ionen die höchste Effizienz der Polymerasereaktion zu beobachten war. Nach Zusatz anderer zweiwertiger Metallkationen (Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) wurde eine reduzierte Polymeraseaktivität des VP1 beobachtet. Da nach Zusatz von weiteren zweiwertigen Kationen keine Polymeraseaktivität zu beobachten war, besitzt das VP1 wahrscheinlich eine Selektivität bezüglich notwendiger zweiwertiger Ionen. Nach Mutation der Aminosäure Asparagin (D) an Position 416 des VP1 zu Alanin (A) zeigte ein im Baculovirus-System exprimiertes VP1-D416A *in vitro* keine Polymeraseaktivität. Damit besitzt diese Aminosäure eine Bedeutung für die RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität des VP1 und stellt somit in Übereinstimmung mit der Computeranalyse [36] sehr wahrscheinlich einen wesentlichen Bestandteil des Motivs A der katalytischen „Handflächen“-Domäne des VP1 dar. Dieses Ergebnis fand *in vivo* mittels des reversen genetischen Systems für IBDV eine Bestätigung, da nach Substitution der Aminosäure 416 kein infektiöses Virus generiert wurde.

## 6. Summary

VP1 of IBDV-strain P2 was expressed as fusion protein with maltose-binding protein in *E. coli*. Sufficient quantities were obtained at an incubation temperature of 20 °C. The subsequent analysis of the fusion protein, which was purified by affinity chromatography, showed the existence of both full-length and C-terminally truncated fusion proteins. By using this purified VP1-containing fusion protein no RNA-dependent RNA-polymerase activity was observed.

VP1 of IBDV strain P2 was then expressed in eucaryotic SF9 cells using a recombinant baculovirus. An expression of C-terminally truncated VP1 together with full-length VP1 was observed as before. VP1 expressed with recombinant baculovirus possessed *in vitro* RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) activity as shown here for the first time. The reaction product of the VP1-dependent polymerase activity was a double-stranded RNA, which was synthesised at an IBDV-specific template. The temperature optimum for polymerase activity was 37 °C under the chosen *in vitro* conditions. The presence of divalent metal cations was necessary for enzyme activity. The highest efficiency of the polymerase reaction was observed after addition of Mg<sup>2+</sup>-ions. Furthermore, addition of other divalent metal cations (Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) resulted in a reduced polymerase activity. Since no polymerase activity was observed after addition of further divalent cations, VP1 probably possesses a selectivity regarding the necessary divalent cations. A baculovirus expressed VP1 mutant (VP1-D416A) which contained a mutation of amino acid asparagine (D) at position 416 of VP1 to alanine (A) did not show *in vitro* polymerase activity. Therefore this amino acid is important for the RNA-dependent RNA-polymerase activity of VP1 and thus probably represents a vital part of the motif A of the catalytic “palm” domain of RdRp in agreement with the computer analysis [36]. This result was supported *in vivo* by using the reverse genetics system for IBDV, since generation of infectious virus was not observed after substitution of amino acid 416.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Arnold, J. J. and Cameron, C. E. (1999). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) is sufficient for template switching in vitro. *J. Biol. Chem.* 274: 2706-2716.
2. Arnold, J. J., Ghosh, S. K., and Cameron, C. E. (1999). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J. Biol. Chem.* 274: 37060-37069.
3. Azad, A. A., Jagadish, M. N., Brown, M. A., and Hudson, P. J. (1987). Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161: 145-152.
4. Ball, L. A. (2001). Replication Strategies of RNA Viruses. In: *Fundamental Virology*, (Kriple, D. M., ed.), pp. 105-118. Lippincott, Williams & Wilkens, Philadelphia.
5. Bayliss, C. D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R. W., Papageorgiou, A., Müller, H., and Bournsnel, M. E. (1990). A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71: 1303-1312.
6. Becht, H. (1980). Infectious bursal disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 90: 107-121.
7. Becht, H., Müller, H., and Müller, H. K. (1988). Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69: 631-640.
8. Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15: 12-22.

