

**„Oligomerisierungszustände und RNA-
Bindungseigenschaften des Matrix Protein der Bornaschen
Krankheit und ihr Einfluss auf die virale Infektiösität“**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Herrn Philipp Stephan Gunnar Dautel

geb. am: 26.12.1982 in: Stuttgart-Bad Canstatt

Gutachter/in:

1. Prof. Milton T. Stubbs, Universität Halle
2. Prof. Sven-Erik Behrens, Universität Talle
3. Prof. Martin Schwemmler, Universität Freiburg

Tag der Verteidigung: Halle, den 30.04.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Abkürzungsverzeichnis.....	vi
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis.....	xiii
Formelverzeichnis	xiv
1	Einleitung1
1.1	Die Bornasche Krankheit1
1.2	Das Virus der Bornaschen Krankheit und seine Genomorganisation.....3
1.3	Die Replikation des Virus der Bornaschen Krankheit.....5
1.4	Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit.....8
1.4.1	RNA-Bindungseigenschaften von BDVM9
1.4.2	Die Proteinstruktur von BDVM10
1.4.2.1	Übersicht der Proteinstruktur von BDVM 10
1.4.2.2	Strukturvergleich mit anderen viralen Matrixproteinen 12
1.4.2.3	RNA-Bindungsstelle von BDVM..... 13
1.4.2.4	Vergleich der RNA-Bindungseigenschaften mit anderen viralen Matrixproteinen..... 16
1.5	Ziel der Arbeit.....18
2	Materialien.....19
2.1	Chemikalien19
2.2	Medien, Lösungen und Puffer21
2.2.1	Medien und Zusätze für die Bakterienkultur21
2.2.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur22
2.2.3	Lösungen22
2.2.4	Puffer23
2.3	Kits25
2.4	Säulen.....26
2.5	Enzyme26
2.5.1	Restriktionsenzyme26
2.5.2	Sonstige Enzyme27

2.6	Antikörper.....	27
2.6.1	Erstantikörper.....	27
2.6.2	Zweitantikörper.....	27
2.7	Lipide	27
2.8	Radioaktiv markierte Nukleotide.....	27
2.9	Oligonukleotide	28
2.9.1	Mutageneseprimer	28
2.9.2	Sequenzierprimer.....	28
2.9.3	RNA-Größenstandard	29
2.10	Vektoren.....	29
2.11	Bakterienzellen.....	29
2.12	Eukaryotische Zellen.....	30
2.13	Viren.....	30
2.14	Geräte	30
2.14.1	Geräte für die Zellkultur.....	31
3	Methoden	32
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	32
3.1.1	Herstellung der Expressionsplasmide.....	32
3.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in chemokompetente Bakterien.....	34
3.1.3	Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente Bakterien.....	35
3.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	35
3.1.5	DNA-Sequenzierung	35
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.2.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
3.2.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
3.2.3	Proteinexpression	36
3.2.4	Zellaufschluss	38
3.3	Biochemische Methoden.....	39
3.3.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
3.3.2	Blue Native PAGE.....	39
3.3.3	Analytische Ultrazentrifugation von Proteinen.....	40
3.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	41

3.3.4.1	nach Bradford.....	41
3.3.4.2	an Hand der ultravioletten Absorption von aromatischen Aminosäuren.....	41
3.3.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	43
3.4	Reinigung exprimierter BDVM-Varianten	44
3.4.1	Affinitätschromatographie	44
3.4.2	Spaltung des Fusionsproteins mittels Faktor Xa	44
3.4.3	Pufferaustausch mittels HiTrap-Desalting-Säulen.....	45
3.4.4	Kationenaustausch-Chromatographie.....	45
3.4.5	Größenausschluss-Chromatographie	45
3.5	Untersuchung der Protein-Lipid-Interaktion an Lipidmonoschichten.....	46
3.6	Nukleinsäureisolierung.....	47
3.6.1	Enzymatische Proteolyse.....	47
3.6.2	Nukleinsäureextraktion.....	47
3.6.3	Nukleinsäurefällung.....	48
3.6.4	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäurepräparationen mittels UV/VIS.....	48
3.6.5	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	48
3.6.5.1	5'-Dephosphorylierung der Nukleinsäure-Isolate	49
3.6.5.2	5'-Markierung der Nukleinsäure-Isolate durch die Polynukleotidkinase	49
3.6.5.3	RNase T ₁ -Verdau.....	50
3.6.6	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
3.6.7	Klonierung der extrahierten kleinen RNAs	51
3.7	Zellkultur	51
3.7.1	Zellkultivierung	51
3.7.2	Immunofluoreszenzassay	52
3.7.3	Virustiter-Bestimmung.....	52
3.7.4	Infektion von Oligoglioblastoma-Zellen mit rekombinanten Viren zur Bestimmung der Wachstumskinetik.....	53
3.7.5	Westernblot.....	54

3.7.6	Isolierung von viraler RNA mittels Trizol aus eukaryotischen Zellen	55
3.7.7	Northernblot	55
3.8	Biophysikalische Methoden.....	57
3.8.1	Kristallisation	57
3.8.2	Datensammlung und Strukturlösung	58
4	Ergebnisse	60
4.1	Chromatographische Reinigung aller BDVM-Varianten	60
4.2	Kristallisation aller BDVM-Varianten	61
4.3	Datensammlung und Strukturaufklärung.....	63
4.4	Röntgenkristallstrukturen der BDVM-Varianten.....	66
4.4.1	BDVM F37A	66
4.4.2	BDVM H112W	69
4.4.2.1	BDVM H112W Kristallform P ₆ ₃	69
4.4.2.2	BDVM H112W Kristallform R3	73
4.4.3	BDVM R53A.....	78
4.4.4	BDVM R34/53A.....	79
4.4.5	BDVM H112W R34/53A.....	82
4.4.6	BDVM H112W R34/53A D95N.....	84
4.4.7	Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes verschiedener BDVM-Varianten....	85
4.4.8	Blue Native PAGE zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes der BDVM-Varianten.....	87
4.4.9	Analytische Ultrazentrifugation zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts.....	88
4.5	Membranbindungseigenschaften von BDVM und seinen Varianten.....	90
4.6	Extraktion und Analyse der von BDVM gebundenen Nukleinsäuren	92
4.6.1	Untersuchung von gereinigtem Protein auf gebundene Nukleinsäuren	92
4.6.2	Extraktion der an BDVM gebundenen RNA nach Reinigung des Proteins	94
4.6.3	5'-Dephosphorylierung der Nukleinsäureproben	96

4.6.4	5'-radioaktive Markierung der Nukleinsäureproben durch PNK und anschließender Verdau mit RNase T ₁	97
4.6.5	Klonierung und Sequenzierung der extrahierten RNAs.....	98
4.7	Untersuchung der BDVM-Varianten im zellulären Umfeld	100
4.7.1	Northern-Blot.....	100
4.7.2	Western-Blot aller BDVM-Varianten.....	103
4.7.3	Bestimmung des Virustiters zur Erstellung einer Wachstumskinetik	104
4.7.4	Wachstumskinetik der rBDV in Oligoglioblastoma-Zellen	105
5	Diskussion.....	108
5.1	Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen BDVM-Varianten	108
5.1.1	Vergleich der Grundstruktur aller BDVM-Varianten.....	108
5.1.2	Bedeutung des Loop30	109
5.1.3	Bedeutung des Loop50	111
5.1.4	Neue RNA-Bindungsstellen innerhalb von BDVM.....	112
5.1.5	Oligomerisierungszustände der verschiedenen BDVM- Varianten.....	114
5.2	Oberflächenaktivität der verschiedenen BDVM-Varianten	119
5.3	RNA-Bindungseigenschaften der verschiedenen BDVM- Varianten.....	121
5.4	Einfluss von Oligomerisierung und RNA-Bindung auf das Wachstum der rBDV	125
6	Zusammenfassung.....	134
7	Referenzen.....	xv
8	Eigenständigkeitserklärung	xxv
9	Lebenslauf.....	xxvi
10	Danksagung.....	xxix

Abkürzungsverzeichnis

Auf die Auflistung deutscher Termini wird verzichtet, wenn sie dem gängigen Sprachgebrauch entsprechen. Physikalische und chemische Symbole werden ohne weitere Erläuterung verwendet. Im Fall von Aminosäuren wird der gängige Dreibuchstabencode verwendet.

3GP	Guanosyl-3'-Monophosphat
5GP	Guanosyl-5'-Monophosphat
ad.	addieren, auffüllen auf
A	Ampere
Å	Angström
ABV	aviäres Bornavirus
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
BD	Bornasche Krankheit (<i>Borna disease</i>)
BDV	Virus der Bornaschen Krankheit (<i>Borna disease virus</i>)
BDVG	Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit
BDVL	RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus der Bornaschen Krankheit
BDVM	Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit
BDVN	Nukleoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit
BDVP	Phosphoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit
BDVX	X-Protein des Virus der Bornaschen Krankheit
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C5P	Cytosin-5'-Monophosphat
CD8 ⁺	Unterscheidungsgruppe 8 ⁺
CIP	Alkalische Phosphatase
Da	Dalton

DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBLN	endogene Borna-ähnliche N-Elemente
EMEM	Eagle's Modified Essential Medium
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FKS	Fötale Kälberserum
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen
IFA	Immunofluoreszenzanalyse
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LINE	lange eingefügte nukleäre Elemente
LB	Luria-Bertani-Medium
MBP	Maltose-Bindungsprotein
mA	Milliampere
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansäure
mRNA	Boten-RNA
μM	Mikromolar
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	Kernlokalisierungssignal
nns	nicht-segmentiert negativstrang
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDB	Proteindatenbank (<i>protein data base</i>)
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PNK	Polynukleotidkinase
rBDV	rekombinant hergestelltes BDV
rmsd	mittlere quadratische Abweichung
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RSV	humanes respiratorisches Synzytial Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC-Medium	<i>super optimale broth</i> -Medium mit Glucose
SSC	Salines Natriumcitrat
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TAE	Tris-Acetat EDTA Elektrophorese Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxy-Ethanol
U5P	Uridin-5'-Monophosphat
UZ	analytische Ultrazentrifugation
VLP	Virus-ähnliche Partikel
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
<i>wt</i>	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammbaum der Ordnung der <i>Mononegavirales</i>	4
Abbildung 2: Genomorganisation von BDV.	5
Abbildung 3: Lebenszyklus von BDV in einer Wirtszelle.....	7
Abbildung 4: Harnstoff-Gel einer 5'-markierten RNA-Probe, die an BDVM gebunden war.....	9
Abbildung 5: Darstellung der Proteinstruktur von BDVM.....	11
Abbildung 6: Tetramere Anordnung von BDVM, basierend auf dessen Kristallstruktur.....	11
Abbildung 7: Struktur-basierter Sequenzvergleich zwischen BDVM und seinen nächsten strukturellen Verwandten, der C-terminalen Domäne von VP40 (a) und c)) und der N-terminalen Domäne von RSVM (b) und d)).	13
Abbildung 8: RNA-Bindungstasche von BDVM und Protein-RNA-Interaktionen.....	14
Abbildung 9: Position der RNA-Bindungsstelle in BDVM und der theoretische Verlauf der gebundenen ssRNA.....	15
Abbildung 10: Oktamerzustand der N-terminalen Domäne von VP40 und RNA-Bindung zwischen zwei N-terminalen Domänen von VP40-Monomeren.....	17
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pMal-c2x für die Expression des MBP-BDVM-Fusionsproteins.....	33
Abbildung 12: Testexpression von BDVM <i>wt</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Zellen.....	37
Abbildung 13: Darstellung der chromatographischen Reinigung von BDVM mittels SDS-PAGE.....	61
Abbildung 14: Kristalle der verschiedenen BDVM-Varianten.....	63
Abbildung 15: Übersicht der Struktur von BDVM F37A.	66
Abbildung 16: Tetramer von BDVM F37A.....	67
Abbildung 17: Darstellung der 2fofc-Elektronendichte (σ -Level = 1) für BDVM F37A und seinem Liganden C5P.....	68
Abbildung 18: Elektronendichte des gebundenen Liganden C5P an BDVM F37A.....	68
Abbildung 19: Tetramer von BDVM H112W in der Kristallform P6 ₃	69
Abbildung 20: Unterschiede zwischen den Monomeren A, B, C und D innerhalb des Tetramers von BDVM H112W P6 ₃	70

Abbildung 21: Aufbau des Dodekamers von BDVM H112W in der Raumgruppe P ₆ ₃ in der Seitenansicht.	71
Abbildung 22: Interaktionen zwischen a) Arg34 und b) Arg53 mit einem benachbarten Tetramer innerhalb des Dodekamers.	71
Abbildung 23: Konformationelle Änderung des Loop30 in BDVM P ₆ ₃ durch die Einführung eines Tryptophans an Position 112.	72
Abbildung 24: Dodekamer von BDVM H112W R3 a) allein und b) in Überlagerung mit dem Dodekamer von BDVM H112W P ₆ ₃	73
Abbildung 25: Unterschiede zwischen den Monomeren A, B, C und D innerhalb des Tetramers von BDVM H112W R3.	74
Abbildung 26: Beispielhafte Interaktionen zwischen zwei Tetrameren, vermittelt durch Arg34 und Arg53.	74
Abbildung 27: Konformationelle Änderung des Loop30 in BDVM H112W R3 durch die Einführung eines Trp an Position 112.	75
Abbildung 28: RNA-Bindungsstellen in BDVM H112W R3.	76
Abbildung 29: Interaktionen zwischen den beiden gebundenen 3GPs und BDVM H112W.	77
Abbildung 30: Kristallstruktur von BDVM R53A.	78
Abbildung 31: Bindungsstelle von C5P an BDVM R53A.	79
Abbildung 32: Monomer von BDVM R34/53A in zwei unterschiedlichen Orientierungen.	80
Abbildung 33: Tetramer von BDVM R34/53A.	80
Abbildung 34: Bindungsstelle von C5P an BDVM R34/53A.	81
Abbildung 35: Interaktion zwischen 5GP und BDVM R34/53A.	82
Abbildung 36: Monomer von BDVM H112W R34/53A, dargestellt in zwei Orientierungen.	83
Abbildung 37: Ansicht der Region der RNA-Bindungsstelle von BDVM <i>wt</i> in BDVM H112W R34/53A.	83
Abbildung 38: Darstellung von BDVM H112W R34/53A D95N in zwei Orientierungen.	84
Abbildung 39: Potentielle RNA-Bindungsstelle in BDVM H112W R34/53A D95N.	85
Abbildung 40: Analyse der Oligomerisierungszustände verschiedener BDVM-Varianten durch Größenausschlusschromatographie.	86

Abbildung 41: Blue Native PAGE verschiedener BDVM-Varianten.	88
Abbildung 42: Datenpunkte der analytischen Ultrazentrifugationsläufe von a) BDVM H112W R34/53A, b) BDVM H112W R34/53A D95N, c) BDVM H112W und d) BDVM R34/53A.	89
Abbildung 43: Messung der Oberflächenspannung nach Injektion von Protein in die Subphase.....	91
Abbildung 44: Normierte Spektren verschiedener BDVM-Varianten im Wellenlängenbereich von 240 bis 320 nm.....	93
Abbildung 45: Spektrum der isolierten Nukleinsäure aus BDVM <i>wt</i> und der Negativkontrolle im Bereich von 240 bis 320 nm.....	95
Abbildung 46: Denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel zur Auftrennung der 5'-markierten Nukleinsäureisolate a) vor und b) nach Verdau mit RNase T ₁	98
Abbildung 47: Agarosegel der aufgetrennten BDVM total-RNA-Extrakte aus persistent infizierten Vero-Zellen.	101
Abbildung 48: Northern-Blot der verschiedenen BDVM-Varianten mit RNA aus persistent infizierten Vero-Zellen.	102
Abbildung 49: Western-Blot Analyse mit unterschiedlichen Primärantikörpern gegen β -Tubulin, BDVN und BDVM zur Detektion der zellulären Translationsrate in Abhängigkeit von BDVM-Mutationen.	103
Abbildung 50: Wachstumskinetik der verschiedenen rBDV-Varianten in Oligoglioblastoma-Zellen.	105
Abbildung 51: Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Aufkommen der Rettungsmutation D95N für das rBDV mit BDVM H112W R34/53A.....	107
Abbildung 52: Strukturelle Abweichung der verschiedenen BDVM-Varianten im Vergleich zu BDVM <i>wt</i>	109
Abbildung 53: Unterschiedliche konformationelle Anordnungen des Loop30 in den verschiedenen Varianten von BDVM.....	110
Abbildung 54: Konformationelle Anordnungen des Loop50 in den verschiedenen Varianten von BDVM.....	112
Abbildung 55: Übertragung der neuen RNA-Bindungsstellen aus BDVM H112W (R3) und BDVM R34/53A auf BDVM <i>wt</i>	113
Abbildung 56: Möglicher Verlauf der gebundenen ssRNA in BDVM.....	114

Abbildung 57: Analyse des Oligomerisierungszustandes verschiedener BDVM-Varianten in Vero-Zellen.....116

Abbildung 58: Interaktionsnetzwerk innerhalb des Tetramers von a) BDVM *wt* und b) dem kristallographischen Tetramer von BDVM H112W R34/53A D95N.119

Abbildung 59: Oberflächenladung von a) BDVM *wt* und b) BDVM H112W R34/53A D95N.123

Abbildung 60: Zusammenfassung des Einflusses der verschiedenen Oligomerisierungszustände von BDVM auf den Infektionsweg des Virus.133

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über das Herstellungsverfahren der verschiedenen BDVM-Varianten.	34
Tabelle 2: Molare Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und von Disulfidbrücken bei 280 nm.	42
Tabelle 3: Übersicht der molaren Extinktionskoeffizienten ϵ der jeweiligen BDVM-Varianten bei 280 nm.	42
Tabelle 4: Auflistung der Kristallisationsbedingungen verschiedener BDVM-Varianten und der verwendeten Proteinkonzentration.	62
Tabelle 5: Statistische Werte der vorliegenden Strukturen der verschiedenen Varianten von BDVM.	65
Tabelle 6: Auf Basis des ermittelten Retentionsvolumens der Größenausschlusschromatographie berechnete relative Molekulargewichte verschiedener BDVM-Varianten.	86
Tabelle 7: Übersicht der durch analytische Ultrazentrifugation bestimmten apparenten Molekulargewichte verschiedener BDVM-Varianten.	89
Tabelle 8: Übersicht über die Absorptionswerte verschiedener BDVM-Varianten bei 280 und 260 nm sowie die daraus resultierenden Quotienten A_{280}/A_{260}	94
Tabelle 9: Übersicht über die Reinheit und Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren nach der Reinigung verschiedener BDVM-Varianten.	95
Tabelle 10: Übersicht über die Reinigung der Nukleinsäureproben nach 5'-Dephosphorylierung durch CIP.	96
Tabelle 11: Erhaltene Sequenzen nach der Subklonierung der an verschiedene BDVM-Varianten gebundenen kurzen RNAs.	99
Tabelle 12: Übersicht der ermittelten Virustiter der verschiedenen rBDV.	104
Tabelle 13: Oligomerisierungszustände der verschiedenen BDVM-Varianten gemäß der Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation und der Größenausschlusschromatographie.	115

Formelverzeichnis

Formel 1: Proteinkonzentrationen in der UZ-Küvette nach Einstellung des Gleichgewichtes.	40
Formel 2: Formel zur Least-Squares-Anpassung.	40
Formel 3: Lambert-Beersches Gesetz zur Bestimmung der Proteinkonzentration an Hand des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ	42

1 Einleitung

1.1 *Die Bornasche Krankheit*

Die Erstbeschreibung der Krankheit erfolgte vermutlich im Jahre 1767 durch Johann B. von Sind in seinem Werk „Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt,...“ (von Sind 1767). Darin beschrieb er die Symptome der hitzigen Kopfkrankheit bei erkrankten Pferden folgendermaßen: „Das Pferd ist anfänglich traurig und versaget sein Futter; es läßt den Kopf und die Ohren hängen, hat Hitze und Schleim im Maul, trübe und wässrige Augen; wanket im Gehen hin und her, als ob es schwindlich wäre; [...] drückt den Kopf gegen die Mauer, [...] endlich fällt es in convulsive Bewegungen, woran es meistens das Leben lässet“ (von Sind 1767; Iben 2006). Später wurde dieses Krankheitsbild nach der Stadt Borna (Sachsen, Deutschland) benannt, da die Krankheit dort zwischen 1891 und 1895 epidemisch unter Kavalleriepferden auftrat (Walther 1896; Walther 1899).

Unter der Bornaschen Krankheit (BD), verursacht durch das Virus der Bornaschen Krankheit (BDV), versteht man eine persistente Virusinfektion, die nach einer unbestimmten Zeitspanne eine meist schwerwiegend bis tödlich verlaufende Entzündung des Rückenmarks und Gehirns zur Folge hat. Es ist aber auch möglich, dass infizierte Tiere keine bis sehr wenige Symptome aufweisen (Staehele *et al.* 2000). Neben Pferden, Schafen und weiteren Nutztieren (Staehele *et al.* 2000) können auch andere warmblütige Tiere wie Luchse (*Lynx lynx*) (Degiorgis *et al.* 2000), Lamas (*Lamas pacos*) (Jacobsen *et al.* 2010), Waschbären (*Procyon lotor*) (Hagiwara *et al.* 2009) und auch Vögel (im Besonderen *Psittaciformes* (Staehele *et al.* 2010)) auf natürliche Art und Weise infiziert werden. Eine experimentelle Infektion ist bei den meisten warmblütigen Tieren, von Mäusen (*Mus musculus*) und Ratten (*Rattus ssp.*) bis hin zu höheren Primaten, möglich (Staehele *et al.* 2000). Die ersten Symptome können, wie durch von Sind beschrieben, vielfältig sein (von Sind 1767). Sie beginnen für gewöhnlich mit Koliken, Depressionen und Wärmestau. Nach circa zwei Wochen folgen dann Störungen des Bewegungsapparates, die sich als Zwangsbewegungen oder in Form von Lähmungen äußern können. Pferde sind dabei besonders stark von

Lähmungserscheinungen betroffen. Schlussendlich führen die verschiedenen Symptome häufig zum Tod des Tieres. Interessant ist dabei, dass sich die Fälle BDV-infizierter Tiere im Wesentlichen auf Zentraleuropa beschränken. Es gibt wenige Ausnahmen, wie zum Beispiel Japan, wo sowohl ein Waschbär (Hagiwara *et al.* 2009) als auch ein Pferd (Taniyama *et al.* 2001) BDV-positiv getestet wurden.

Nachdem auch Infektionen höherer Primaten mit BDV nachgewiesen wurden, begann die Debatte über einen möglichen Zusammenhang einer BDV-Infektion beim Menschen mit neurologisch-psychiatrischen Krankheiten (Thakur *et al.* 2009; Nunes *et al.* 2008; Bode *et al.* 1996). Inzwischen scheint jedoch geklärt, dass die Detektion von Bornaviren in menschlichem Material auf Kontaminationen innerhalb des Labors zurück zu führen sind (Schwemmler *et al.* 1999; Dürrwald *et al.* 2007; Hornig *et al.* 2012). Dennoch ist diese Debatte noch nicht endgültig abgeschlossen.

Für BDV konnte bisher gezeigt werden, dass eine vertikale Übertragung des Virus in Mäusen möglich ist (Okamoto *et al.* 2003). Eine horizontale Übertragung konnte hingegen bisher nur im Zusammenhang mit natürlichen BDV-Reservoirspezies wie der Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) (Hilbe *et al.* 2006; Puorger *et al.* 2010) und der Rötelmaus (*Myodes glareolus*) (Kinnunen *et al.* 2011) nachgewiesen werden. Diese BDV-Reservoirspezies sind in der Lage, lebende Viren über den Urin oder Fäzes auszuscheiden. Vermutlich gehen die so ausgeschiedenen Viren durch einen olfaktorischen Übertragungsweg auf den Wirt über, wie sich im Rattenmodell zeigte (Sauder & Staeheli 2003). Dabei wird eine Infektion der Zielzellen über Rezeptor-vermittelte Endozytose vermutet, ohne jedoch den Zielrezeptor zu kennen (Gonzalez-Dunia *et al.* 1998; Clemente *et al.* 2009). Bekannt ist aber, dass das Virus über das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit (BDVG) an den unbekanntem Zielrezeptor bindet (Perez *et al.* 2007; Clemente & de la Torre 2007). Von hier aus breitet sich das Virus intraaxonal und transsynaptisch in kaudaler Richtung bis ins Zentralnervensystem aus (Morales *et al.* 1988; Shankar *et al.* 1992). Dort führt es zu einer persistenten Virusinfektion verschiedener Zellarten (Herzog & Rott 1980; Sauder *et al.* 2001). Dabei werden in der frühen Phase der Infektion vor allem Neuronen befallen, wohingegen im späteren Infektionsverlauf BDV viele verschiedene weitere Zelltypen infiziert (de la Torre 2006). Letztendlich werden die Krankheitssymptome durch eine Immunantwort des Wirts ausgelöst, wobei es zur CD8⁺ (Unterscheidungsgruppe 8⁺)-

Zell-vermittelten Zerstörung der infizierten Zellen kommt (Ludwig *et al.* 1988; Planz *et al.* 1995).

1.2 Das Virus der Bornaschen Krankheit und seine Genomorganisation

Das Virus der Bornaschen Krankheit gehört zur Ordnung der *Mononegavirales* in der Gruppe der behüllten Einzel(-)Strang-RNA-Viren. Zur Ordnung der *Mononegavirales* gehören neben der Familie der *Bornaviridae* auch die Familien der *Paramyxoviridae* (*Pneumovirinae* und *Paramyxovirinae*), *Filoviridae* (Ebola-Virus und Marburg-Virus) und *Rhabdoviridae* (unter anderem Tollwut und Vesikuläres Stomatitis Virus) (Knipe *et al.* 2006) sowie die *Nyaviridae*, mit den Vertretern Nyamanini Virus (NYMV) und Midway Virus (MIDWV) (Mihindukulasuriya *et al.* 2009) (Abbildung 1). Allerdings ist die Stellung der beiden zuletzt genannten Gattungen innerhalb der *Mononegavirales* noch nicht genau geklärt. In der Gattung der *Mononegavirales* sind die *Bornaviridae* am nächsten mit den *Rhabdoviridae* verwandt, mit denen sie einen gemeinsamen Vorläufer haben.

Das Virus der Bornaschen Krankheit bildet in der Ordnung der *Mononegavirales* die Familie der *Bornaviridae*. Dabei ist das Virus der Bornaschen Krankheit der Prototyp dieser Familie (Pringle 1991). Als zweiter Vertreter dieser Familie gilt das Virus der aviären Bornaschen Krankheit (ABV) (Honkavuori *et al.* 2008; Staeheli *et al.* 2010). Der einzige Unterschied zwischen BDV und ABV besteht darin, dass in BDV die Genomregion zwischen dem Nukleoprotein und dem X-Protein um 22 Nukleotide größer ist als in ABV. Weiterhin ist ABV nicht in der Lage andere Spezies als Vögel zu infizieren (Rinder *et al.* 2009; Staeheli *et al.* 2010).

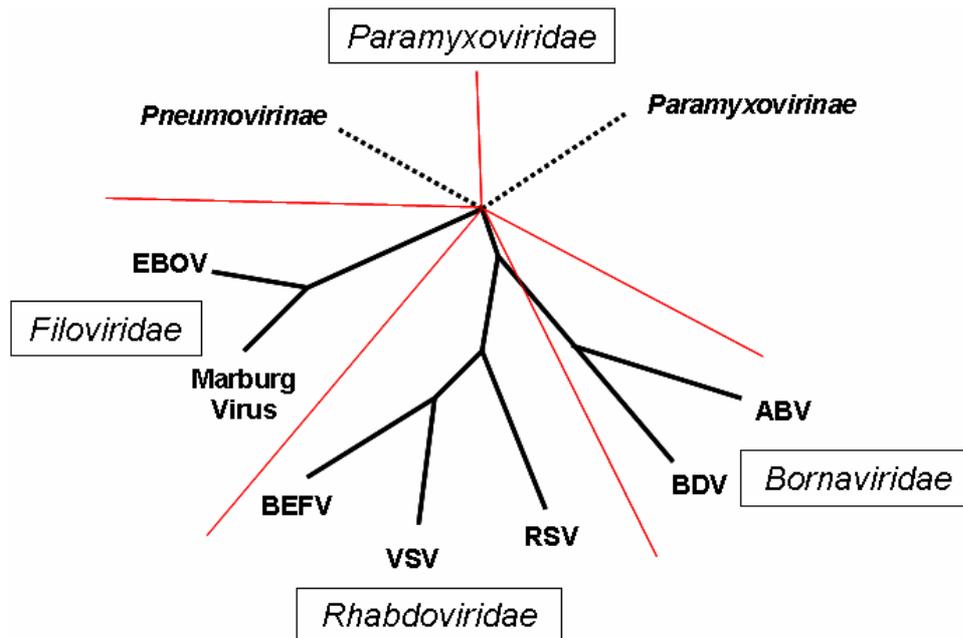


Abbildung 1: Stammbaum der Ordnung der *Mononegavirales*.

Schematisch gezeigt sind die Verwandtschaftsverhältnisse der *Paramyxoviridae* (beispielhaft repräsentiert durch die Unterfamilien *Pneumovirinae* und *Paramyxovirinae*), *Filoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Bornaviridae*. Die Familien der *Rhabdoviridae* und der *Bornaviridae* haben einen gemeinsamen Vorläufer. Die Astlänge des Stammbaums gibt schematisch die verwandtschaftliche Nähe der verschiedenen Viren untereinander an. Modifiziert nach *Fields Virology* (Knipe *et al.* 2006).

BDV besitzt ein einzelsträngiges nicht-segmentiertes negatives (nns) RNA-Genom mit einer Größe von 8,9 Kilobasen (kb) (Cubitt, Oldstone, *et al.* 1994; Wehner *et al.* 1997). Dabei handelt es sich um ein sehr kompaktes Genom, das zu 99,4% in sub-genomische RNAs transkribiert wird (Schneemann *et al.* 1994). Aus diesen sub-genomischen RNAs entstehen insgesamt sechs Proteine (Briese *et al.* 1994; Wehner *et al.* 1997). Dabei handelt es sich um das Nukleoprotein BDVN, vorkommend in den beiden Spleißvarianten p38 und p39 (Kobayashi *et al.* 1998), das eine Rolle bei der Verpackung der viralen RNA im Ribonukleoproteinkomplex (RNP) spielt und Teil des aktiven Polymerasekomplexes ist (Schwemmle *et al.* 1998; Perez *et al.* 2003). Das in den zwei Isoformen p16 und p23 (Kobayashi *et al.* 2000) vorkommende Phosphoprotein BDVP ist ein transkriptioneller Kofaktor der RNA-abhängigen Polymerase BDVL (Perez *et al.* 2003). BDVX oder das X-Protein reguliert die Aktivität des viralen Polymerasekomplexes und hemmt die Apoptose virusinfizierter Zellen (Perez *et al.* 2003; Poenisch *et al.* 2004; Poenisch *et al.* 2009). Dem Matrixprotein BDVM kommt die Aufgabe zu, das Innere der Virushülle auszukleiden. BDVG, das Glykoprotein, ist der Ligand des zellulären Rezeptors und

vermittelt somit die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle (Perez *et al.* 2007). Abschließend folgt die RNA-abhängige RNA-Polymerase BDVL, die zusammen mit BDVN und BDVP den aktiven Polymerasekomplex bildet (Perez *et al.* 2003). Die genomische Organisation von BDV ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

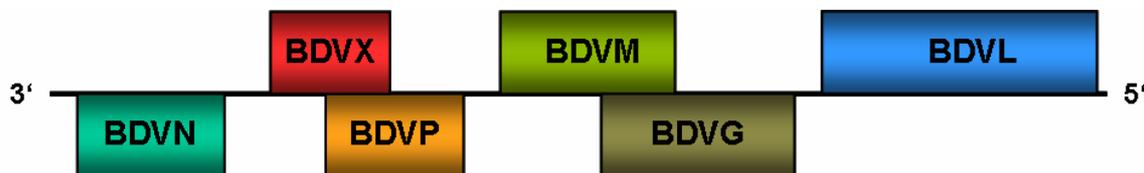


Abbildung 2: Genomorganisation von BDV.

Die Anordnung der exprimierten BDV-Proteine ist in 3'-5' Richtung dargestellt. Es handelt sich dabei um das Nukleoprotein BDVN, das X-Protein BDVX, das Phosphoprotein BDVP, das Matrixprotein BDVM, das Glykoprotein BDVG sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase BDVL. Die offenen Leserahmen (ORF's) der Proteine überschneiden sich teilweise.

1.3 Die Replikation des Virus der Bornaschen Krankheit

Einzigartig unter den *Mononegavirales* ist die Nutzung der Spleißmaschinerie der Wirtszelle durch BDV, um die verschiedenen Spleißvarianten seiner Proteine herzustellen (Schneider *et al.* 1994). Das BDV-Genom verfügt über zwei Spleißdonorstellen sowie über drei Spleißakzeptorstellen. Dabei stimmen die Sequenzmotive der BDV-Spleißstellen mit den Konsensussequenzen für Säugetierspleißstellen überein (Schneider *et al.* 1994; Tomonaga *et al.* 2000; Cubitt *et al.* 1994; Tomonaga *et al.* 2002). Da BDV sich im Kern der Wirtszelle repliziert und während der Transkription den zellulären Spleißapparat nutzt, spielt der nukleo-zytoplasmatische Transport von BDV-Makromolekülen eine entscheidende Rolle im viralen Lebenszyklus (Schneider *et al.* 1994; de la Torre 2006). Es handelt sich dabei um einen aktiven, Energie-abhängigen Prozess, der über Kernlokalisierungssignale (NLS) und nukleäre Exportsignale (NES) reguliert wird. Allerdings ist noch nicht bekannt, wie genau das Virus den Im- und Export aus dem Zellkern steuert. Dabei scheinen die beiden Hauptantigene BDVP und BDVN beteiligt zu sein, da sie ein NLS und/oder NES enthalten (Kobayashi *et al.* 1998; Shoya *et al.* 1998; Kobayashi *et al.* 2001). Diese Proteine können direkt oder indirekt an die virale RNA und virale Proteine binden und mit diesen zwischen dem

Zytoplasma und dem Zellkern hin und her wandern. BDVP hat dabei wahrscheinlich die Funktion, den Komplex im Zellkern zurück zu halten. Im Gegensatz transportieren BDVN und BDVX den Komplex aus dem Zellkern ins Zytoplasma (Tomonaga *et al.* 2002).

Die viralen mRNAs besitzen, wie eukaryotische mRNA, am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz und am 5'-Ende eine Kappenstruktur (de la Torre 2002). BDV-Polypeptide werden dabei, mit Ausnahme von BDVN, von polycistronischen mRNAs translatiert (Tomonaga *et al.* 2002; de la Torre 2002). Für die Bildung der viralen Partikel sind vor allem BDVG und BDVM von Bedeutung. Sie alleine sind schon in der Lage, Virus-ähnliche Partikel (VLP) zu bilden (Perez & de la Torre 2005). Über den genauen Ablauf der Bildung und Knospung infektiöser Partikel ist nur bekannt, dass auch hier BDVG und BDVM ausreichend sind (Perez & de la Torre 2005). Neben einer Verbreitung über infektiöse Viruspartikel kann BDV sich auch direkt von Zelle zu Zelle verbreiten. Der Mechanismus hierfür ist noch nicht ausreichend identifiziert, könnte jedoch durch den viralen Ribonukleoproteinkomplex (RNP) reguliert werden (de la Torre 2006; Clemente & de la Torre 2007). Bisherige Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass zunächst eine primäre Infektion der Wirtszellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose stattfindet und sich das Virus anschließend von Zelle zu Zelle verbreitet (Abbildung 3).

Bei BDV handelt es sich um das erste nicht-Retrovirus, für das eine teilweise Integration in das Genom von Säugetieren und dem Menschen nachgewiesen wurde. Die Grundlage dafür bildet die Replikation von BDV im Zellkern der Wirtszelle (Horie *et al.* 2010). Bei dieser Integration handelt es sich um ein Gen, das homolog zu BDVN ist und vor etwa 40 Millionen Jahren in das Genom höherer Vertebraten integriert wurde. Dieses Gen wird exprimiert, jedoch ist seine Funktion bisher unbekannt. Die Integration der endogenen Borna-ähnlichen N-Elemente (EBLN) erfolgte wahrscheinlich unter Verwendung der reversen Transkriptase von so genannten LINEs (lange eingefügte nukleäre Elemente). Erleichtert wurde dieser Vorgang vermutlich durch die Replikation von BDV im Kern. So konnte in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden, dass BDV sich teilweise in das Genom der Zielzelle integrieren kann (Horie *et al.* 2010).

In einer zweiten Veröffentlichung wurde bestätigt, dass sich nicht nur BDV sondern auch das Marburg- und Ebola-Virus vor etwa 40 Millionen Jahren in Teilen in das Genom höherer Vertebraten integriert haben (Belyi *et al.* 2010). Eine Integration

in das menschliche Genom und in das von höheren Primaten konnte aber auch hier nur für BDV nachgewiesen werden. Der hohe auf die Viruselemente wirkende positive Selektionsdruck macht es wahrscheinlich, dass diese zu einer Resistenz gegen die Viruserkrankungen führen könnten (Belyi *et al.* 2010). Kobayashi *et al.* konnten hingegen zeigen, dass die EBLN zumindest in der Zeit nach der Trennung der Neu- und Altwelt-Affen keiner positiven Selektion mehr unterliegen und auch nicht unbedingt für funktionelle Proteine kodieren müssen (Kobayashi *et al.* 2011).