9. Benton, W. S., Cover, J. K., Rosenberger, J. K., and Lake, R. S. (1967). Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis.* 11: 438-445.
10. Birghan, C., Mundt, E., and Gorbalenya, A. E. (2000). A non-canonical Ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* 19: 114-123.
11. Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V., and Crowther, R. A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.* 71: 325-330.
12. Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R. A., and Vakharia, V. N. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75: 11974-11982.
13. Brown, F. (1986). The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology* 25: 141-143.
14. Brown, M. D., Green, P., and Skinner, M. A. (1994). VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J. Gen. Virol.* 75: 675-680.
15. Bumstead, N., Reece, R. L., and Cook, J. K. (1993). Genetic differences in susceptibility of chicken lines to infection with infectious bursal disease virus. *Poult. Sci.* 72: 403-410.
16. Burkhardt, E. and Müller, H. (1987). Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* 94: 297-303.

17. Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., and Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410: 235-240.
18. Calvert, J. G., Nagy, E., Soler, M., and Dobos, P. (1991). Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 2: 2567.
19. Clarke, I. N. and Lambden, P. R. (2000). Organization and expression of calicivirus genes. *J. Infect. Dis.* 181: S309-S316.
20. Cosgrove, A. S. (1962). An apparently new disease of chickens - avian nephrosis. *Avian Dis.* 385-389.
21. Cursiefen, D., Käufer, I., and Becht, H. (1979). Loss of virulence in a small plaque mutant of the infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 59: 39-46.
22. Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. B., and Hardy, M. E. (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* 22: 2852-2859.
23. Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., and Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of all polymerases. *Protein Engineering* 3: 461-467.
24. Delmas, B., Kibenge, F. S. B., Leong, J. C., Mundt, E., Vakharia, V., and Wu, J. L. (2004). Birnaviridae. In: *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV (Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A., eds.), pp. 561-569. Elsevier/Academic Press, London.
25. Di Fabio, J., Rossini, L. I., Eterradossi, N., Toquin, M. D., and Gardin, Y. (1999). European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. *Vet. Rec.* 145: 203-204.

26. Dobos, P. (1995). The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus. *Annual review of fish diseases* 5: 25-54.
27. Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H., and Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32: 593-605.
28. Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. A., and Dobos, P. (1991). Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* 181: 541-552.
29. Eterradossi, N., Arnauld, C., Tekaia, D., Toquin, D., Le Coq, H., Rivallan, G., Guittet, M., Domenech, J., van den Berg, T. P., and Skinner, M. A. (1999). Antigenic and genetic relationship between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West african isolate. *Avian Pathol.* 28: 36-46.
30. Eterradossi, N., Arnauld, C., Toquin, D., and Rivallan, G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.* 143: 1627-1636.
31. Fahey, K. J., Erny, K., and Crooks, J. (1989). A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J. Gen. Virol.* 70: 1473-1481.
32. Fahey, K. J., McWaters, P., Brown, M. A., Erny, K., Murphy, V. J., and Hewish, D. R. (1991). Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis.* 35: 365-373.
33. Faragher, J. T., Allan, W. H., and Wyeth, C. J. (1974). Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Vet. Rec.* 95: 385-388.

34. Giambrone, J. J., Eidson, C. S., Page, R. K., Fletcher, O. J., Barger, B. O., and Kleven, S. H. (1976). Effect of infectious bursal agent on the response of chickens to Newcastle disease and Marek's disease vaccination. *Avian Dis.* 20: 534-544.
35. Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V. (1988). Birnavirus RNA polymerase is related to polymerases of positive strand RNA viruses. *Nucleic Acids Res.* 16: 7735.
36. Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddani, J.-L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. J., and Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J. Mol. Biol.* 324: 47-62.
37. Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Köllner, B., and Mundt, E. (1997). A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J. Virol.* 71: 8879-8885.
38. Hansen, J. L., Long, A. M., and Schultz, S. C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of polio virus. *Structure* 5: 1109-1122.
39. Harkness, J. W., Alexander, D. J., Pattison, M., and Scott, A. C. (1975). Infectious bursal disease agent: morphology by negative stain electron microscopy. *Arch. Virol.* 48: 63-73.
40. Hassan, M. K., al Natour, M. Q., Ward, L. A., and Saif, Y. M. (1996). Pathogenicity, attenuation, and immunogenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 40: 567-571.
41. Hassan, M. K. and Saif, Y. M. (1996). Influence of the host system on the pathogenicity, immunogenicity, and antigenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 40: 553-561.
42. Heine, H. G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K., and Azad, A. (1991). Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of

- infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J. Gen. Virol.* 72: 1835-1843.
43. Henry, C. W., Brewer, R. N., Edgar, S. A., and Gray, B. W. (1980). Studies on infectious bursal disease in chickens. 2. Scoring microscopic lesions in the bursa of fabricius, thymus, spleen, and kidney in gnotobiotic and battery reared White Leghorns experimentally infected with infectious bursal disease virus. *Poult. Sci.* 59: 1006-1017.
  44. Hitchner, S. B. (1979). Persistence of parental infectious bursal disease antibody and its effects on susceptibility of young chicken. *Avian Dis.* 16: 900.
  45. Hobson, S. D., Rosenblum, E. S., Richards, O. C., Richmond, K., Kirkegaard, K., and Schultz, S. C. (2001). Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J.* 20: 1153-1163.
  46. Ismail, N. M., Saif, Y. M., and Moorhead, P. D. (1988). Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis.* 32: 757-759.
  47. Jablonski, S. A. and Morrow, C. D. (1995). Mutation of the Aspartic Acid Residues of the GDD Sequence Motif of Poliovirus RNA-Dependent RNA Polymerase Results in Enzymes with Altered Metal Ion Requirements for Activity. *J. Virol.* 69: 1532-1539.
  48. Jackwood, D. H., Saif, Y. M., and Hughes, J. H. (1987). Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. *Avian Dis.* 31: 370-375.
  49. Jackwood, D. J., Jackwood, R. J., and Sommer, S. E. (1997). Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant infectious bursal disease viruses. *Virus Res.* 49: 131-137.
  50. Jackwood, D. J., Saif, Y. M., and Hughes, J. H. (1982). Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Dis.* 26: 871-882.

51. Jackwood, D. J., Saif, Y. M., and Hughes, J. H. (1984). Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. *Avian Dis.* 28: 990-1006.
52. Käufer, I. and Weiss, E. (1980). Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect. Immun.* 27: 364-367.
53. Kibenge, F. S. and Dhama, V. (1997). Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch. Virol.* 142: 1227-1236.
54. Kibenge, F. S., Dhillon, A. S., and Russell, R. G. (1988). Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69: 1757-1775.
55. Kibenge, F. S. and Qian, B. (1994). Sequence conservation in the RNA polymerase gene of infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.* 134: 441-449.
56. Kibenge, F. S., Qian, B., Cleghorn, J. R., and Martin, C. K. (1997). Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch. Virol.* 142: 2401-2419.
57. Kochan, G., Gonzales, D., and Rodriguez, J. F. (2003). Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Arch. Virol.* 148: 723-744.
58. Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A., and Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256: 1790.
59. Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Zakour, R. A. (1987). Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis without Phenotypic Selection. *Methods in Enzymology* 154: 382.
60. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 685.

61. Lange, H., Müller, H., Kaufer, I., and Becht, H. (1987). Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro. *Arch. Virol.* 92: 187-196.
62. Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C., and Delmas, B. (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J. Gen. Virol.* 81: 983-992.
63. Ley, D. H., Storm, N., Bickford, A. A., and Yamamoto, R. (1979). An infectious bursal disease virus outbreak in 14- and 15-week-old chickens. *Avian Dis.* 23: 235-240.
64. Lombardo, E., Maraver, A., Castañón JR, Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L., and Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73: 6973-6983.
65. Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A., and Rodríguez, J. F. (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 277: 345-357.
66. Lukert, P. D. and Davis, R. B. (1974). Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis.* 18: 243-250.
67. Macreadie, I. G. and Azad, A. A. (1993). Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein in bacteria and yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30: 1169-1178.
68. Magyar, G., Chung, H. K., and Dobos, P. (1998). Conversion of VP1 to VPg in Cells Infected by Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology* 245: 142-150.

69. Mahardika, G. N. and Becht, H. (1995). Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* 140: 765-774.
70. Maraver, A., Clemente, R., Rodriguez, J. F., and Lombardo, E. (2003). Identification and Molecular Characterization of the RNA Polymerase-Binding Motif of Infectious Bursal Disease Virus Inner Capsid Protein VP3. *J. Virol.* 77: 2459-2468.
71. McFerran, J. B. (1993). Infectious bursal disease. In: *Virus infections of Birds*, (McFerran, J. B. and McNulty, M. S., eds.), pp. 213-228. Elsevier Science, Amsterdam.
72. McFerran, J. B., McNulty, M. S., McKillop, E. R., Connor, T. J., McCracken, R. M., Collins, D. S., and Allan, G. M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* 9: 395-404.
73. Morozov, S. Yu. (1989). A possible relationship of reovirus putative RNA polymerase to polymerases of positive-strand RNA viruses. *Nucleic Acids Res.* 17: 5394.
74. Müller, H. (1986). Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells. *Arch. Virol.* 87: 191-203.
75. Müller, H. and Becht, H. (1982). Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J. Virol.* 44: 384-392.
76. Müller, H. and Nitschke, R. (1987). The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* 159: 174-177.
77. Müller, H., Scholtissek, C., and Becht, H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J. Virol.* 31: 584-589.