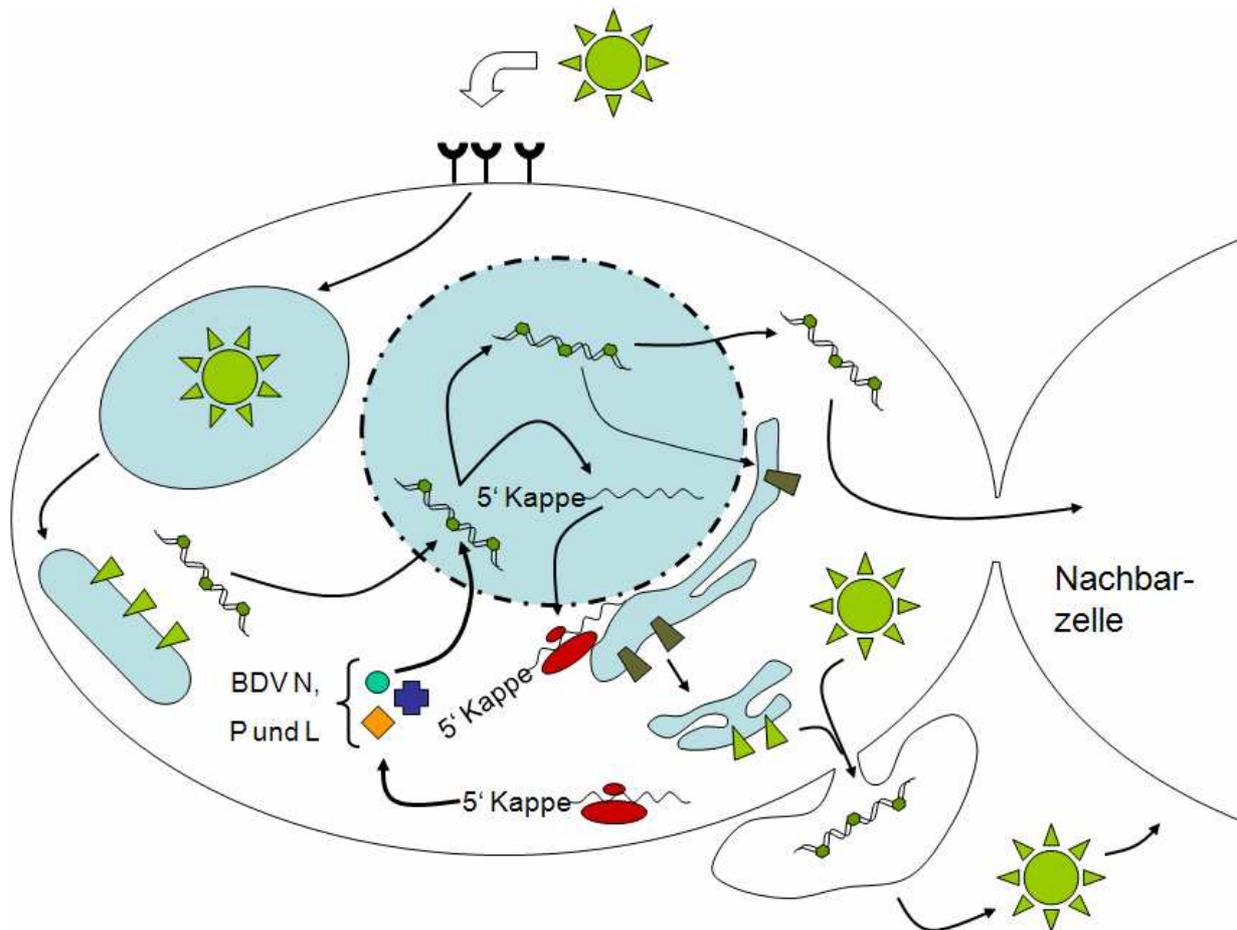


Abbildung 3: Lebenszyklus von BDV in einer Wirtszelle.

BDV gelangt über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzelle. Die Ansäuerung des Milieus im späten Endosom führt zur Verschmelzung zwischen der Zell- und Virusmembran, wodurch der virale Ribonukleoproteinkomplex (RNP) in das Zytoplasma der Zielzelle gelangt. Die RNA-Replikation und -Transkription findet im Zellkern statt, dafür werden die RNP, bestehend aus dem Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein (P) und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (L), über einen noch unbekanntem Mechanismus in den Zellkern transportiert. Für die Bildung neuer viraler Partikel ist es notwendig, dass die neu gebildeten RNP aus dem Zellkern transportiert werden und sich dann mit BDVG und BDVM assoziieren. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit einer direkten Ausbreitung von BDV von Zelle zu Zelle, ohne dabei reife Viruspartikel zu bilden. Modifiziert nach de la Torre (2006).

1.4 Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit

Virale Matrixproteine kleiden das Innere der Virushülle aus und vermitteln so den Kontakt zwischen Lipiden und den restlichen Virusproteinen sowie dem Virus-Genom (Lenard 1996). Dazu besitzen alle bisher bekannten viralen Matrixproteine die intrinsische Fähigkeit, mit sich selbst höhere Oligomere zu bilden (Lenard 1996; Harty 2009; Graham *et al.* 2008; Gaudier *et al.* 2002).

Erstmals isoliert wurde BDVM im Jahr 1985 aus persistent mit BDV infizierten Zellen (Schädler *et al.* 1985). Daraufhin wurde es zunächst als N-glykosyliertes Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 16,2 kDa beschrieben (Kliche *et al.* 1994). Später stellte sich heraus, dass es sich beim vermeintlichen Glykoprotein um das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit handelt. Dieses ist nicht glykosyliert (Kraus *et al.* 2001) und liegt in Lösung entweder als stabiles Tetramer oder Oktamer vor (Kraus *et al.* 2005b). Dabei stellt sich ein Tetramer-Oktamer-Gleichgewicht mit der Dissoziationskonstante $K_D = 0,6 \mu\text{M}$ ein (Kraus *et al.* 2005b). BDVM ist das kleinste Matrixprotein innerhalb der Gattung der *Mononegavirales*, welche als rein zytosolische, mit der Virus-Hülle assoziierte Proteine generell nicht glykosyliert sind.

Matrix-Proteine spielen im viralen Lebenszyklus eine wichtige Rolle. Sie verändern nach der Replikation in vielen negativ-strängigen Viren aktiv die Konformation des RNP und bilden somit die treibende Kraft für die Virus-Knospung (Garoff *et al.* 1998). Auch für BDVM ist eine derartige Interaktion mit dem RNP beschrieben, indem BDVM mit dem N-Terminus von BDVP und somit mit dem RNP interagiert (Chase *et al.* 2007). Darüber hinaus gehen Matrixproteine mit Lipiden, RNA, weiteren Proteinen und mit sich selbst Wechselwirkungen ein (Lenard 1996; Harty 2009; Ge *et al.* 2010). So ist es eine intrinsische Aufgabe von Matrixproteinen, mit sich selbst Homooligomere zu bilden. BDVM ist daher zur Bildung stabiler Homotetramere und Homooktamere in der Lage (Kraus *et al.* 2005b). Diese sind ubiquitär sowohl im Zellkern in den Nukleokapsid-Strukturen (sog. *nuclear dots*), als auch im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt (Chase *et al.* 2007).

1.4.1 RNA-Bindungseigenschaften von BDVM

BDVM bindet einzelsträngige RNA mit einer Länge von 16-20 Nukleotiden und schützt diese vor einem Verdau durch RNasen (Abbildung 4) (Neumann *et al.* 2009). Solch eine RNA-Bindung ist auch für andere Matrixproteine bekannt, zum Beispiel für das Matrixprotein des Ebola-Virus VP40 (Gomis-Rüth *et al.* 2003). Für andere Matrixproteine, wie für das Matrixprotein des humanen respiratorischen Synzytial Virus (RSV), wird sie vermutet (Money *et al.* 2009).

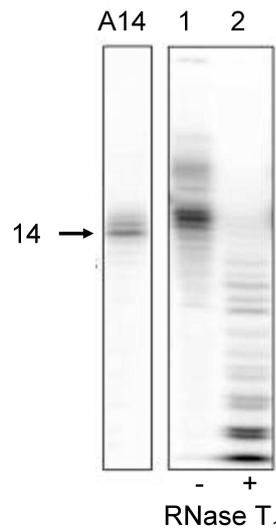


Abbildung 4: Harnstoff-Gel einer 5'-markierten RNA-Probe, die an BDVM gebunden war.

In Spur 1 ist die BDVM-gebundene, extrahierte und 5'-markierte RNA aufgetragen. Die Markierung erfolgte mittels Polynukleotidkinase. Die Hauptfraktion der extrahierten RNA ist zwischen 16 und 20 Nukleotiden lang. In Spur 2 ist dieselbe RNA nach Verdau mit RNase T₁ aufgetragen. Die Zugabe von RNase T₁ führte zum Abbau der RNA. Daraus lässt sich schließen, dass es sich um RNA handelt. Zum Vergleich ist als Größenstandard Poly-(A)₁₄ aufgetragen. Modifiziert nach Neumann *et al.* (2009).

Dabei ist bisher ungeklärt, woher diese RNA stammt. Im Fall von BDVM wurde rekombinant produziertes Protein verwendet, so dass es sich bei der gebundenen RNA vermutlich um RNA aus dem Expressionsorganismus *E. coli* handelt. Ebenso verhält es sich bei der gebundenen RNA von VP40 des Ebola-Virus. Hier wurden als Expressionsorganismen menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) verwendet (Gomis-Rüth *et al.* 2003). Genauso unbekannt wie die Herkunft der RNA ist auch deren Bedeutung für den Lebenszyklus des Virus. Im Fall von VP40 konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von RNA der Oligomerisierungszustand des Oktamers induziert wird und dass dieser essentiell für die Replikation des Virus ist (Hoenen *et al.* 2005). Warum das Virus sich ohne diesen Oligomerisierungszustand nicht mehr replizieren kann, ist bisher ungeklärt.

1.4.2 Die Proteinstruktur von BDVM

1.4.2.1 Übersicht der Proteinstruktur von BDVM

Zum besseren Verständnis der Funktionen und Eigenschaften von BDVM muss die von Neumann *et al.* aufgeklärte Kristallstruktur betrachtet werden (Neumann *et al.* 2009). BDVM kristallisiert in der Raumgruppe I432 mit einem Monomer in der asymmetrischen Einheit. Die Struktur des rekombinant erzeugten Proteins weist dabei ein zentrales β -Sandwich auf, das aus zwei sich gegenüberstehenden β -Faltblättern besteht. Ein β -Faltblatt wird dabei jeweils aus drei antiparallelen β -Strängen gebildet. Das so entstandene zentrale β -Sandwich der BDVM-Struktur wird von mehreren kurzen α -Helices und Loop-Strukturen flankiert (Abbildung 5).

Wie bereits zuvor erwähnt, existiert BDVM in Lösung entweder als stabiles Tetramer oder als Oktamer. Bisher sind detaillierte Informationen nur über die Struktur des Tetramers bekannt. Dieses lässt sich aus dem Monomer, das in der Einheitszelle vorliegt, auf Grund der vierzähligen Symmetrieachse bilden. Daraus ergibt sich der begrenzte Informationsgehalt dieser Struktur. Denn es liegt auf Grund der Symmetrie nur die gemittelte Information für einen Monomer des Tetramers vor. Das auf diese Weise entstandene Tetramer bildet eine flache, quadratische Struktur, in der die Monomere jeweils um 90° zueinander gedreht sind (Abbildung 6). Die Interaktion der Monomere erfolgt durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, elektrostatische und teilweise auch hydrophobe Interaktionen. Die Hauptinteraktionen finden dabei jeweils zwischen zwei benachbarten Monomeren innerhalb des Tetramers statt.

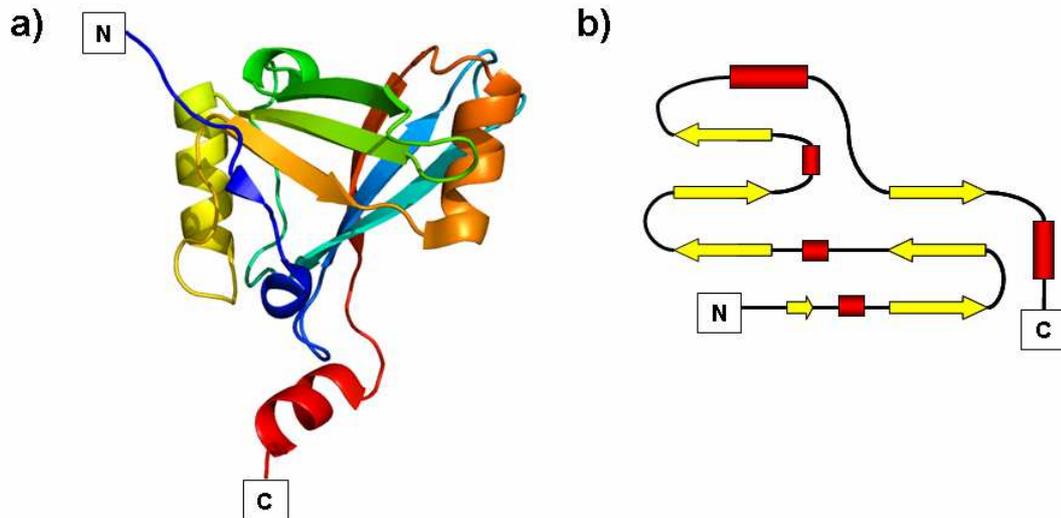


Abbildung 5: Darstellung der Proteinstruktur von BDVM.

In Teilabbildung a) ist der Verlauf der Primärsequenz farbig von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) dargestellt. In b) sind die Sekundärstrukturelemente in gelb für β -Stränge, rot für α -Helices und grün für Loops in einem Topologiediagramm abgebildet. Dabei sind die beiden antiparallelen β -Faltblätter aus jeweils drei β -Strängen zu erkennen, die in der Tertiärstruktur das zentrale β -Sandwich bilden, welches von kurzen α -Helices flankiert wird. Modifiziert nach Neumann *et al.* (2009), pdb-Code: 3f1j.

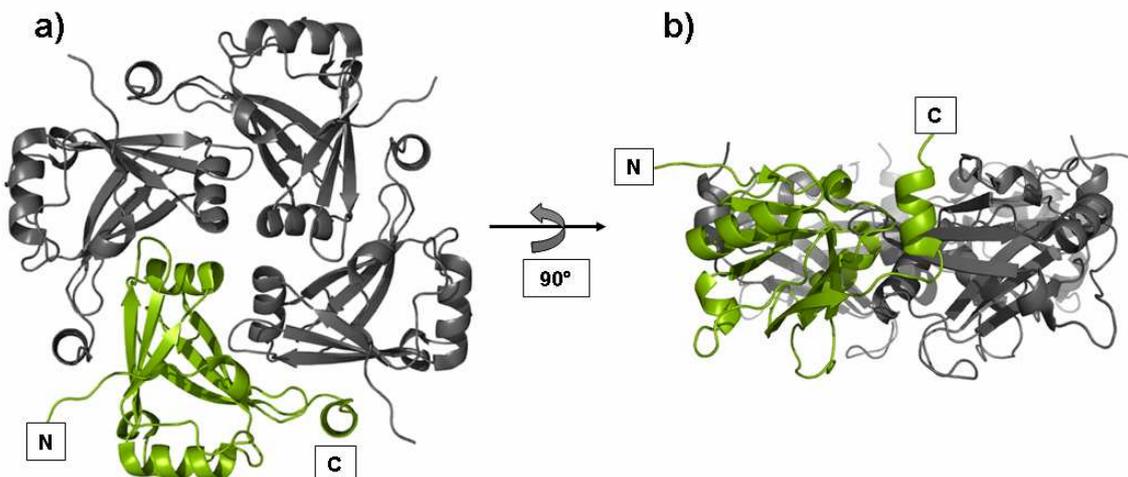


Abbildung 6: Tetramere Anordnung von BDVM, basierend auf dessen Kristallstruktur.

In a) ist gezeigt, wie sich aus einem in der asymmetrischen Einheit befindlichen Monomer (grün dargestellt) durch die vierzählige Symmetrieachse die biologisch aktive Form des Tetramers (grau) bilden lässt. Das Tetramer bildet a) eine quadratische und b) eine flache Struktur, bei der die jeweils benachbarten Monomere miteinander interagieren. pdb-Code: 3f1j.

1.4.2.2 Strukturvergleich mit anderen viralen Matrixproteinen

Eine Suche nach Proteinen mit ähnlicher Struktur wurde von Neumann *et al.* (2009) durchgeführt. Die Proteine mit der höchsten strukturellen Ähnlichkeit sind die C-terminale Domäne des Matrixproteins VP40 des Ebolavirus (mittlere quadratische Abweichung (rmsd) = 3,8 Å, pdb-code: 1h2c (Gomis-Rüth *et al.* 2003)) und die N-terminale Domäne des Matrixproteins von RSVM (rmsd = 3,1 Å, pdb-code: 2vqp (Money *et al.* 2009)).

Abbildung 7 zeigt einen Struktur-basierten Sequenzvergleich zwischen BDVM und VP40 sowie RSVM. Alle drei Proteine weisen trotz einer sehr geringen Sequenzähnlichkeit auf Nukleotidebene (zwischen 2 und 7%) eine ähnliche Faltung auf (Timmins *et al.* 2004). Die drei Proteine enthalten ein zentrales β -Sandwich aus zwei anti-parallelen β -Faltblättern, die jeweils aus drei β -Strängen bestehen. Eine Ausnahme davon bildet die N-terminale Domäne von RSVM, wo ein β -Faltblatt aus vier β -Strängen zusammengesetzt ist. VP40 und RSVM besitzen im Gegensatz zu BDVM zwei Domänen. In beiden Fällen ist die zweite Domäne aus einer Sequenzduplikation der ersten hervorgegangen, und somit sind die Domänen untereinander strukturell sehr ähnlich (Dessen *et al.* 2000; Money *et al.* 2009). Sowohl bei VP40 als auch bei RSVM haben die beiden Domänen der Proteine eine eigenständige Funktion übernommen. Bei RSVM ist die C-terminale Domäne vermutlich für die Membranassoziation zuständig (Money *et al.* 2009). Bei VP40 ist die N-terminale Domäne für die Membranassoziation verantwortlich (Scianimanico *et al.* 2000; R. W. Ruigrok *et al.* 2000), während die C-terminale Domäne RNA bindet (Gomis-Rüth *et al.* 2003).

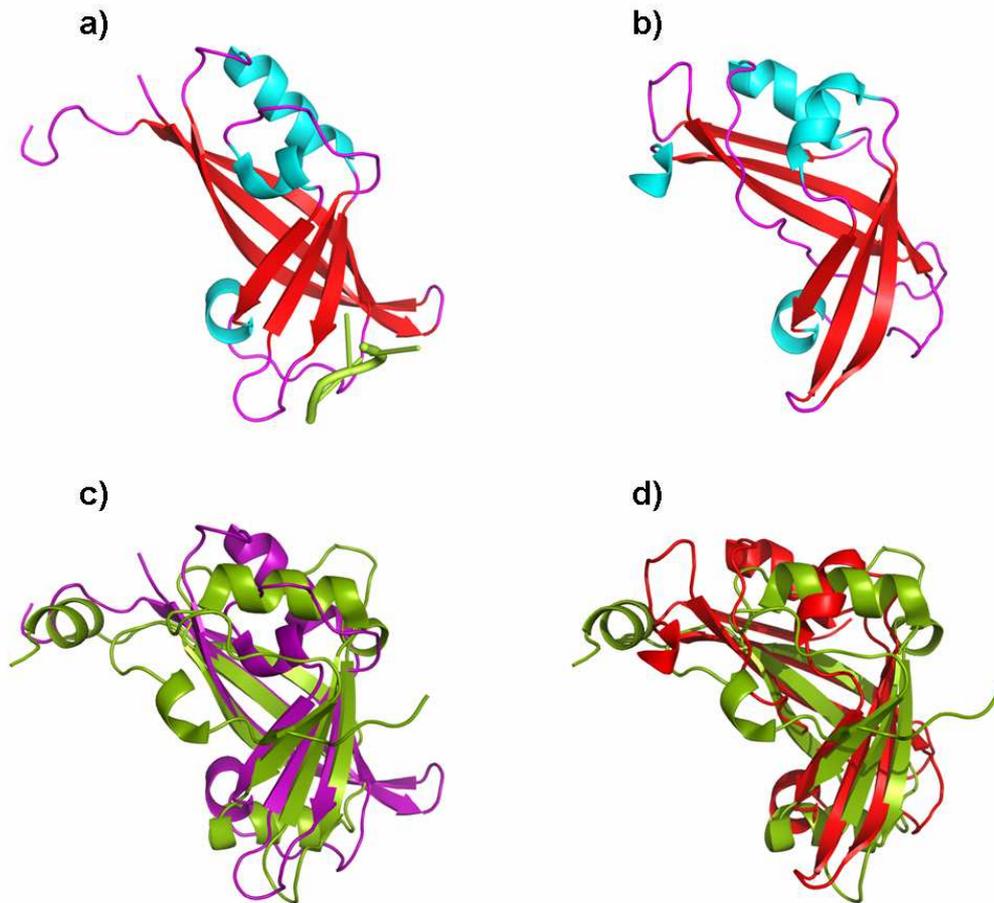


Abbildung 7: Struktur-basierter Sequenzvergleich zwischen BDVM und seinen nächsten strukturellen Verwandten, der C-terminalen Domäne von VP40 (a) und c)) und der N-terminalen Domäne von RSV (b) und d)).

Dargestellt ist a) die C-terminale Domäne von VP40 (pdb-Code: 1h2c), dem Matrixprotein des Ebolavirus, und b) die N-terminale Domäne des Matrixproteins von RSV (pdb-Code: 2vqp). Beide weisen ein zentrales β -Sandwich, bestehend aus zwei β -Faltblättern mit jeweils drei bzw. vier antiparallelen β -Strängen, auf. Das zentrale β -Sandwich wird von kurzen α -Helices und Loop-Strukturen flankiert. Die beiden Proteine sind in a) und b) jeweils nach ihren Sekundärstrukturelementen eingefärbt. Für VP40 ist in a) zusätzlich ein kurzes gebundenes RNA-Fragment (grün) dargestellt. Für beide Proteine wurde ein Struktur-basierter Sequenzvergleich mit BDVM (pdb-Code: 3f1j) durchgeführt. VP40 (lila) und BDVM zeigen in c) eine hohe Ähnlichkeit der Struktur im Bereich des zentralen β -Sandwichs. Ähnliches gilt für RSV (rot) und BDVM in d). Dabei ist anzumerken, dass die drei Proteine untereinander nur eine sehr geringe Ähnlichkeit auf Nukleotidebene (zwischen 2 und 7%) aufweisen (Timmins *et al.* 2004).

1.4.2.3 RNA-Bindungsstelle von BDVM

Hinsichtlich der ssRNA-Bindungseigenschaften gab die Kristallstruktur von BDVM aufschlussreiche Hinweise. In der Elektronendichte für BDVM wurde zusätzliche Dichte gefunden, die nicht zum Protein selbst gehörte. In der Struktur

wurde diese als Cytosin-5'-Monophosphat (C5P) interpretiert. Es besteht auch die Möglichkeit, dass es sich dabei um ein Uridin-5'-Monophosphat (U5P) handelt. Dieses Monophosphat interagiert mit dem Protein über eine Stapelungs-Interaktion mit den Resten von Phe37, das sich am Ende des Loops zwischen β -Strang eins und zwei befindet, und His112 in der Helix zwischen den beiden Faltblättern des β -Sandwichs (Neumann *et al.* 2009). Eine solche Stapelungs-Interaktion zwischen der Base der Nukleinsäure und aromatischen Resten und Ringsystemen von Aminosäureseitenketten ist typisch für RNA-Protein-Interaktionen. Zusätzliche hydrophobe Interaktionen zwischen der RNA-Base und dem Protein erfolgen mit der Seitenkette von Gln36. Darüber hinaus bildet das Sauerstoffatom der RNA-Base mit dem Stickstoffatom des Proteinrückgrats von Phe37 eine Wasserstoffbrücke aus.

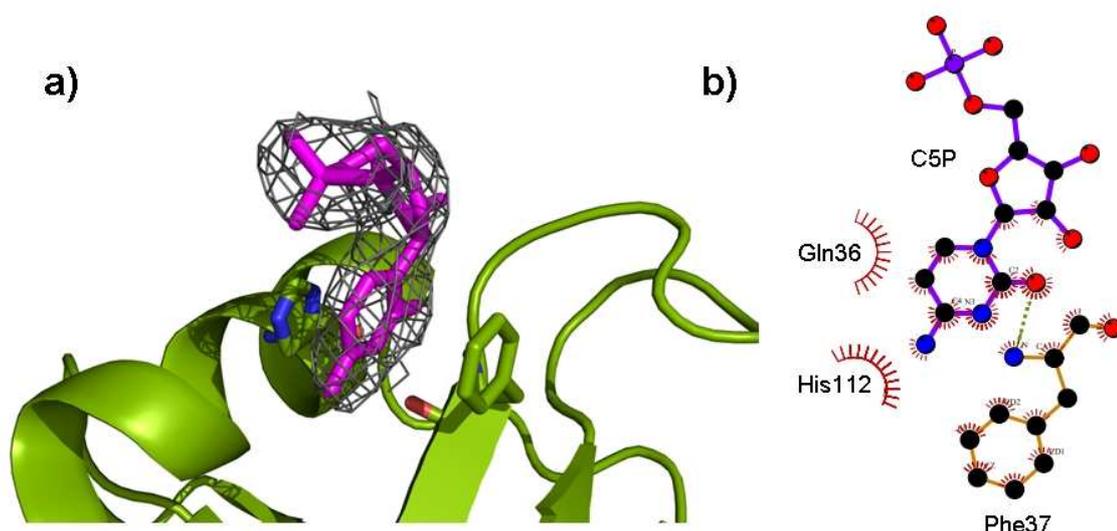


Abbildung 8: RNA-Bindungstasche von BDVM und Protein-RNA-Interaktionen.

In a) ist die Bindungstasche von BDVM (grün) für das Cytosin-5'-Monophosphat (magenta) gezeigt. Für die gebundene RNA ist deren Differenzelektronendichte als graues Netz dargestellt. Dabei ist die Stapelungsinteraktion zwischen His112 der RNA-Base und dem Phe37 gut zu erkennen. Weitere Interaktionen zwischen der RNA und dem Protein sind schematisch in b) angegeben. Neben den genannten Interaktionen kommt es auch noch zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der RNA-Base und der Seitenkette des Gln36 sowie zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoffatom der RNA-Base und dem Stickstoffatom des Proteinrückgrats von Phe37. Modifiziert nach Neumann *et al.* (2009), pdb-Code: 3f1j.

Die Bindungstasche für Desoxyribonukleinsäuren liegt nahe der vierzähligen Symmetrieachse des BDVM-Tetramers. An Hand des verfügbaren Platzes können von den vier vorhandenen RNA-Bindungstaschen maximal drei gleichzeitig besetzt werden, da es ansonsten zu sterischen Behinderungen im Zentrum des Proteins

kommt (Neumann *et al.* 2009). Die in der Struktur gefundene RNA-Base ist Teil einer ssRNA mit einer Länge zwischen 16 und 20 Nukleotiden (1.4.1).

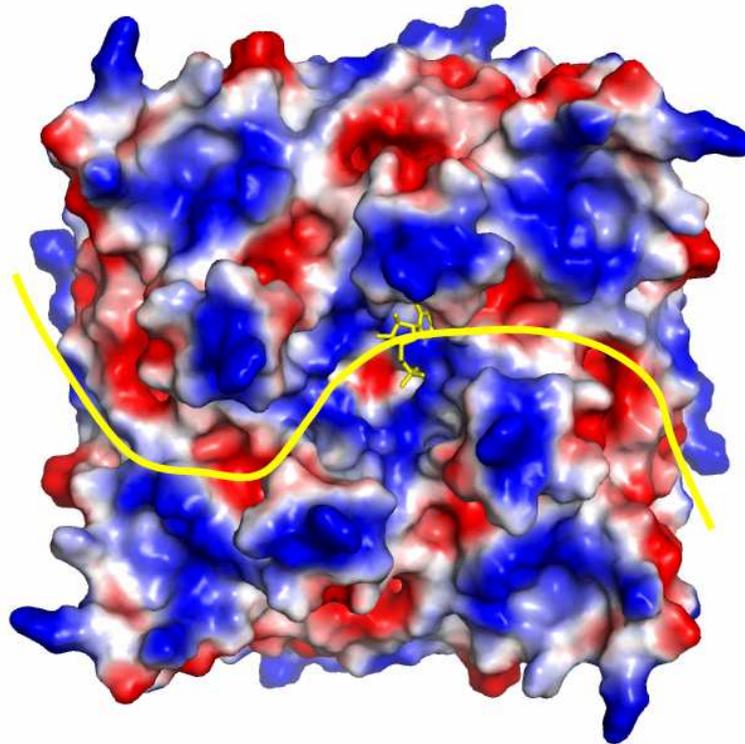


Abbildung 9: Position der RNA-Bindungsstelle in BDVM und der theoretische Verlauf der gebundenen ssRNA.

Dargestellt ist die Oberfläche des BDVM-Tetramers, welches nach seinem elektrostatischen Potential angefärbt ist (blau: positiv, rot: negativ). In gelbfarbenen Stäben ist die Position des gebundenen C5P im Zentrum des Tetramers wiedergegeben. Die gelbfarbene Linie gibt einen möglichen Verlauf der gebundenen ssRNA an. Dabei ist den RNA-Basen eine Interaktion in den Vertiefungen mit BDVM möglich, wohingegen das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat der ssRNA mit den positiv geladenen Oberflächenbereichen von BDVM wechselwirken kann. Modifiziert nach Neumann *et al.* (2009), pdb-Code: 3f1j.

Die Kristallstruktur von BDVM gibt keinen Hinweis darauf, wie die gesamte ssRNA an das Protein gebunden ist. Die identifizierte RNA-Bindungsstelle befindet sich im Zentrum von BDVM. Dennoch gibt die RNA-Bindungsstelle in Kombination mit der Oberflächenstruktur von BDVM einen Anhaltspunkt für die Art der ssRNA Bindung. Man geht davon aus, dass sich die ssRNA S-förmig in den Vertiefungen von BDVM einlagert und dadurch vor RNasen geschützt ist (Neumann *et al.* 2009; Lieber 2006). Dabei könnte das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat der ssRNA mit den positiv geladenen Flächen von BDVM elektrostatische Interaktionen eingehen und damit zu einer affineren Bindung beitragen.

Der Ursprung der gebundenen RNA im BDV-Wirtsorganismus ist bisher nicht geklärt. Die RNA des für die Kristallisation verwendeten rekombinant exprimierten BDVM stammt aus dem Expressionsorganismus *E. coli*. Ob es sich bei der im Wirtsorganismus durch BDVM gebundenen RNA um virale oder Wirts-RNA handelt, ist ebenso unklar wie die Bedeutung der gebundenen RNA im Lebenszyklus von BDV.

1.4.2.4 Vergleich der RNA-Bindungseigenschaften mit anderen viralen Matrixproteinen

Für einige weitere Matrixproteine aus der Ordnung der *Mononegavirales* ist die RNA-Bindung bekannt (VP40) oder wird angenommen, so zum Beispiel für RSVM (Money *et al.* 2009). Für VP40 erfolgte eine genauere Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaft der C-terminalen Domäne. Hier konnte gezeigt werden, dass VP40 den Oligomerisierungszustand als Oktamer nur bei gleichzeitiger RNA-Bindung einnehmen kann (Abbildung 10 a)) (Gomis-Rüth *et al.* 2003). Die Aufklärung der Kristallstruktur ergab, dass ein kurzes RNA-Fragment mit der Sequenz 5'-UGA-3' spezifisch gebunden ist. Dieses kurze RNA-Fragment stabilisiert die Interaktion der C-terminalen Domänen der VP40-Monomere innerhalb des Oktamers, da die RNA-Bindungsstelle von zwei benachbarten Monomeren innerhalb des Oktamers gebildet wird (Gomis-Rüth *et al.* 2003). Vergleichbar zu BDVM stammt auch diese RNA aus dem Expressionssystem (Hoenen *et al.* 2005). In weiterführenden Experimenten wurde nachgewiesen, dass die RNA-Bindung und damit gleichzeitig der oktamere Zustand von VP40 essentiell für das Überleben des Virus ist (Hoenen *et al.* 2005). Das 5'-UGA-3'-RNA-Fragment wird jeweils über das Arg134 zweier benachbarter Monomere innerhalb des Oktamers gebunden. Dabei tritt das Arg134 des ersten Monomers mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA in Wechselwirkung, wohingegen das Arg134 des zweiten Monomers mit dem Stickstoff-Atom des Adenin-Rings interagiert. Eine zusätzliche Wechselwirkung erfolgt zwischen dem Sauerstoffatom des Adenins und einem Wassermolekül des Lösungsmittels, welches wiederum mit dem Protein interagiert. Darüber hinaus kommt es noch zu einer Stapelungsinteraktion zwischen dem Adenin-Ring und dem Phe125 des zweiten Monomers (Abbildung 10 b)).

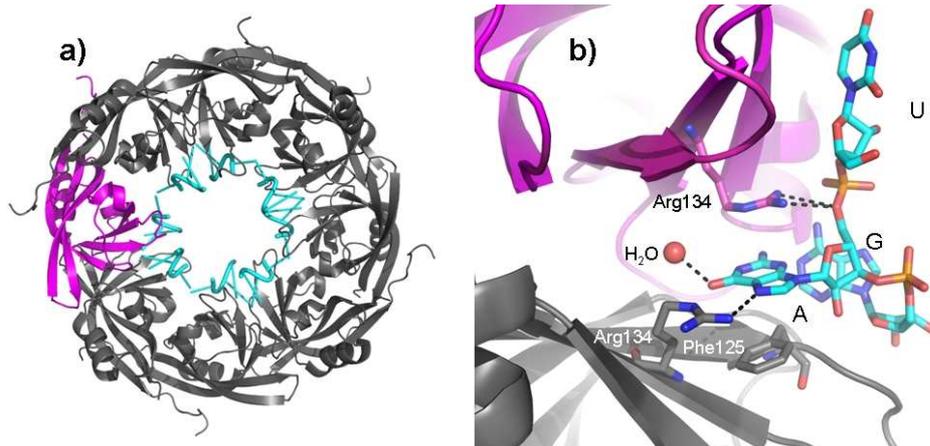


Abbildung 10: Oktamerzustand der N-terminalen Domäne von VP40 und RNA-Bindung zwischen zwei N-terminalen Domänen von VP40-Monomeren.

Der oktamere Zustand der N-terminalen Domäne von VP40 ist in a) dargestellt. Zur Veranschaulichung wurde ein VP40-N-Monomer in magenta angefärbt. Die gebundene RNA ist in cyan repräsentiert. Es ist zu erkennen, dass die 5'-UGA-3'-RNA zwischen zwei Monomeren innerhalb des Oktamers liegt. Die Interaktion der gebundenen RNA mit zwei Monomeren ist in b) dargestellt. Das Arg134 beider N-terminaler Domänen der VP40-Monomere interagiert dabei mit der gebundenen RNA. Zusätzlich besteht zwischen dem Phe125 und der RNA-Base des Adenins eine Stapelungsinteraktion. pdb-Code: 1h2c.

1.5 Ziel der Arbeit

Bisher ist bekannt, dass virale Matrixproteine wie BDVM, RSVM und VP40 RNA binden können. Diese RNA-Bindung hat im Fall von VP40 einen Einfluss auf den Oligomerisierungszustand und auch auf die Infektiosität des Virus. Dabei ist die Ursache dafür bisher völlig unklar. Ziel dieser Arbeit ist es, am Beispiel von BDVM die RNA-Bindungseigenschaft eines viralen Matrixproteins näher strukturell, biochemisch und zum ersten Mal funktionell zu charakterisieren. Dazu werden zuerst die Aminosäuren variiert, welche direkt an der bekannten RNA-Bindungsstelle beteiligt sind. Dabei wird zum einen das Phe an Position 37 durch ein Ala ersetzt, um die Stapelungsinteraktion zwischen Protein und RNA-Base zu schwächen. Zum anderen wird das His an Position 112 durch ein Trp ersetzt. Das größere Trp soll die RNA-Bindung sterisch verhindern. Auf der strukturellen und funktionellen Basis dieser beiden Varianten folgt dann die Erzeugung weiterer BDVM-Varianten.

Ziel ist es dabei, umfassende Daten über die Struktur sowie die *in vitro*- und *in vivo*-Eigenschaften zu erhalten. Die Gesamtheit dieser Daten soll den bisher unbekanntem Zusammenhang zwischen RNA-Bindung, Oligomerisierung und der Funktion von BDVM erklären.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

β-Alanin	Roth
n-Butanol	Chemikalienausgabe
2-Mercaptoethanol	Merck
6-Aminocaprinsäure	Serva
AccuGel™ 19:1 (40% (w/v) 19:1 Acrylamid/Bisacrylamid)	National Diagnostics
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Sigma
Borsäure	Roth
Bradford-Reagens	Bio-Rad
Bromphenolblau	Roth
BSA	Sigma
Coomassie Brilliantblau 250 G	Merck
Chloroform	Roth
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen
Eagle's Modified Essential Medium (EMEM)	Invitrogen
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom
Glukose	Roth
Glutamin	Roth
Glycerin	Roth
Glykogen	Roche
Harnstoff	Roth

Hefeextrakt	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'- [2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Maltose	Merck
Methylenblau	Sigma
Methylgrün	Roth
Milchpulver	Frema
Normal-Ziegen-Serum	Vector (USA, Ca)
Paraformaldehyd	GE Healthcare
Penicillin	Life Technologies
Phenol	Roth
Rotiphorese (30% Acrylamid/ 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid)	Roth
Salzsäure (HCl)	Merck
Streptomycin	Life Technologies
Super-Signal West Pico/Femto	Pierce
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Trizol	Peq Lab
Trypton	Roth
Xylencyanol	Merck

2.2 Medien, Lösungen und Puffer

2.2.1 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

LB-Agar

1% Trypton (w/v); 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% NaCl (w/v); 1% Agar-Agar (w/v);
pH 7

LB-Medium

1% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v); 1% NaCl (w/v); pH 7

SOC-Medium

2% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl;
10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose; pH 7

Der pH-Wert der Medien wurde mit NaOH bzw. HCl vor dem Autoklavieren eingestellt. Zusätze, die nicht hitzestabil sind, wurden im Anschluss dazu gegeben.