78. Mundt, E. (1994). Bestimmung der nichttranslatierten Bereiche im Genom des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV). *Dissertation Justus-Liebig-Universität Giessen*.
79. Mundt, E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.* 80: 2067-2076.
80. Mundt, E., Beyer, J., and Müller, H. (1995). Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 2): 437-443.
81. Mundt, E., Köllner, B., and Kretzschmar, D. (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 71: 5647-5651.
82. Mundt, E. and Müller, H. (1995). Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology* 209: 10-18.
83. Mundt, E. and Vakharia, V. N. (1996). Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 11131-11136.
84. Nakamura, T., Otaki, Y., and Nunoya, T. (1992). Immunosuppressive effect of a highly virulent infectious bursal disease virus isolated in Japan. *Avian Dis.* 36: 891-896.
85. Neufeld, K. L., Galarza, J. M., Richards, O. C., Summers, D. F., and Ehrenfeld, E. (1994). Identification of terminal adenylyl transferase activity of the poliovirus polymerase 3Dpol. *J Virol* 68: 5811-5818.
86. Nick, H., Cursiefen, D., and Becht, H. (1976). Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 18: 227-234.

87. O'Reilly, E. K. and Kao, C. C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252: 287-303.
88. Okoye, J. O. and Uzoukwu, M. (1981). An outbreak of infectious bursal disease among chickens between 16 and 20 weeks old. *Avian Dis.* 25: 1034-1038.
89. Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., and Steitz, T. A. (1985). Structure of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dNTP. *Nature* 313: 762-766.
90. Öppling, V., Müller, H., and Becht, H. (1991). Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 119: 211-223.
91. Özel, M. and Gelderblom, H. (1985). Capsid symmetry of viruses of the proposed Birnavirus group. *Arch. Virol.* 84: 149-161.
92. Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., and Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393: 280-284.
93. Petek, M., D'Aprile, N., and Cancellotti, F. (1973). Biological and physico-chemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Avian Pathol.* 2: 135-152.
94. Petit, S., Lejal, N., Huet, J. C., and Delmas, B. (2000). Active Residues and Viral Substrate Cleavage Sites of the Protease of the Birnavirus Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Virol.* 74: 2057-2066.
95. Phillips, R. A. and Opitz, H. M. (1995). Pathogenicity and persistence of Salmonella enteritidis and egg contamination in normal and infectious bursal disease virus-infected leghorn chicks. *Avian Dis.* 39: 778-787.

96. Pitcovski, J., Levi, B. Z., Maray, T., Di Castro, D., Safadi, A., Krispel, S., Azriel, A., Gutter, B., and Michael, A. (1999). Failure of viral protein 3 of infectious bursal disease virus produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems to protect chickens against the disease. *Avian Dis.* 43: 8-15.
97. Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., and Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8: 3867-3874.
98. Ranjith-Kumar, C. T., Gajewski, J., Gutshall, L., Maley, D., Sarisky, R. T., and Kao, C. C. (2001). Terminal nucleotidyl transferase activity of recombinant Flaviviridae RNA-dependent RNA polymerases: implication for viral RNA synthesis. *J Virol* 75: 8615-8623.
99. Rodriguez-Chavez, I. R., Rosenberger, J. K., Cloud, S. S., and Pope, C. R. (2002). Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture). III. Pathogenicity. *Avian Pathol.* 31: 485-492.
100. Rosenberger, J. K. and Cloud, S. S. (1986). Isolation and characterisation of variant infectious bursal disease viruses. *Abstracts 123rd American Veterinary Medical Association (AVMA) Meeting, 20-24 July, Atlanta, Georgia* AVMA, Schaumburg, Illinois: 104.
101. Rosenberger, J. K., Fries, P. A., Cloud, S. S., and Wilson, R. A. (1985). In vitro and in vivo characterization of avian Escherichia coli. II. Factors associated with pathogenicity. *Avian Dis.* 29: 1094-1107.
102. Saif, Y. M. (1991). Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30: 45-50.
103. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