Antibiotika

100 mg/ml in ddH₂O

Die hergestellte Antibiotikastammlösung wurde mit Hilfe eines Spritzenfilters (0,22 µm) steril filtriert und dem jeweiligen Medium im Verhältnis 1:1000 zugegeben.

IPTG

1 M in ddH₂O

Die Zugabe der IPTG-Lösung zum Expressionsmedium erfolgte im Verhältnis 1:3333.

2.2.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 10%

10% FKS (v/v); 263 mg Glutamin; 10000 U Penicillin; 20 mg Streptomycin pro 500 ml

Eagle's Modified Essential Medium (EMEM) 10%

10% FKS (v/v); 10000 U Penicillin; 20 mg Streptomycin pro 500 ml

Einfriermedium

60% MEM (v/v); 30% FKS (v/v); 10% DMSO (v/v)

2.2.3 Lösungen

Färbelösungen

Folgende Lösungen wurden zum Färben und Entfärben von SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Fairbanks (Fairbanks *et al.* 1971) verwendet.

Fairbanks A:	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie Brilliantblau 250 G
Fairbanks B:	10% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie Brilliantblau 250 G
Fairbanks C:	10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie Brilliantblau 250 G
Fairbanks D:	10% (v/v) Essigsäure

2.2.4 Puffer

Standardpuffer

PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,89 g Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O; 0,2 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen; pH 7,4
PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,89 g Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O; 0,2 g KH ₂ PO ₄ ; 0,1 g MgCl ₂ ; 0,13 g CaCl ₂ auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen; pH 7,4

Gelelektrophoresepuffer

Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE Puffer	2 M Tris/HCl; 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA; pH 8,3
5x Probenpuffer	50% (v/v) Glycerin; 0,25% (w/v) Bromphenolblau in 1 x TAE Puffer
Ethidiumbromid	1% (10 mg/ml)

Im Agarosegel wurde mit der Ethidiumbromidlösung eine Endkonzentration von 0,001% (v/v) eingestellt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl; pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
10 x Lämmli-Puffer	25 mM Tris/HCl; 200 mM Glycerin; 0,3 mM SDS; pH 8,9
3 x Probenpuffer	1,75 ml Sammelgelpuffer, 5 ml 10% (w/v) SDS; 1,5 mM Glycerin; 1,25 ml Bromphenolblau; 0,5 ml 2-Mercaptoethanol

Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10 x BN-Kathodenpuffer	500 mM Tricine; 150 mM BisTris
10 x BN-Anodenpuffer	500 mM BisTris-HCl pH 7,0
2 x BN-Ladepuffer	1 M 6-Aminocapronsäure; 100 mM BisTris-HCl pH 7,0; 100 mM NaCl; 20% Glycerin; 0,1% Coomassie Brilliantblau 250 G

Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10 x TBE-Puffer	0,9 M Tris/HCl; 0,9 M Borsäure; 10 mM EDTA
RNA-Gelpuffer	20% Acrylamid; 8,3 M Harnstoff in 1 x TBE Puffer
5 x RNA-Ladepuffer	10 ml Formamid; 10 mg Xylencyanol; 10 mg Bromphenolblau; 200 µl 0,5 M EDTA

Proteinreinigungspuffer

Amylose-Säulenpuffer	20 mM Tris/HCl; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,4
Amylose-Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM Maltose; pH 7,4
Ionenaustausch-Säulenpuffer	50 mM HEPES, 25 mM NaCl; pH 7,6
Ionenaustausch-Elutionspuffer	50 mM HEPES, 1 M NaCl; pH 7,6
Größenausschlusschpuffer	50 mM HEPES, 400 mM NaCl; pH 7,6

Northern Blot Puffer

20 x Probenpuffer	0,8% Bromphenolblau; 0,8% Xylencyanol; 50% Glycerin ad. 4 ml mit ddH ₂ O
-------------------	--

10 x MOPS-Puffer	200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA ad. 1 l ddH ₂ O; pH 7,0
20 x PIPES	100 mM PIPES (pH 6,8); 3 M NaCl; 100 mM EDTA
50 x Denhardt's	1% Ficoll; 1% Polyvinylpyrrolidin; 1% BSA
20 x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumacetat ad. 1 l mit ddH ₂ O; pH 7,0
RNA-Laufpuffer	5 µl ddH ₂ O; 10 µl Formamid; 2 µl Formaldehyd (37 - 40%); 2 µl 10 x MOPS- Puffer; 1 µl 20 x Probenpuffer; 0,1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
Denaturierendes RNA-Agarosegel	160 ml ddH ₂ O; 2,4 g Agarose; 20 ml 10 x MOPS-Puffer; 20 ml Formaldehyd (37 - 40%)
Laufpuffer	1300 ml ddH ₂ O; 160 ml 10 x MOPS-Puffer; 140 ml Formaldehyd (37 - 40%)
Hybridisierungslösung	2,5 ml 20 x PIPES; 200 µl 50 x Denhardt's; 5 ml Formamid; 100 µl 20% SDS; 200 µl 10 mg/ml ssDNA; 1,6 ml ddH ₂ O

2.3 Kits

Kristallisationskits	Jena-Bioscience 1-8, JBS+ und JBS++ Sigma 1-4, „Low Ionic“, „Cryo“
----------------------	---

Molecular Dimensions „Morpheus“

Decalabel DNA Labelling Kit	Fermentas
ExactStart Small RNA cloning Kit	Epicentre Genomics
Gel DNA Recovery Kit	Zymogen
GenJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
Phusion Master Mix with GC Buffer	New England Biolabs

2.4 Säulen

HiLoad 16/60 Superdex S200	GE Lifescience, USA
HiTrap-Desalting (5 ml)	GE Lifescience, USA
MBP-Trap (5 ml)	GE Lifescience, USA
MonoS 5/50 GL	GE Lifescience, USA
Superdex S200 5/150	GE Lifescience, USA

2.5 Enzyme**2.5.1 Restriktionsenzyme**

Ascl	New England Biolabs
DpnI	New England Biolabs
HindIII	Fermentas
NotI	Fermentas
NotI-HF	New England Biolabs
XbaI	Fermentas

2.5.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase (aus dem Kalb, CIP)	New England Biolabs
Faktor Xa	New England Biolabs
Polynukleotidkinase	Fermentas
RNase T ₁	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas

2.6 Antikörper

2.6.1 Erstantikörper

Kaninchen-anti-BDVM	polyklonal	K. Tomonaga, Osaka, Japan
Kaninchen-anti-BDVN	polyklonal	Dauids Biotechnologie
Maus-anti- β -Tubulin	monoklonal	Sigma

2.6.2 Zweitantikörper

Indocarbocyanin-Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Jackson ImmuoResearch
Carbocyanin-Ziege-anti-Maus-IgG	Jackson ImmuoResearch

2.7 Lipide

Polarer Gehirnextrakt aus dem Schwein	Avanti Polar Lipids
---------------------------------------	---------------------

2.8 Radioaktiv markierte Nukleotide

α - [³² P]-dCTP, 3000 Ci/mmol	Perkin Elmer
γ - [³² P]-ATP, 6000 Ci/mmol	Perkin Elmer

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 Mutageneseprimer

BDVM H112W

vorwärts 5' aag gaa cag agc aag **tgg** gca att aat gca gc 3'
 rückwärts 5' gc tgc att aat tgc **cca** ctt gct ctg ttc ctt g 3'

BDVM F37A

vorwärts 5' cgg aac cag **gct** ctt aac atc cca ttt c 3'
 rückwärts 5' gat gtt aag **agc** ctg gtt ccg tga agt c 3'

BDVM I58T

vorwärts 5' gag aaa aag ttg **agc** gac tac ttc act att g 3'
 rückwärts 5' agt gaa gta gtc **gct** caa ctt ttt ctc gcg tg 3'

BDVM R34A

vorwärts 5' ggg act tca **gcg** aac cag ttt ctt aac 3'
 rückwärts 5' aa ctg gtt **cgc** tga agt ccc tcc tac 3'

BDVM R53A

vorwärts 5' cag ctt cca **gcc** gag aaa aag ttg acc 3'
 rückwärts 5' ctt ttt ctc **ggc** tgg aag ctg cag agg 3'

BDVM D95N

vorwärts 5' gtg tac aaa **aac** ccg att aga aaa tac 3'
 rückwärts 5' tct aat cgg **gtt** ttt gta cac gga cag 3'

2.9.2 Sequenzierprimer

MalE

vorwärts 5' ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc 3'

2.9.3 RNA-Größenstandard

Als Größenstandard wurden synthetische RNAs (Metabion, Deutschland) mit folgenden Sequenzen verwendet:

10-mer: 5'-ggcugguuga-3'
 15-mer: 5'-aguggcugguugaga-3'
 20-mer: 5'-agcaguggcugguugagauu-3'

2.10 Vektoren

pMal-c2x	New England Biolabs
pCAGGS	Addgene
pBS KS II(+)	Stratagene

2.11 Bakterienzellen

Für die Klonierung aller Varianten von BDVM wurde der chemokompetente *E. coli*-Stamm XL1-Blue bzw. Top10 verwendet. Die Expression fand in den ebenfalls chemokompetenten *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) bzw. BL21(DE3) Gold statt.

E. coli, Stamm XL1-Blue
 Stratagene
 endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q
 Δ (lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

E. coli, Stamm Top10
 Invitrogen
 F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1
 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ ⁻

E. coli, Stamm BL21 (DE3)
 Pharmacia Biotech
 F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1
 sam7 nin5])

E. coli, Stamm BL21 (DE3) Gold

Stratagene

F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) endA Hte

2.12 Eukaryotische Zellen

Oligoglioblastoma-Zellen

ATTC Nummer: CRL-2611, Organismus *Homo sapiens* (Mensch),

Gewebe: Gehirn

permanente epitheliale humane Gehirnzellen, isoliert aus einem Glioblastom des rechten vorderen parieto okzipitalen Kortex

Vero-Zellen

ATTC Nummer: CCL-81, Organismus *Cercopithecus aethiops* (Grüne Meerkatze), Gewebe: Niere

interferondefiziente, permanente epitheliale Affennierenzellen

2.13 Viren

rBDV-L_{RD}

rekombinant hergestelltes BDV (Stamm He/80) mit zwei Mutationen in der Polymerase L (L1116R und N1398D) (Ackermann *et al.* 2007)

2.14 Geräte

Äkta FPLC

GE Healthcare, USA

Kühlzentrifugen

Avanti J-20, J25 und J-30i,

Beckmann

Mikroskop

KL1500 LCD 10447158, Leica

PCR Cycler

Mastercycler gradient,

Eppendorf

Pipettierroboter	Cartesian Dispensing System, Genomic Solutions
Röntgengenerator mit	Rigaku MSC
a) Detektor	R-AXIS IV ⁺⁺ , Saturn 944+, Rigaku MSC
b) Kryostrom	RA Micro007 XSTREAM2000, Rigaku MSC
Waagen	BP4100STE3102S, Sartorius Analytical plus, Ohaus
Thermoschüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf
UV/VIS Spektrophotometer	Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences
Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus

2.14.1 Geräte für die Zellkultur

Flowbox	Heraeus, LaminAir HR 2448
Inkubator	Heraeus, Heraeus 6000
Kühlschrank	Liebherr, 500I
Mikroskop	Leitz, Labovert FS
Nanodrop	NanoDrop, ND1000
Sonifiziergerät	Brandson, Sonifier 250
Vakuumpumpe	Bachofer, Vacumat100
Vortexer	Janke / Kunkel, Vibrofix VF1
Wasserbad	GFL, GFL1012
Zentrifuge	Eppendorf, 5415R

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung der Expressionsplasmide

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten von BDVM durch ortsgerechte Mutagenese hergestellt. Der dafür verwendete Ausgangsvektor pMal-c2x-BDVM wurde von Ina Kraus während ihrer Dissertation angefertigt und weiterverwendet (Kraus 2002).

Ortsgerichtete Mutagenese

Die verschiedenen BDVM-Varianten wurden nach der „*QuickChange Site Directed Mutagenesis*“-Methode hergestellt (Weiner *et al.* 1994). Diese Methode erlaubt das gezielte Einfügen von Punktmutationen in das Produkt einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei werden für die Amplifikation Primer (2.9.1) verwendet, die bereits die gewünschte Mutation enthalten. Im Anschluss wird das Ausgangsplasmid mit Hilfe von *DpnI* verdaut und das PCR-Produkt in chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Die PCR wurde mit Hilfe des Phusion-Kits (NEB) ausgeführt. Jeder Reaktionsansatz enthielt etwa 10 ng Plasmid-DNA, je 0,5 µM Primer, 0,2 mM dNTP sowie 0,4 U *Phusion* DNA-Polymerase, aufgefüllt auf 50 µl des zugehörigen Reaktionspuffers. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit	
98 °C	30 s	
98 °C	10 s	} x 35
55 – 65 °C	30 s	
72 °C	3 min 30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	unendlich	

Anschließend erfolgte der Verdau des Ausgangsplasmids durch die Zugabe von 20 U *DpnI* in den Reaktionsansatz und Inkubation für 2 h bei 37 °C. Der gesamte Reaktionsansatz wurde in chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung verschiedener BDVM-Varianten wurden die unter 2.9.1 genannten Primer für eine ortsgerichtete Mutagenese auf Basis des Konstrukts pMAL-c2x-BDVM (Abbildung 11) verwendet, welches von Ina Kraus im Laufe ihrer Dissertation hergestellt wurde (Kraus 2002). Dabei liegt das Gen für BDVM als C-terminale Fusion an das Maltose-Bindungsprotein (MBP) vor. Die beiden Proteine sind über eine kurze Aminosäuresequenz, die eine Schnittstelle für Faktor Xa enthält, miteinander verbunden. Bei MBP handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42,5 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5,2. Es besitzt die Fähigkeit, an Maltose und mit niedrigerer Affinität an Amylose zu binden. Für MBP als Fusionsprotein mit BDVM ergibt sich ein Molekulargewicht von 59 kDa. BDVM hat seinerseits ein Molekulargewicht von 16,2 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 9,2.

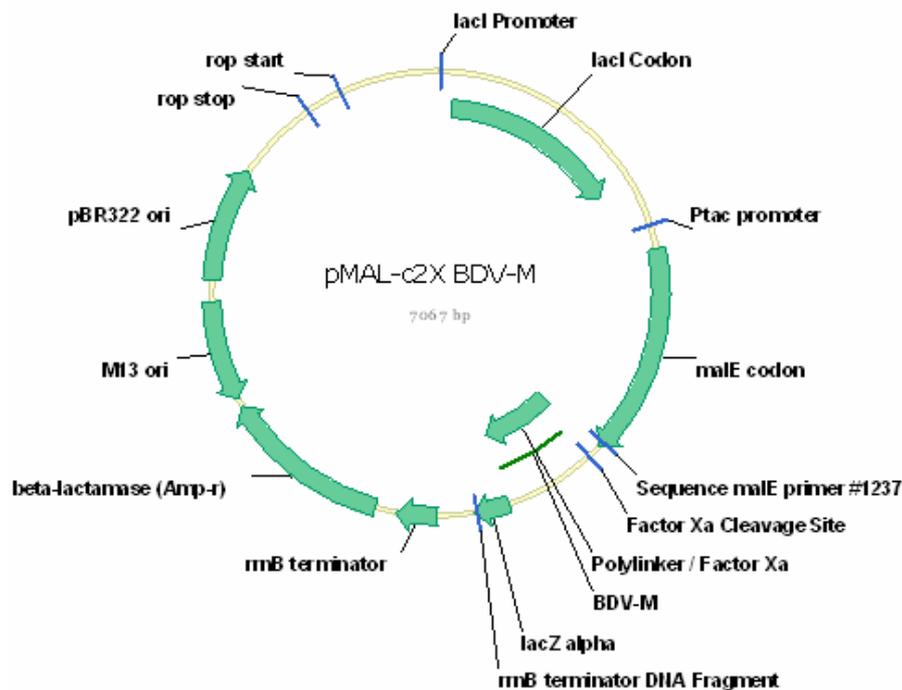


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pMal-c2x für die Expression des MBP-BDVM-Fusionsproteins.

Der dargestellte Vektor enthält einen Replikationsursprung und ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Darüber hinaus enthält er die Gene für das Fusionsprotein, bestehend aus MBP und BDVM, die über eine kurze Aminosäuresequenz mit einer Faktor Xa Schnittstelle, miteinander verbunden sind. Das Zielgen steht unter der Kontrolle des *lacZ*-Operons, so dass sich dessen Expression durch Zugabe von IPTG induzieren lässt.

Tabelle 1: Übersicht über das Herstellungsverfahren der verschiedenen BDVM-Varianten.

Zur Herstellung der verschiedenen Varianten (Spalte 1) ist in der zweiten Spalte die Bezeichnung des verwendeten Ausgangsplasmids genannt. In der dritten Spalte sind die verwendeten Mutagenese-Primer und schließlich die während der PCR verwendete Anlagerungstemperatur angegeben.

Variante	Ausgangs-Plasmid	Mutagenese-Primer	Anlagerungs-temperatur
BDVM H112W	pMal-c2x wt	H112W fwd/rev	65 °C
BDVM F37A	pMal-c2x wt	F37A fwd/rev	60 °C
BDVM R34A	pMal-c2x wt	R34A fwd/rev	60 °C
BDVM R53A	pMal-c2x wt	R53A fwd/rev	60 °C
BDVM R34/53A	pMal-c2x R34A	R53A fwd/rev	60 °C
BDVM H112W R34/53A	pMal-c2x R34/53A	H112W fwd/rev	60 °C
BDVM H112W R34/53A D95N	pMal-c2x H112W R34/53A	D95N fwd/rev	57 °C

Nach erfolgreicher ortsgerichteter Mutagenese wurden alle in Tabelle 1 aufgeführten Konstrukte in chemokompetente *E. coli*-Zellen übertragen. Diese wurden für die Durchführung der Testexpressionen im 50 ml Maßstab verwendet (3.2.3).

3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in chemokompetente Bakterien

Plasmid-DNA, die entweder für die Sequenzierung oder als Ausgangsmaterial für eine ortsgerichtete Mutagenese dienen sollte, wurde in die *E. coli*-Stämme XL1-Blue bzw. Top10 (2.11) transformiert. Für die Expression des rekombinanten Gens wurde das entsprechende Plasmid in die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) bzw. BL21 (DE3) Gold (2.11) transformiert.

200 µl der jeweiligen chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 µl Plasmid-DNA (0,1 µg/µl) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C ausgesetzt und danach für weitere 90 s auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen wurden 100 µl des Ansatzes auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Im Fall einer ortsgerichteten Mutagenese wurden nach der 60-minütigen Inkubation die Zellen bei 5000 x g für 5 min pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl frischem SOC-Medium aufgenommen. Anschließend wurden diese 100 µl auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente Bakterien

Für Plasmid-DNA, die in geringen Mengen vorliegt, eignet sich die Methode der Elektrotransformation wegen der höheren erzielten Ausbeute an transformierten Zellen besser. 40 µl der jeweiligen elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und 100 pg der Plasmid-DNA zugegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω, 25 µF und 2,2 kV. Direkt danach wurden 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Von dieser Suspension wurden 100 µl auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *GenJETTM Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) nach Herstellerangaben aus den verschiedenen *E. coli*-Stämmen isoliert. Eine Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37 °C in 4 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin inkubiert und dann bei 16 000 x g für 5 min abzentrifugiert. Nach alkalischer Lyse der Zellen wurde die Plasmid-DNA an der Silikatmatrix der Säulen unter hoher Salzkonzentration gebunden, gewaschen und anschließend mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

3.1.5 DNA-Sequenzierung

Um zu erfahren, ob Plasmide die gewünschte Sequenz enthalten und zur Überprüfung einer ortsgerichteten Mutagenese, wurde Plasmid-DNA an die Firma GATC-Biotech (Konstanz) zur Sequenzierung gesendet. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde dafür in 30 µl ddH₂O mit einer Konzentration von 30-100 ng/µl aufgenommen. GATC-Biotech führte eine PCR mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden nach

der Kettenabbruchmethode durch (Sanger *et al.* 1977). Für die Sequenzierungsreaktion wurde der unter 2.9.2 genannte Primer verwendet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Einzelkolonie der entsprechenden Zelllinie wurde in 5 ml LB-Medium für 12 h bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ kultiviert und durch fünfminütige Zentrifugation mit 5000 x g bei 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit eiskalter $CaCl_2$ -Lösung gewaschen, zentrifugiert und dann in eiskalter $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Der Ansatz wurde für 2 h auf Eis inkubiert, im Verhältnis 1:1 mit Glycerin (50%, w/w) gemischt und aliquotiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Einzelkolonie der entsprechenden Zelllinie wurde in 5 ml SOC-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für 12 h bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 100 ml SOC-Medium (mit Antibiotikum) aufgenommen und bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ kultiviert und durch 30-minütige Zentrifugation mit 5000 x g bei 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde in kaltem Waschpuffer gelöst und durch erneute 30-minütige Zentrifugation mit 5000 x g bei 4 °C pelletiert. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in 10% Glycerin resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Proteinexpression

Für neue Proteinkonstrukte und Varianten wurde zunächst eine Testexpression im 50 ml Maßstab durchgeführt. Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml SOC-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für 12 h bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde anschließend das Medium 1%ig zusammen mit Ampicillin (0,1 mg/ml)

angeimpft und bei 37 °C im Schüttelkolben bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ kultiviert. Die Expression der Zielproteine wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach der Induktion wurden die Zellen für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Ab dem Zeitpunkt der Induktion wurde stündlich eine Probe genommen, um die Expression des Zielproteins auf einer SDS-PAGE analysieren zu können. Nach 4 h wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C und 8000 x g pelletiert und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Größere Proteinmengen wurden unter den gleichen Bedingungen im 5 l Schüttelkolben mit 1,5 l LB-Medium hergestellt. Das Medium wurde mit Ampicillin (0,1 mg/ml) und der Vorkultur (1%ig) angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion mittels 1 mM IPTG und eine weitere Inkubation für 4 h bei 37 °C. Die Zellen wurden für 30 min bei 4 °C und 5000 x g pelletiert und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

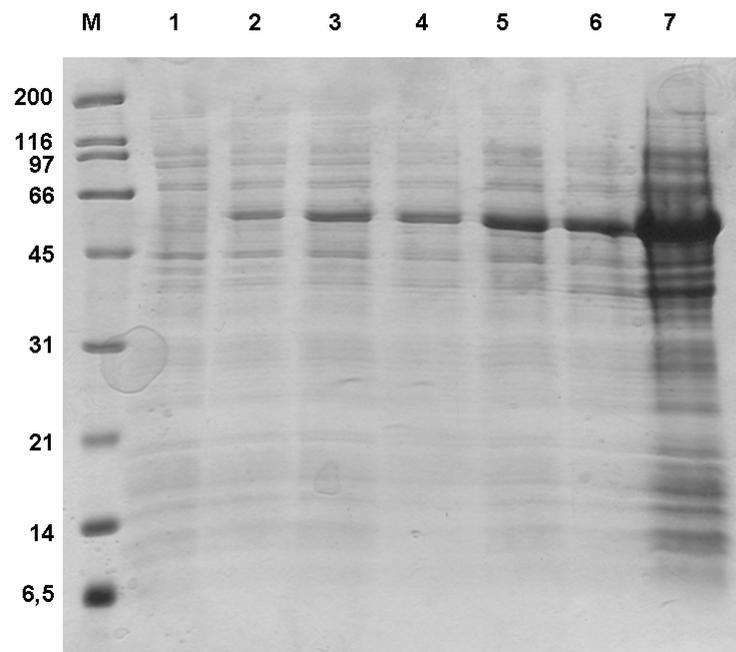


Abbildung 12: Testexpression von BDVM wt in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Expression von BDVM wt in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen auf einem 15%igen SDS-Gel. Dabei ist mit M der Marker mit seinen Banden in kDa angegeben. Spur 1 zeigt die lösliche Proteinexpression vor Induktion und die Spuren 2 bis 6 die lösliche Proteinexpression nach 1, 2, 3, 4 und 5 h. Spur 7 zeigt die unlösliche Proteinexpression. Bereits 1 h nach Zugabe von IPTG ist eine neue Proteinbande zwischen 45 und 66 kDa zu erkennen, was der Größe des Fusionsproteins aus MBP und BDVM entspricht.

In Abbildung 12 ist beispielhaft der Expressionsverlauf von BDVM *wt* dargestellt. Das Fusionsprotein wird bereits nach einer Stunde exprimiert. Die Rate der Expression dieser Bande zwischen 45 und 66 kDa nimmt im zeitlichen Verlauf bis hin zu 4 h nach der Induktion kontinuierlich zu und bleibt dann in etwa gleich. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich für alle vorliegenden BDVM-Varianten, so dass an dieser Stelle stellvertretend nur das Ergebnis für BDVM *wt* wiedergegeben wird. Ein ebenfalls ähnliches Ergebnis wurde für die Expression aller BDVM-Varianten im 5 l Maßstab erzielt, so dass auch hier auf eine bildliche Darstellung verzichtet wird. Im 5 l Maßstab wurden als Ausbeute Biofeuchtmasse zwischen 3 und 4 g pro l Expressionsmedium erzielt.

3.2.4 Zellaufschluss

Die Proben aus der Testexpression wurden in 350 µl Amylose-Säulenpuffer resuspendiert und mittels Ultraschall (Zyklus 0,5; Amplitude 50%; 15 s) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen löslichen Proteinen wurde auf einer SDS-PAGE aufgetragen und analysiert. Das verbleibende Pellet wurde verworfen.

Das Zellpellet aus der Großexpression wurde aufgetaut, mit einer Tablette *Complete Protease Inhibitor Mix* (Roche) versetzt und mit Amylose-Säulenpuffer auf 40 ml aufgefüllt und resuspendiert. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall in zwei Zyklen mit jeweils 600 s (15 W pro Puls; je 1,5 s Puls/Pause) auf Eis aufgeschlossen. Die Trennung der löslichen Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 14 °C und 8000 x g. Der Überstand wurde für die weitere Proteinreinigung verwendet.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um den Verlauf einer Testexpression zu verfolgen bzw. zum Nachweis und zur Reinheitskontrolle von Proteinen, wurden diese auf ein reduzierendes SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Hierbei ist das Laufverhalten der Proteine abhängig von deren Form, Ladung und Größe. Um eine konstante Form zu erreichen, wurden die Proteine unter Zugabe von 2-Mercaptoethanol für 5 min bei 95 °C denaturiert. Dadurch lösen sich die Sekundär- und Tertiärstrukturen des Proteins auf. Ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis wird durch die zum Molekulargewicht des Proteins proportionale Bindung von Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Polypeptidkette erreicht. Dieses maskiert die Ladung des Proteins, so dass alle Proteine eine stark negative Ladung aufweisen, die in etwa proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Dadurch können die Komplexe aus SDS und denaturiertem Protein im elektrischen Feld getrennt werden.

Die Proteinproben wurden mit 3x Probenpuffer gemischt und anschließend bei 95 °C für 5 min denaturiert. Ein auf die gleiche Weise behandelter Größenstandard wurde zur Abschätzung des Molekulargewichts auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Proteinproben bei 25 mA für etwa 75 min in einem 6%igen Polyacrylamid-Sammelgel und einem 15%igen Polyacrylamid-Trenngel aufgetrennt (nach Laemmli 1970). Die Färbung der Gele erfolgte nach Fairbanks *et al.* (1971).

3.3.2 Blue Native PAGE

Bei der Blue Native PAGE handelt es sich um eine Abwandlung der nativen PAGE. Bei dieser werden gefaltete, also native Proteine im elektrischen Feld durch das Molekularsieb des Polyacrylamidgels aufgetrennt. Um gleichzeitig basische und saure Proteine auftrennen zu können und um eine Abschätzung des relativen Molekulargewichts zu ermöglichen, werden bei der Blue Native PAGE die Ladungen der Proteine durch Anlagerung des negativ geladenen Farbstoffs Coomassie Brilliantblau 250 G überdeckt. Dennoch erfolgt die Auftrennung der Proteine im Wesentlichen nach ihrer Größe und nicht nach ihrer Ladung (Wittig *et al.* 2006).

Pro Bande wurden 10 µg Protein mit einem Volumen 2x BN-Ladepuffer vermischt. Die Taschen des 4- bis 16-%igen Gradientengels (Serva) wurden mit Kathodenpuffer gespült und dann die gesamte Probe aufgetragen. Als Größenstandard wurde der SERVA Native Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 10 min bei konstanten 50 V und dann für weitere 120 min bei konstanten 200 V. Die Färbung der Gele erfolgte nach Nesterenko *et al.* (1994).

3.3.3 Analytische Ultrazentrifugation von Proteinen

An Hand des Sedimentationsgleichgewichts kann mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation (UZ) das Molekulargewicht und damit auch der Oligomerisierungszustand eines Proteins unabhängig von dessen Form bestimmt werden. Die analytische Ultrazentrifugation wurde freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie (Universität Halle) durchgeführt. Sedimentationsgleichgewichtsläufe werden bei niedrigeren Drehzahlen durchgeführt. Es wird das Sedimentationsgleichgewicht analysiert, welches sich durch das Wirken von Sedimentation und Diffusion einstellt (Formel 1). Für eine ideale Lösung einer einheitlichen Proteinpopulation gilt die Boltzmann-Verteilung:

$$c(r) = c(r_0) \cdot \exp \frac{M(1 - \bar{v} \cdot \rho) \cdot \omega^2 \cdot (r^2 - r_0^2)}{2 \cdot R \cdot T}$$

Formel 1: Proteinkonzentrationen in der UZ-Küvette nach Einstellung des Gleichgewichtes.

$c(r)$ bzw. $c(r_0)$: Makromolekül-Konzentration an der Position r bzw. der festen Position r_0 ; R : Gaskonstante).

$$c_{ges}(r) = \sum c_i(r)$$

Formel 2: Formel zur Least-Squares-Anpassung.

Mischungen von Makromolekülen liefern die Summe der Boltzmannverteilungen der einzelnen Spezies i .

Bei einer Mischung von Proteinen unterschiedlicher Größe lassen sich diese als die Summe der Boltzmann-Verteilungen der einzelnen Spezies i (Formel 2) beschreiben. Somit sind Sedimentationsgleichgewichtsmessungen gut zur Analyse von Proteinassoziationen geeignet. Die Ultrazentrifugationsmessungen wurden bei 6 °C mit der analytischen Ultrazentrifuge Optima XL A (Beckmann Coulter)

durchgeführt. Die Proteine wurden vor der Messung für 20 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Messung der Oligomerisierungszustände erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,5 mg/ml. Die Ermittlung des Sedimentationskoeffizienten wurde bei 40000 rpm durchgeführt. Die Messung erfolgte in 50 mM HEPES, 150 mM NaCl bei pH 7,6.

3.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.3.4.1 nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der unspezifischen Bindung von Coomassie Brilliant Blau an kationische und hydrophobe Seitenketten eines Proteins (Bradford 1976). In saurem Medium kommt es durch diese Komplexbildung zur Blaufärbung des Farbstoffes, der seine maximale Absorption bei 595 nm hat. Um die Konzentration der Proteinlösung bestimmen zu können, wurde zuvor eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich 0,1 bis 1,0 mg/ml aufgenommen. 100 µl der Proteinlösung wurden mit 5 ml der 1:5 verdünnten *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* (BioRad) vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Konzentration an Hand der ermittelten Kalibriergeraden bestimmt.

3.3.4.2 an Hand der ultravioletten Absorption von aromatischen Aminosäuren

Die delokalisierten π -Elektronen der aromatischen Aminosäureseitenketten Tryptophan und Tyrosin zeigen eine starke Absorption des Lichtes bei einer Wellenlänge von 280 nm. Zusätzlich zu diesen beiden Aminosäuren absorbieren auch Disulfidbrücken das Licht bei dieser Wellenlänge. An Hand des Gehalts der in Tabelle 2 genannten Aminosäuren im Protein lässt sich der für das jeweilige Protein spezifische molare Extinktionskoeffizient ϵ berechnen (Wetlaufer 1962). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass auch Nukleinsäuren in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Ihr Absorptionsmaximum liegt jedoch bei 260 nm.

Deshalb gilt ein Protein als frei von Kontamination mit Nucleinsäuren, wenn das

Verhältnis $\frac{A_{280}}{A_{260}} \geq 1,75$ ist.

Tabelle 2: Molare Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und von Disulfidbrücken bei 280 nm.

Aminosäureseitenketten	molarer Extinktionskoeffizient
Tryptophan	5500 M ⁻¹ cm ⁻¹
Tyrosin	1490 M ⁻¹ cm ⁻¹
Cystin (Disulfidbrücke)	125 M ⁻¹ cm ⁻¹

Tabelle 3: Übersicht der molaren Extinktionskoeffizienten ϵ der jeweiligen BDVM-Varianten bei 280 nm.

Proteinvariante	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm
MBP-BDVM	80790 M ⁻¹ cm ⁻¹
BDVM, F37A, R34A, R53A, R34/53A	14440 M ⁻¹ cm ⁻¹
BDVM H112W	19940 M ⁻¹ cm ⁻¹
BDVM H112W R34A	19940 M ⁻¹ cm ⁻¹
BDVM H112W R53A	19940 M ⁻¹ cm ⁻¹
BDVM H112W R34/53A	19940 M ⁻¹ cm ⁻¹
BDVM H112W R34/53A D95N	19940 M ⁻¹ cm ⁻¹

Mit Hilfe des berechneten molaren Extinktionskoeffizienten und der gemessenen Absorption bei 280 nm lässt sich die Proteinkonzentration mit folgender Gleichung berechnen:

$$E = c * d * \epsilon$$

Formel 3: Lambert-Beersches Gesetz zur Bestimmung der Proteinkonzentration an Hand des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ .

Die Extinktion E wird in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration c, der Küvettschichtdicke d und des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ bestimmt.

Die Formel 3 gilt aber nur für vollständig gelöste Proteine. Denn mit steigender Konzentration der Probe nimmt der Streulichtanteil zu, welcher die Messgenauigkeit beeinflusst.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden verwendet: der Bradford-Test (3.3.4.1), wie er auch von Kraus *et al.* (Kraus *et al.* 2002) und Neumann *et al.* (Neumann *et al.* 2009) verwendet wurde, und die Bestimmung der Proteinkonzentration an Hand der Absorption bei 280 nm (3.3.4.2). Beide Methoden zeigten ein deutlich unterschiedliches Ergebnis für die gleiche Proteinprobe. Dabei wies die Methode nach Bradford eine geringere Konzentration auf, als die mittels UV-Licht. Dies basiert darauf, dass die Reaktion nach Bradford in Gegenwart von RNA (> 0,3 mg/ml) gestört wird. Darüber hinaus wurde für die Erstellung der Eichgerade BSA verwendet, so dass es hierdurch zu einer Verfälschung der tatsächlichen Proteinkonzentration kommt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm wird ebenfalls durch Nukleinsäuren gestört, dem wird aber durch den Korrekturfaktor nach Warburg & Christian Rechnung getragen (Warburg & Christian 1941). Da sich die Ergebnisse dieser Methode mehr mit einer dritten Methode, der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry *et al.* 1951) (Daten nicht gezeigt) deckten, wurde im folgenden diese Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

3.3.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Konzentratoren verschiedener Volumina mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet. Diese Konzentratoren funktionieren wie ein Filter, der Moleküle ab einem bestimmten Molekulargewicht an seiner Membran zurückhält, wohingegen Moleküle unterhalb dieser Grenze den Filter passieren können. Die treibende Kraft, die die Moleküle dabei in Richtung Filter bewegt, ist in diesem Fall die Zentrifugalbeschleunigung. Dadurch werden das Lösungsmittel und alle darin enthaltenen niedermolekularen Verbindungen filtriert, während die Moleküle oberhalb der Ausschlussgrenze zurückgehalten werden. Auf diese Weise kommt es zu einer Konzentrierung der Proteinlösung.

Vor Gebrauch wurden die Konzentratoren mit destilliertem Wasser gespült und anschließend in dem jeweiligen Puffer äquilibriert. Die Proteinproben wurden im Konzentrator bei 4750 x g und 20 °C zentrifugiert, bis das gewünschte Endvolumen erreicht wurde. Während der Zentrifugation wurde die Probe immer wieder

durchmischt, um die Ausbildung eines Proteinkonzentrationsgradienten innerhalb des Konzentrators zu verhindern.

3.4 Reinigung exprimierter BDVM-Varianten

3.4.1 Affinitätschromatographie

Der vorliegende Ausgangsvektor pMal-c2x-BDVM (2.10) enthält neben dem Gen für BDVM auch das Gen für malE, das Maltose-Bindungsprotein (MBP). Dieses ist N-terminal an das Zielprotein, BDVM, fusioniert. Durch eine Deletion der malE-Signalsequenz wird verhindert, dass das Fusionsprotein in das Periplasma transportiert wird. Stattdessen wird es als lösliches Protein im Cytoplasma exprimiert. Das N-terminal angehängte MBP erlaubt die Reinigung mit Hilfe der Affinitätschromatographie. Als Matrix dient dabei Dextrin-Sepharose, an welche das MBP spezifisch bindet und so gereinigt werden kann. Das gebundene Fusionsprotein kann dann mit Hilfe eines Maltose-haltigen Puffers eluiert werden, da die Affinität des MBP zu Maltose höher ist als zur verwendeten Säulenmatrix.

Für die Affinitätschromatographie wurden die unter 2.2.4 angegebenen Amylose-Säulenpuffer verwendet. Als Säulen kamen 5 ml MBP-Trap-Säulen (2.4) zum Einsatz. Nach dem Binden des MPB-Fusionsproteins aus dem *E. coli* Lysat an die Säule wurde diese mit 20 Säulenvolumen (entspricht 100 ml) Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Die Elution des spezifisch gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit Amylose-Elutionspuffer über zwei Säulenvolumen. Zur Überprüfung der Reinigung wurden sowohl vom Zelllysat, vom Durchfluss, vom Waschschrift als auch von der Elutionsfraktion Proben genommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

3.4.2 Spaltung des Fusionsproteins mittels Faktor Xa

In dem verwendeten pMal-c2x-BDVM-Vektor befindet sich 3'-ständig zum MBP eine spezifische Erkennungssequenz für die Serinprotease Faktor Xa (E.C. 3.4.21.6), mit der sich das Fusionsprotein gezielt spalten lässt. Für die Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa wurden pro mg gereinigtem Fusionsprotein 2 µg Faktor Xa eingesetzt und für 16 h bei RT inkubiert.