104. Sawicki, S. G. and Sawicki, D. L. (1990). Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* 64: 1050-1056.
105. Schnitzler, D., Bernstein, F., Müller, H., and Becht, H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 74: 1563-1571.
106. Schobries, H. D., Wilke, I., and Schmidt, U. (1977). Infektiöse Bursitis (Gumboro disease) in einem Broilerbestand. *Mh. Vet. Med.* 32: 700-704.
107. Senkevich, T. G., Cumakov, I. M., Lipskaya, G. Y., and Agol, V. I. (1980). Palindrome-like dimers of double-stranded RNA of encephalomyocarditis virus. *Virology* 102: 339-348.
108. Sharma, J. M., Dohms, J., Walser, M., and Snyder, D. B. (1993). Presence of lesions without virus replication in the thymus of chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 37: 741-748.
109. Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V., and Duncan, R. (2002). Birnavirus VP1 Proteins Form a Distinct Subgroup of RNA-Dependent RNA Polymerases Lacking a GDD Motif. *Virology* 296: 241-250.
110. Skeeles, J. K., Slavik, M., Beasley, J. N., Brown, A. H., Meinecke, C. F., Maruca, S., and Welch, S. (1980). An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1458-1461.
111. Snyder, D. B., Lana, D. P., Cho, B. R., and Marquardt, W. W. (1988). Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis.* 32: 527-534.

112. Snyder, D. B., Vakharia, V. N., and Savage, P. K. (1992). Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch. Virol.* 127: 89-101.
113. Sousa, R., Chung, Y. J., Rose, J. P., and Wang, B. C. (1993). Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature* 364: 593-599.
114. Spies, U. and Müller, H. (1990). Demonstration of enzyme activities required for capsid structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J. Gen. Virol.* 71: 977-981.
115. Spies, U., Müller, H., and Becht, H. (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res.* 8: 127-140.
116. Spies, U., Müller, H., and Becht, H. (1989). Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic Acids Res.* 17: 7982.
117. Steffens, S., Thiel, H. J., and Behrens, S. E. (1999). The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J. Gen. Virol.* 80: 2583-2590.
118. Steitz, T. A. (1998). A mechanism for all polymerases. *Nature* 391: 231-232.
119. Tacken, M. G., Peeters, B. P., Thomas, A. A., Rottier, P. J., and Boot, H. J. (2002). Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.* 76: 11301-11311.
120. Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L., and Peeters, B. P. (2000). Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J. Gen. Virol.* 81: 209-218.

121. Tanimura, N. and Sharma, J. M. (1997). Appearance of T cells in the bursa of Fabricius and cecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens. *Avian Dis.* 41: 638-645.
122. Tanimura, N., Tsukamoto, K., Nakamura, K., Narita, M., and Maeda, M. (1995). Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis.* 39: 9-20.
123. van den Berg, T. P. and Meulemans, G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol.* 20: 409-421.
124. Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., and McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 4: 213-217.
125. Vindevogel, H., Gouffaux, M., Meulemans, G., Duchatel, J. P., and Halen, P. (1976). Maladie de Gumboro: distribution et persistance du virus chez le poussin inoculé. Etudes sur la transmission de la maladie. *Avian Pathol.* 5: 31-38.
126. Vindevogel, H., Gouffaux, M., Meulemans, G., Halen, P., and Schyns, P. (1974). Maladie de Gumboro. II: Inoculation expérimentale: étude clinique et anatomopathologique. *Ann. Med. vet* 118: 375-386.
127. von Einem, U. I., Gorbalenya, A. E., Schirrmeier, H., Behrens, S. E., Letzel, T., and Mundt, E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* 85: 2221-2229.
128. Wang, J., Sattar, A. K., Wang, C. C., Karam, J. D., Konigsberg, W. H., and Steitz, T. A. (1997). Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* 89: 1087-1099.