3.4.3 Pufferaustausch mittels HiTrap-Desalting-Säulen

Nach der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins sollte der verwendete Amylose-Elutionspuffer gegen einen Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration getauscht werden. Dafür wurden HiTrap-Desalting-Säulen (2.4) verwendet. Dabei handelt es sich im Prinzip um kleine Gelfiltrationssäulen mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa. Dadurch laufen nahezu alle Proteine im Ausschlussvolumen der Säule, wohingegen die Salz- und Pufferionen auf Grund ihres geringeren Molekulargewichts in die Gelmatrix eindringen und so abgetrennt werden können. Es wurden zwei 5 ml HiTrap-Desalting-Säulen verwendet, welche zunächst mit fünf Säulenvolumen Ionenaustausch-Säulenpuffer gespült wurden. Dann wurden 2 ml des gespaltenen Fusionsproteins (3.4.2.) aufgetragen und die Proteinfractionen gesammelt und vereinigt.

3.4.4 Kationenaustausch-Chromatographie

Um das MBP und den Faktor Xa von BDVM abzutrennen, wurde anschließend eine Kationenaustausch-Chromatographie verwendet. Da das BDVM bei pH 7,6 stark positiv geladen ist, bindet es an die negative geladene Säulenmatrix, während das MBP und der Faktor Xa negativ geladen sind und sich somit im Durchfluss befinden. Die Säule wurde zunächst mit den vereinigten Fraktionen aus 3.4.3 beladen und dann mit fünf Säulenvolumen Ionenaustausch-Säulenpuffer gewaschen. Anschließend wurde das spezifisch gebundene Protein durch einen kontinuierlichen Gradienten von 0 auf 100% Ionenaustausch-Elutionspuffer über 20 Säulenvolumen eluiert. Die Fraktionen, die BDVM enthielten, wurden aufgefangen und anschließend vereinigt.

3.4.5 Größenausschluss-Chromatographie

Da BDVM in verschiedenen Oligomerisierungszuständen vorliegen kann, folgte als abschließender Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie (Neumann *et al.* 2009). Diese basiert darauf, dass Proteine unterschiedlicher Größe verschieden stark in das poröse Säulenmaterial eindringen können und damit eine unterschiedliche Wegstrecke zurücklegen. Große Proteine können nur wenig in das

Säulenmaterial eindringen und werden somit als erstes eluiert. Auf Grund dieser Eigenschaften kann die Größenausschlusschromatographie auch zur Ermittlung des Molekulargewichts einer reinen, möglichst monodispersen Proteinlösung verwendet werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Auftrennung der Proteine nicht nur an Hand der Größe sondern auch auf Grund der Form erfolgt, wobei in der Theorie von ideal kugelförmigen Proteinen ausgegangen wird. Die Elutionsfraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie wurden vereinigt, auf ein Gesamtvolumen von 3 ml konzentriert und dann unter Verwendung einer HiLoad 16/60 Superdex S200 Säule gereinigt. Als Puffer wurde hierfür ein Gemisch aus 60% Ionenaustausch-Säulenpuffer und 40% Ionenaustausch-Elutionspuffer verwendet. Die einzelnen Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie wurden getrennt weiterverwendet.

Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts wurde eine HiLoad Superdex S200 5/150 Säule verwendet, die zunächst mit Hilfe verschiedener monodisperser Proteinlösungen bekannter Größe und Form kalibriert wurde. Dazu wurden jeweils 15 µl einer 4 mg/ml Lösung über einen 50 µl Loop mit einem Fluss von 0,3 ml/min injiziert. Der verwendete Puffer war dabei der gleiche wie zuvor beschrieben. An Hand der ermittelten Kalibriergeraden wurde dann das relative Molekulargewicht der verschiedenen BDVM-Varianten ermittelt.

3.5 Untersuchung der Protein-Lipid-Interaktion an Lipidmonoschichten

Die Wechselwirkungen zwischen BDVM und Lipiden lassen sich beispielhaft an einer Lipidmonoschicht messen, indem der Oberflächendruck dieser bestimmt wird (Maget-Dana 1999). Dadurch kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob das Protein mit den Lipiden interagiert. Ein auf 20 °C gekühlter Langmuir-Trog wurde mit 10 ml Puffer (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,6) befüllt und so lange äquilibriert, bis er die Ausgangstemperatur von 20 °C erreicht hatte. Danach wurden tröpfchenweise die in Chloroform gelösten Lipide auf der Pufferoberfläche ausgespreizt bis der gewünschte Startdruck erreicht wurde. Bis zur Äquilibrierung der Lipidmonoschicht wurde der Trog unter einer wassergekühlten Plexiglashaube belassen, um Verdunstung zu minimieren. Nach etwa 30 min wurde die Proteinprobe

in die wässrige Subphase injiziert, ohne dabei den Lipidfilm zu stören. Der Zeitpunkt der Injektion wurde notiert und der Druckverlauf der Lipidmonoschicht über mehrere Stunden verfolgt.

3.6 Nukleinsäureisolierung

Um die an BDVM gebundenen Nukleinsäuren zu untersuchen, ist es zunächst notwendig, diese zu isolieren. Dabei wird das gereinigte Protein zunächst proteolytisch verdaut und die gebundene Nukleinsäure extrahiert und konzentriert (Lieber 2006).

3.6.1 Enzymatische Proteolyse

Für diesen Zweck wurde die unspezifisch spaltende Proteinase K (E.C. 3.4.21.64) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Endopeptidase, die das Protein in kurze Oligopeptide zerlegt. Zu 100 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von etwa 10 mg/ml wurden 100 µl Proteinase K-Puffer und 20 µl Proteinase K zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 45 min bei 55 °C inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt.

3.6.2 Nukleinsäureextraktion

Um die Nukleinsäuren von Proteinfragmenten abzutrennen wurde die Phenol/Chloroform-Methode gewählt. Dabei gehen die Nukleinsäuren in die wässrige Phase über, während das Protein in der Interphase verbleibt. Zu den 220 µl des Reaktionsansatzes aus 3.6.1 wurden 220 µl Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) zugegeben und für 1-2 min gevortext. Anschließend wurde das Gemisch für 30 min bei 15 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach sind drei Phasen sichtbar. Die unterste Phase ist die organische Phase und besteht aus Phenol und Chloroform. Die Phasengrenze oder auch Interphase enthält das denaturierte Protein bzw. die Proteinfragmente. Die obere, wässrige Phase enthält die Nukleinsäure. Diese wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde sie mit einem Volumenanteil Chloroform extrahiert, um mögliche Phenolrückstände zu

entfernen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 15 000 x g und 4 °C wurde erneut die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt.

3.6.3 Nukleinsäurefällung

Um eine Kontamination mit Phenol, die die nachfolgenden Reaktionen beeinflussen könnte, auszuschließen und eine Konzentrierung der Nukleinsäuren zu erreichen, wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt. Dem Nukleinsäureisolat wurde 1 µl (20 mg/ml) Glykogen als Fällungshilfe und anschließend 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat und drei Volumenanteile absoluter Ethanol zugesetzt und gründlich gevortext. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation bei 15 000 x g für 30 min bei RT präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 50 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Erneut wurde bei 15 000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäurepräparationen mittels UV/VIS

Die aromatischen Basen der Nukleinsäuren absorbieren Licht im UV/VIS-Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Eine Extinktion von eins bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA (ssRNA). Durch eine zusätzliche Bestimmung der Extinktion bei 270 und 280 nm lassen sich Rückschlüsse auf Verunreinigungen mit Phenol bzw. Protein ziehen. Bei $A_{270} > A_{260}$ ist die Probe noch mit Phenolrückständen aus der Fällung verunreinigt. Bei einem Quotienten von $\frac{A_{260}}{A_{280}} > 1,75$ gilt die Probe als frei von Protein.

3.6.5 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Zur Charakterisierung der isolierten RNA ist es notwendig, die verschiedenen RNA-Spezies für die Analyse radioaktiv zu markieren. Zur Markierung der isolierten Nukleinsäuren wurde die Polynukleotidkinase (PNK, E.C. 2.7.1.78) gewählt, da diese sowohl DNA als auch RNA am jeweiligen freien 5'-Ende markieren kann. Ein weiterer

Vorteil der PNK liegt darin, dass sie auch sehr kurze Fragmente als Substrat akzeptiert. Später wurde eine Unterscheidung zwischen DNA und RNA an Hand eines RNA-spezifischen Verdau getroffen.

3.6.5.1 5'-Dephosphorylierung der Nukleinsäure-Isolate

Um eine hohe Ausbeute an markierter Nukleinsäure zu erhalten, ist eine Dephosphorylierung der vorliegenden Nukleinsäure-Isolate mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase aus dem Kalb (CIP, E.C. 3.1.3.1) notwendig. Das entstandene freie 5'-OH-Ende dient der PNK als Substrat. Dafür wurden die Nukleinsäureisolate zunächst folgendermaßen mit der Alkalischen Phosphatase behandelt.

10x CIP-Reaktionspuffer	5 µl
CIP	1 µl
RNasin	0,5 µl
RNA	1,5 µg
ddH ₂ O (RNase frei)	ad. 50 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, um die CIP aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Dazu wurde der Reaktionsansatz im Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und für 1 min gevortext. Anschließend wurde wie unter 3.6.2 und 3.6.3 beschrieben weiter verfahren. Das Nukleinsäurepellet wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.6.5.2 5'-Markierung der Nukleinsäure-Isolate durch die Polynukleotidkinase

Die PNK verknüpft freie 5'-OH-Enden von Ribonukleinsäuren sowie von einzel- und doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren mit dem γ-Phosphat von freiem ATP. Unter Verwendung von γ-[³²P]-ATP kommt es so zur radioaktiven Markierung der Nukleinsäure. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet.

10x PNK-Puffer (Vorwärts-Reaktion)	1 µl
PNK	0,5 µl
ATP (10 mM)	0,5 µl

γ - [³² P]-ATP (6000 Ci/mmol)	0,5 μ l
RNasin	0,5 μ l
RNA (5'-dephosphoryliert)	0,25 μ g
ddH ₂ O (RNase-frei)	ad. 10 μ l

Dieser wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von einem Volumen RNA-Ladepuffer und anschließender Inkubation bei 95 °C für 3 min.

3.6.5.3 RNase T₁-Verdau

Zur Unterscheidung, ob es sich bei den extrahierten Nukleinsäuren um RNA oder DNA handelt, eignet sich ein Verdau mit einer RNA-spezifischen RNase. In dieser Arbeit wurde die RNase T₁ (E.C. 3.1.27.3) gewählt, da diese nicht von dem zugesetzten RNase-Inhibitor RNasin inhibiert wird. Die RNase T₁ spaltet spezifisch einzelsträngige RNA nach Guanin-Basen. Vor Zugabe des RNA-Ladepuffers wurden 4 μ l der PNK-Reaktion aus 3.6.5.2 entnommen und folgendermaßen weiterbehandelt.

PNK-Reaktion	4 μ l (entspricht 0,1 μ g Nukleinsäure)
10x RNase T ₁ -Puffer	0,5 μ l
RNase T ₁	0,5 μ l

Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von einem Volumen RNA-Ladepuffer und Inkubation bei 95 °C für 3 min gestoppt.

3.6.6 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Da Agarosegele für die Auftrennung von kleinen RNA-Fragmenten nicht geeignet sind, wurde zur Analyse der extrahierten RNA auf die denaturierende Harnstoff-PAGE zurückgegriffen. Durch die engmaschigere Beschaffenheit der Matrix können Fragmente im Bereich von 1 bis 50 Basen aufgetrennt werden. Durch

die Zugabe von Harnstoff werden zum einen die Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst und zum zweiten eventuell vorhandene RNasen inaktiviert.

Für die Herstellung eines 20%igen Harnstoff-Polyacrylamid-Gels wurden 30 ml RNA-Gelpuffer mit 20 µl TEMED und 125 µl APS vermischt. Es wurden jeweils 25 ng der 5'-radioaktiv markierten RNA pro Bande aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe wurde ein 5'-radioaktiv markierter synthetischer Größenstandard (10, 15 und 20 nt) sowie Poly-(A)₁₄ aufgetragen. Die Trennung der Nukleotide erfolgte bei 40 W, bis die Lauffront des Bromphenolblaus zu etwa 2/3 durch das Gel gelaufen war. Für die Detektion der radioaktiven Banden wurde ein Phosphorimager Screen über Nacht aufgelegt und am nächsten Tag mit dem Phosphorimager ausgelesen.

3.6.7 Klonierung der extrahierten kleinen RNAs

Um Informationen über die Sequenz der an BDVM gebundenen kleinen RNAs zu erhalten, wurden diese in mehreren Schritten in cDNA umgeschrieben, amplifiziert, in einen Vektor ligiert und anschließend sequenziert. Dafür wurde das Kit *ExactSmall RNA Cloning Kit* (Epicentre Genomics) verwendet. Alle Schritte wurden wie vom Hersteller vorgegeben ausgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde jeweils 1 µg der extrahierten RNAs eingesetzt (3.6).

3.7 Zellkultur

Zur Charakterisierung der einzelnen BDVM-Varianten wurden rekombinante Bornaviren (rBDV), die die entsprechenden Mutationen enthalten, von Dr. A. Martin (AG Schwemmler, Universitätsklinikum Freiburg) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Diese wurden in verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression, Translation, ihres Wachstums und ihrer zellulären Verteilung untersucht. Sämtliche Arbeiten mit diesen Zellen wurden während eines Aufenthalts in den S2 Labors der Arbeitsgruppe Prof. Schwemmler, Universitätsklinikum Freiburg, durchgeführt.

3.7.1 Zellkultivierung

Die Vero- sowie Oligoglioblastoma-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS, 2% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C in wasserdampfgesättigter

Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden bis zum semi-konfluenten Wachstum kultiviert und dann passagiert. Dabei wurden die adhärenenten Zellen nach Abnahme des Mediums mit 10 ml vorgewärmtem PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und dann so lange in 2 ml Trypsin inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes lösten. Die abgelösten Zellen wurden so in vorgewärmtem Medium verdünnt, dass das gewünschte Teilungsverhältnis erreicht wurde und die Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt werden konnten.

3.7.2 Immunofluoreszenzassay

Der indirekte Immunofluoreszenzassay (IFA) wurde verwendet, um virale Proteine zu lokalisieren und die Viruslast infizierter Zellen zu bestimmen. Das Prinzip des IFA basiert darauf, dass Proteine spezifisch mit einem ersten Antikörper (Ak) markiert werden. Anschließend wird dieser über einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper detektiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops lassen sich dann infizierte von nicht-infizierten Zellen unterscheiden sowie die Lokalisierung der Proteine innerhalb der Zellen bestimmen.

Die Zellen wurden in gewünschter Dichte in 24-Loch-Kulturplatten in 1 ml Zellkulturmedium ausgebracht und über Nacht inkubiert. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen in 100 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Min mit 3%igem Formaldehyd fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen durch 10 min Inkubation mit Triton X-100 permeabilisiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen und als nächstes mit dem Erstantikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Zellkerne durch Zugabe von DAPI (1:10000 in 5%igem NGS). Schließlich wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit PBS überschichtet. Bis zur Analyse erfolgte die Lagerung der Zellen bei 4 °C im Dunkeln.

3.7.3 Virustiter-Bestimmung

Für die aussagekräftige Auswertung der Wachstumskurven ist es notwendig, zum Startzeitpunkt alle Ansätze mit der gleichen Anzahl der jeweiligen rBDV zu infizieren. Dafür muss zunächst der Virustiter bestimmt werden. Diese Bestimmung

wurde mittels IFA durchgeführt, indem eine Verdünnungsreihe der Virusstammlösung ausgesät und ausgezählt wurde. Aus der Anzahl der infizierten Zellen lässt sich dann die Konzentration des Virusstocks (entspricht dem Virustiter) bestimmen.

Aus einer mit Vero-Zellen konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflasche wurden die Zellen abgelöst und anschließend 1:6 in Medium verdünnt. Hiervon wurden jeweils 0,5 ml in die Kavität einer 24-Loch-Platte ausgebracht und für acht h inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und jeweils 300 µl frisches DMEM mit 5% FKS zugegeben. Dann wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor fünf des Virusstocks in DMEM ohne Zusätze im Bereich von 1:5 bis 1:15625 hergestellt. Von den einzelnen Verdünnungsschritten wurden jeweils 10 µl verwendet um die ausgesäten Vero-Zellen durch Inkubation über Nacht zu infizieren. Nach 16 h wurde von allen Verdünnungen eine Immunofluoreszenzfärbung gegen BDV-N durchgeführt. Zur Berechnung der Konzentration des Virustiters wurden drei benachbarte Verdünnungen ausgewählt, die eine zählbare Nummer an infizierten Zellen aufwiesen. Die jeweilige Anzahl an infizierten Zellen wurde durch das eingesetzte Volumen des Virusstocks dividiert und dann auf das ursprüngliche Volumen der ausgesäten Zellen von 1000 µl bezogen, woraus sich die Konzentration an infektiösen Partikeln pro ml im Virusstock ergibt.

Beispielrechnung:

gezählte infizierte Zellen:	1310
eingesetzter Virusstock:	0,0016 µl (5 µl einer 1:125 Verdünnung)

$$\text{Virustiter} = \frac{\text{infizierte Zellen}}{\text{Virusstock} [\mu\text{l}]} * 1000 \mu\text{l}$$

$$\text{Virustiter} = \frac{1310}{0,0016 \mu\text{l}} * 1000 \mu\text{l} = 8,2 * 10^7$$

3.7.4 Infektion von Oligoglioblastoma-Zellen mit rekombinanten Viren zur Bestimmung der Wachstumskinetik

Zur Charakterisierung der verschiedenen BDVM-Varianten sollte deren Wachstumskinetik in Oligoglioblastoma-Zellen bestimmt werden. Nach zeitgleicher

Infektion der Zellen mit den rekombinanten Viren wurden in bestimmten Zeitabständen Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und der Anteil an infizierten Zellen bestimmt. Jeweils $8 \cdot 10^5$ Oligoglioblastoma-Zellen wurden in DMEM in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. Diese wurden dann mit einem Infektiositäts-Faktor von 0,01 infiziert. Das bedeutet, dass auf 100 Zellen ein infektiöses Partikel aus dem jeweiligen Virusstock eingesetzt wird. Das entsprechende Volumen des Virusstocks wurde auf 10 μ l mit PBS aufgefüllt und dann auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Kulturmedium inklusive der viralen Partikel abgenommen und die infizierten Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen überführt. Im Folgenden wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage mit einem Faktor von vier aufgeteilt und weiter passagiert. Bei jeder Aufteilung der Zellen wurden zusätzlich 7 μ l der Zellsuspension in eine 24-Loch-Platte überführt und mit 200 μ l DMEM versetzt. Dieser Ansatz wurde anschließend für die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Das Verhältnis aus infizierten zu nicht-infizierten Zellen wurde zur Erstellung der Wachstumskinetik eingesetzt.