129. Wimmer, E., Hellen, C. U., and Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet.* 27: 353-436.
130. Yamaguchi, T., Ogawa, M., Inoshima, Y., Miyoshi, M., Fukushi, H., and Hirai, K. (1996). Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 223: 219-223.
131. Yao, K., Goodwin, M. A., and Vakharia, V. N. (1998). Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J. Virol.* 72: 2647-2654.
132. Yao, K. and Vakharia, V. N. (1998). Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 72: 8913-8920.
133. Yehuda, H., Pitcovski, J., Michael, A., Gutter, B., and Goldway, M. (1999). Viral protein 1 sequence analysis of three infectious bursal disease virus strains: a very virulent virus, its attenuated form, and an attenuated vaccine. *Avian Dis.* 43: 55-64.
134. Young, D. C., Tuschall, D. M., and Flanagan, J. B. (1985). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase and host cell protein synthesize product RNA twice the size of poliovirion RNA in vitro. *J. Virol.* 54: 256-264.
135. Zhong, W., Ferrari, E., Lesburg, C. A., Maag, D., Ghosh, S. K., Cameron, C. E., Lau, J. Y., and Hong, Z. (2000). Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* 74: 9134-9143.

## 8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	destilliertes Wasser
Bac-NS5B	Baculovirus-exprimiertes NS5B
Bac-VP1	Baculovirus-exprimiertes VP1
Bac-VP1-D416A	Baculovirus-exprimiertes VP1-D416A
BF	Bursa fabricii
bp	Basenpaar(e)
CAPS	Cyclohexylaminopropanulfonsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
CCLV	Collection of Cell-Lines for Veterinary Medicine (Zellbank BFAV Insel Riems)
DdDp	DNA-abhängige DNA-Polymerase
DdRp	DNA-abhängige RNA-Polymerase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig (double-stranded)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunden
HEZ	embryonale Hühnerzellen
IBD	Infektiöse Bursitis des Hühnergeflügels (infectious bursal disease)
IBDV	Virus der infektiösen Bursitis des Hühnergeflügels (infectious bursal disease virus)
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IPNV	Virus der infektiösen Pankreasnekrose der Salmoniden (infectious pancreatic necrosis virus)

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
MBP	Maltose-bindendes Protein
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
NKR	nichtkodierende Region
NS5B-Bac	NS5B-exprimierendes Baculovirus
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
POD	Meerrettichperoxidase
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDW	steriles destilliertes Wasser
s	Sekunde
ss	einzelsträngig (single-stranded)
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (enzymatische Einheiten)
VP	Virusprotein
VP1-Bac	VP1-exprimierendes Baculovirus
VP1-D416A-Bac	VP1-D416A-exprimierendes Baculovirus
VPg	virus protein genome associated
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## **Danksagung**

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel danke ich herzlichst für die Bereitschaft, diese Dissertation vor der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Giessen als erster Betreuer zu vertreten. Des Weiteren möchte ich mich für sämtliche Anregungen und Hilfestellungen seinerseits bei der Anfertigung dieser Arbeit und für seine Geduld bedanken.

Weiterhin gilt mein herzlichster Dank Herrn PD Dr. Egbert Mundt für die Bereitstellung des Themas und seine Bereitschaft als zweiter Betreuer zu fungieren. Ohne seine Geduld, Unterstützung, Rat und ständige Diskussionsbereitschaft im Labor und bei der Schreibarbeit wäre diese Arbeit sicher nicht zu Stande gekommen.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas C. Mettenleiter möchte ich mich für die zahlreichen und wertvollen Diskussionen und Anregungen im Verlauf der Arbeit bedanken und außerdem für die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Molekularbiologie, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit am Standort Insel Riems durchführen zu können.

Herrn PD Dr. Sven Erik Behrens gilt mein Dank für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung der Arbeit durch das von Ihm zur Verfügung gestellte NS5B-exprimierende Baculovirus und das anti-NS5B Serum zur Western-Blot Analyse der NS5B-Expression.

Herrn Prof. Dr. Alexander E. Gorbalenya möchte ich für die exzellente Unterstützung bei der Identifizierung der enzymatisch aktiven Domänen des VP1 danken.

Frau Iris Zeyda danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der Arbeit im Labor.

Frau Dietlind Kretzschmar und Frau Angela Hillner möchte ich für die hervorragende technische Unterstützung im Labor danken.

Herrn Dr. Axel Karger danke ich für konstruktiven Rat in allen Fragen der Proteinbiochemie.

Frau Babara Riebe gilt mein Dank für ihre unermüdliche Hilfe beim Beschaffen der benötigten Literatur.

Ich möchte weiterhin allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Friedrich-Loeffler-Institute am Standort Insel Riems meinen Dank aussprechen. Sie alle haben durch das gute Arbeitsklima und ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Eva Theobald danke ich für Rat und Tat in Sachen Rechtschreibung und Grammatik.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere Jens und meinen Eltern, für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.