3.7.5 Westernblot

Der Westernblot ist eine sehr sensitive Methode, um ein spezifisches, im SDS-Polyacrylamidgel immobilisiertes Protein mittels Antikörpern zu detektieren. Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch bei 300 mA für 1 h auf eine Polyvinylidenfluoridmembran übertragen, die zuvor mit Methanol aktiviert, in ddH₂O gewaschen und anschließend in Transferpuffer äquilibriert wurde. Danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch Schütteln in einer Lösung aus 5% Magermilchpulver in PBS (mit 0,1% Tween) blockiert. Anschließend folgte die Inkubation mit den spezifischen Erstantikörpern (2.6.1) in 5% Magermilchpulver (in PBS mit 0,1% Tween) über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (2.6.2) für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit dem *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) nach Herstelleranweisung entwickelt. Die Auswertung erfolgte am Chemidoc (Bio-Rad).

3.7.6 Isolierung von viraler RNA mittels Trizol aus eukaryotischen Zellen

Für den Northernblot ist es notwendig, die virale RNA aus den kultivierten eukaryotischen Zellen zu extrahieren. Durch das in Trizol enthaltene Guanidiniumthiocyanat werden die Zellen lysiert und vorhandene RNasen inaktiviert. In dem zusätzlich enthaltenen Phenol lösen sich sowohl DNA als auch Proteine. Nach einer Extraktion mit Chloroform ist die RNA in der wässrigen Phase enthalten und kann so von der DNA und den Proteinen abgetrennt werden.

Zur RNA-Isolierung wurden die gewünschten Zellen in 60 cm² Zellkulturschalen bis zur Konfluenz herangezogen. Nach Erreichen dieses Stadiums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin abgelöst. Nach dem Ablösen der Zellen erfolgte deren Überführung in ein Falconröhrchen und Zentrifugation für 5 min bei 1500 x g und 4 °C. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 900 µl Trizol resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben und das Gemisch für ca. 30 s per Hand geschüttelt. Nach weiteren 3 min Inkubation bei RT erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation für 15 min bei 15 000 x g und 4 °C. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, mit 1 µl Glykogen versetzt und zur Fällung der RNA mit 500 µl Isopropanol vermischt. Anschließend folgte eine Inkubation für 60 min bei -80 °C und eine Zentrifugation bei 15 000 x g für 15 min und 4 °C. Das Pellet wurde mit 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 15 000 x g für 15 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Die Aufnahme der isolierten RNA erfolgte in 50 µl DEPC-Wasser. Zur besseren Lösung der RNA wurde für 10 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend folgte die Konzentrationsbestimmung der RNA am Photometer. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.7.7 Northernblot

Vorbereitung der Proben und deren Auftrennung im Agarosegel

Von der zuvor extrahierten RNA wurden jeweils 200 ng mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und anschließend in 20 µl Ladepuffer aufgenommen. Um mögliche Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören, wurden die Proben für 5 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und dann auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte zunächst bei 200 V,

bis die Proben in das Gel eingetreten waren und dann bei 180 V für 1,5 bis 2 h unter angeschalteter Umwälzpumpe, die für einen Konzentrationsausgleich des Puffers sorgt.

Transfer der RNA

Nach genügender Auftrennung der RNA im Agarosegel wurde diese gestoppt. Das Ergebnis der Auftrennung wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht (260 nm) dokumentiert um sicher zu stellen, dass in allen Taschen die gleiche RNA-Menge aufgetragen wurde. Überschüssige Gelmasse wurde entfernt und das Gel für 30 min in 20x SSC-Puffer geschwenkt. Eine positiv geladene Nylon-Membran (Nytran-N) wurde in Wasser gespült und anschließend in 2x SSC-Puffer äquilibriert. Auf diese Membran erfolgte der Transfer der RNA mittels Kapillarkräften über Nacht. Dazu wurde das Gel auf zwei in 10x SSC-Puffer getränkte Whatmann-Papiere gelegt und mit der Nylon-Membran luftblasenfrei bedeckt. Darauf folgten drei Whatmann-Papiere sowie ein Stapel beschwerter Papierhandtücher, um eine ausreichende Saugkraft zu gewährleisten. Die transferierte RNA wurde durch Lufttrocknung für 15 min und anschließende Inkubation für 2 h bei 80 °C auf der Membran fixiert.

Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde mittels Random-Priming

Zur Herstellung der radioaktiven DNA-Sonde wurden 100 ng DNA-Sonde mit sterilem Wasser auf 24 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 10 µl Random-Oligonukleotid-Primer für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl 5x dCTP Primer-Puffer (enthält dATP, dGTP und dTTP), 5 µl radioaktiv markiertem α -[³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol) sowie 1 µl Exo-Klenow-Polymerase (5 U/µl). Durch anschließende Inkubation bei 37 °C kam es zur radioaktiven Markierung der Sonde. Nach 10 min erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit Hilfe von 2 µl Stopp-Puffer. Eine chromatographische Trennung (Matrix Sephadex G-50 Säule) diente der Separation der radioaktiv markierten Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden.

Hybridisierung

Die zuvor verwendete Nylonmembran wurde für 10 min bei 68 °C in 0,2x SSC/0,5% SDS vorbehandelt und anschließend in ein Hybridisierungsrohr gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte bei konstanter Rotation für etwa 2-3 h bei 42

°C in 10 ml Hybridisierungs-Lösung im Hybridisierungssofen. Die radioaktiv markierte Sonde wurde vor Verwendung für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Dann wurde sie in das Hybridisierungsrohr gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C unter konstanter Rotation im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde die Membran zunächst bei RT in 2x SSC / 0,5% SDS und anschließend zweimal für je 30 min bei 65 °C in 2x SSC / 0,5% SDS gewaschen. Abschließend erfolgte die Exposition der Membran gegen einen Röntgenfilm.

3.8 Biophysikalische Methoden

3.8.1 Kristallisation

Nach erfolgter Reinigung der BDVM-Varianten (3.4) wurden diese im zuletzt verwendeten Puffer (50 mM HEPES, 400 mM NaCl, pH 7,6) auf eine Konzentration von möglichst > 5 mg/ml und ein Volumen von etwa 400 µl konzentriert (3.3.5). Vor der Kristallisation wurden die Proben bei 16 000 x g für 30 min bei RT zentrifugiert, um eventuell vorhandenes aggregiertes Protein abzutrennen. Der Überstand wurde für die Kristallisation unter verschiedenen Pufferbedingungen eingesetzt. Dabei kamen die kommerziellen Kristallisationspuffer aus *JBScreen 1-10 Crystal Screening Kit* (Jena Bioscience), *Crystal Screen 1* und *2* (Hampton Research), *Crystallization basic, extension, low ionic und cryo kit* (Sigma-Aldrich), *Morpheus* (Molecular Dimensions) sowie *Factorial Solutions* der AG Stubbs zum Einsatz. Die *Factorial Solutions* der AG Stubbs sind optimierte Puffer aus anderen Kits, die von der Arbeitsgruppe hergestellt wurden.

Die initiale Suche nach möglichen Kristallisationsbedingungen erfolgte mit Hilfe eines Kristallisationsroboters (*Cartesian Pipetting Robot*, Zinser) nach der *sitting drop*-Methode. Dabei wurde die Proteinlösung mit einem gleichen Teil an Kristallisationspuffer vermischt und gegen den unverdünnten Kristallisationspuffer mittels Dampfdiffusion äquilibriert. Die Kristallisationsplatten enthielten 96 Kavitäten für die zu testenden Kristallisationspuffer und jeweils zwei bzw. drei Kavitäten für verschiedene Proteinkonzentrationen. Zunächst wurden 200 nl des Kristallisationspuffers vorgelegt und anschließend 200 nl der Proteinlösung hinzu pipettiert und dann gegen 30 µl (drei Kavitäten für die Proteinlösung) bzw. 70 µl (zwei

Kavitäten für die Proteinlösung) des Kristallisationspuffers mittels Dampfdiffusion bei 14 °C äquiliert. Die Betrachtung der Kristallisationsansätze erfolgte mit Hilfe eines speziellen Fotoroboters (Mistrel UV, Rigaku) oder Mikroskops über die Zeit. Mögliche Proteinkristalle wurden mit Schlaufen aus dem Kristallisationsansatz entnommen, mit dieser in ein Gemisch aus Reservoirlösung und Gefrierschutz überführt und anschließend im flüssigen Stickstoffstrom (-180 °C) mit Hilfe eines Röntgenerators (MicroMax-007, Rigaku) auf ihre Streukraft getestet.

Bedingungen, die zu gut streuenden Kristallen führten, wurden im größeren Maßstab unter Variation der eingesetzten Proteinkonzentration wiederholt. Dies erfolgte in Kristallisationsplatten mit 24 Kavitäten nach der *hanging drop*-Methode. Es wurden 0,8 bis 1,2 µl der Proteinkonzentration mit Kristallisationspuffer auf 2 µl aufgefüllt und gegen 500 µl des Kristallisationspuffers bei 14 °C mittels Dampfdiffusion äquiliert. In diesem Fall wurde der Kristallisationsverlauf mit Hilfe eines Mikroskops verfolgt.

3.8.2 Datensammlung und Strukturlösung

Vorhandene Proteinkristalle wurden zunächst in einem Gemisch aus der entsprechenden Reservoirlösung und Gefrierschutz gewaschen und dann mit Hilfe des am Institut vorhandenen Röntgenerators (MicroMax-007, Cu-Anode, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, Rigaku) bezüglich ihrer Streukraft getestet. Von gut streuenden Kristallen wurde ein kompletter Satz von Streubildern mit Hilfe des Saturn 944+- oder R-Axis IV⁺⁺-Detektors aufgenommen. Alle so gemessenen Kristalle wurden bis zur erneuten Messung an einem Synchrotron in flüssigem Stickstoff gelagert. Die gelagerten Kristalle wurden entweder am BESSY (Berlin, Beamline 14.1 oder 14.2) oder am DESY (Hamburg) erneut gemessen. Der jeweils beste Datensatz diente zur Strukturaufklärung.

Die Indizierung der Streubilder erfolgte entweder mit MOSFLM (Leslie 2006) oder XDS (Kabsch 2010). Anhand der Wildtyp-Struktur (pdb-Code: 3f1j) war es möglich, mit den Programmen *Phaser* (McCoy *et al.* 2005) oder *MolRep* (Vagin & Teplyakov 2010) die fehlende Phaseninformation zu ersetzen und so die neue Struktur zu lösen. Die manuelle Strukturbildung erfolgte mit *Coot* (Emsley & Cowtan 2004) und wurde durch eine *omit map* auf ihre Korrektheit überprüft. Die Verfeinerung der manuell gebauten Strukturen erfolgte mit den Programmen *Refmac5* (Murshudov *et al.* 2011) oder *Phenix* (Adams *et al.* 2002). Bei vorliegenden

Zwillingskristallen, die aus zwei miteinander verwachsenen Einkristallen bestehen, wurde für die Verfeinerung das *twinned refinement* im Programm *phenix* (Adams *et al.* 2002) verwendet. Alle manuell gebauten und verfeinerten Strukturen wurden mit Hilfe des Programms *Molprobit* validiert (Chen *et al.* 2010). Als zusätzliche Validierung diente die Berücksichtigung der R-Faktoren (R_{work} und R_{free}) als Gütemerkmal. Diese sollten idealerweise eine Abweichung unter fünf Prozent aufweisen um sicher zu stellen, dass die zuvor gebauten Strukturelemente mit den experimentellen Daten hinreichend übereinstimmen.

4 Ergebnisse

4.1 Chromatographische Reinigung aller BDVM-Varianten

Für die spätere Charakterisierung und Kristallisation aller BDVM-Varianten war die Reinigung bis zur Monodispersität notwendig. Da alle BDVM-Varianten als C-terminales Fusionsprotein mit MBP exprimiert wurden, erfolgte eine erste Reinigung über die Amylose-Affinitätschromatographie. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit Hilfe des Faktors Xa gespalten und es erfolgte ein Pufferaustausch über zwei HiTrap Desalting Säulen. Im nächsten Schritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt, um das gespaltene MBP von BDVM abzutrennen. Abschließend wurden die verschiedenen oligomeren Spezies von BDVM voneinander und von verbliebenen Verunreinigungen durch Größenausschlusschromatographie getrennt (3.4.5). Mit Hilfe der Amylose-Affinitätschromatographie ließen sich die Fusionsproteine nahezu frei von Verunreinigungen mit anderen Proteinen aus *E. coli* gewinnen. Die anschließende Spaltung durch Faktor Xa erfolgte qualitativ. Nach dem Puffertausch hin zu einem Niedrigsalzpuffer war die Trennung von MBP und BDVM auf Grund des unterschiedlichen isoelektrischen Punkts über Kationenaustauschchromatographie möglich, wobei BDVM an die Säule gebunden wurde und sich MBP im Durchfluss befand. Die abschließende Größenaustauschchromatographie führte zu reinem Zielprotein (Abbildung 13). Da für alle BDVM-Varianten das gleiche Reinigungsverfahren genutzt wurde, ist an dieser Stelle beispielhaft die Reinigung des *wt* von BDVM dargestellt. Ein vergleichbares Ergebnis der Reinigung wurde auch für die anderen Varianten erhalten. Die Ausbeute der Reinigung betrug zwischen 7 und 10 mg reines Zielprotein pro Liter Expressionsmedium. Nur für die Variante BDVM H112W R34/53A D95N wurde eine geringere Ausbeute von 4 mg reinem Zielprotein pro Liter Expressionsmedium erzielt.

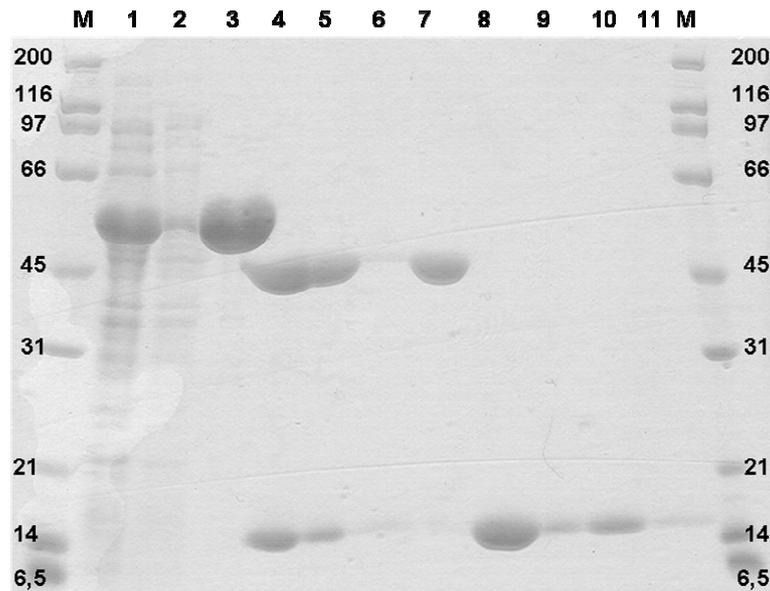


Abbildung 13: Darstellung der chromatographischen Reinigung von BDVM mittels SDS-PAGE.

Der Marker mit seinen Banden in kDa ist jeweils mit M angegeben, nachdem er auf einer 15%igem SDS-PAGE aufgetrennt wurde. In Spur 1 wurde das Zellextrakt nach erfolgter Expression aufgetragen. Spur 2 zeigt den Durchfluss und Spur 3 die Elution der Amylose-Affinitätschromatographie. In 4 ist die Spaltung des Fusionsproteins durch Faktor Xa dargestellt. Spur 5 zeigt die Elution und Spur 6 den Durchfluss nach dem Puffertausch über HiTrap Desalting Säulen. In Spur 7 ist der Durchfluss und in Spur 8 und 9 die Elutionsfraktion der Ionenaustauschchromatographie dargestellt. Spur 10 und 11 zeigen die Elution nach der Größenausschlusschromatographie.

4.2 Kristallisation aller BDVM-Varianten

Um die Kristallisationsbedingungen für die Bildung von Proteinkristallen zu finden, wurden verschiedene kommerziell verfügbare Kristallisationskits sowie gruppeneigene optimierte Kristallisationsbedingungen getestet. Bedingungen, unter denen Kristalle wuchsen, wurden im größeren Maßstab mit Variation der Protein- und Präzipitanskonzentration reproduziert. Die qualitativ besten Proteinkristalle wuchsen unter den in Tabelle 4 genannten Voraussetzungen. Es konnten für alle im Fokus dieser Arbeit stehenden Varianten von BDVM Proteinkristalle gezüchtet werden. Die ermittelten Kristallisationsbedingungen waren dabei für jede Variante von BDVM unterschiedlich. Es ist jedoch anzumerken, dass für jede Variante unter mehreren Bedingungen Proteinkristalle erhalten wurden. In der Tabelle 4 sind jeweils nur die Konditionen aufgelistet, mit denen die Proteinkristalle erhalten wurden, deren Beugungsdaten letztendlich bei der Berechnung der Elektronendichte herangezogen

wurden. Die auf diese Weise erhaltenen Proteinkristalle wiesen unterschiedliche Formen und Größen auf (Abbildung 14).

Tabelle 4: Auflistung der Kristallisationsbedingungen verschiedener BDVM-Varianten und der verwendeten Proteinkonzentration.

Für die unterschiedlichen Varianten von BDVM wurden unter jeweils verschiedenen Bedingungen Proteinkristalle erhalten. Die verwendete Proteinkonzentration schwankte dabei zwischen 7,5 und 20 mg/ml. Für weitere Informationen bezüglich der einzelnen Kristallformen siehe Tabelle 5.

Variante	Kristallisationsbedingung	Protein-konzentration	Gefrierschutz
BDVM wt	10% PEG 8000 0,5 M Li ₂ SO ₄ 0,1 M Tris-HCl pH 6,5 (Kraus <i>et al.</i> 2002)	5 mg/ml	30% Glycerol
BDVM H112W	P6₃ : 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 2,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ----- R3 : 0,1 M MgCl ₂ 0,1 M -N-(-2-Acetamido)iminodiacetat pH 6,5 12% PEG 6000 (w/v)	P6₃ : 15 mg/ml ----- R3 : 10 mg/ml	P6₃ : 30% Glycerol ----- R3 : 30% Ethylen-glycol
BDVM R53A	100 mM Tris-HCl pH 8,5 2,0 M MgCl ₂	12 mg/ml	kein Zusatz
BDVM F37A	0,1 M Na-HEPES pH 7.1 0,2 M MgCl ₂ 30 w/v Polyethylenglycol 400	20 mg/ml	20% Glycerol
BDVM R34/53A	0,09 M NPS (NaNO ₃ ; Na ₂ HPO ₄ ; (NH ₄) ₂ SO ₄) 0,1 M Na-HEPES; MOPS (Säure) pH 7,5 30% Glycerol; PEG 4000	7,5 mg/ml	kein Zusatz
BDVM H112W R34/53A	2,0 M NaCl jeweils 0,1 M K ⁻ , Na-Dihydrogenphosphat 0,1 M MES (pH 6,5)	7,5 mg/ml	20% Glycerol
BDVM H112W R34/53A D95N	1,125 M Li ₂ SO ₄ 0,075 M Na-HEPES pH 7,5 25% Glycerol	9 mg/ml	kein Zusatz

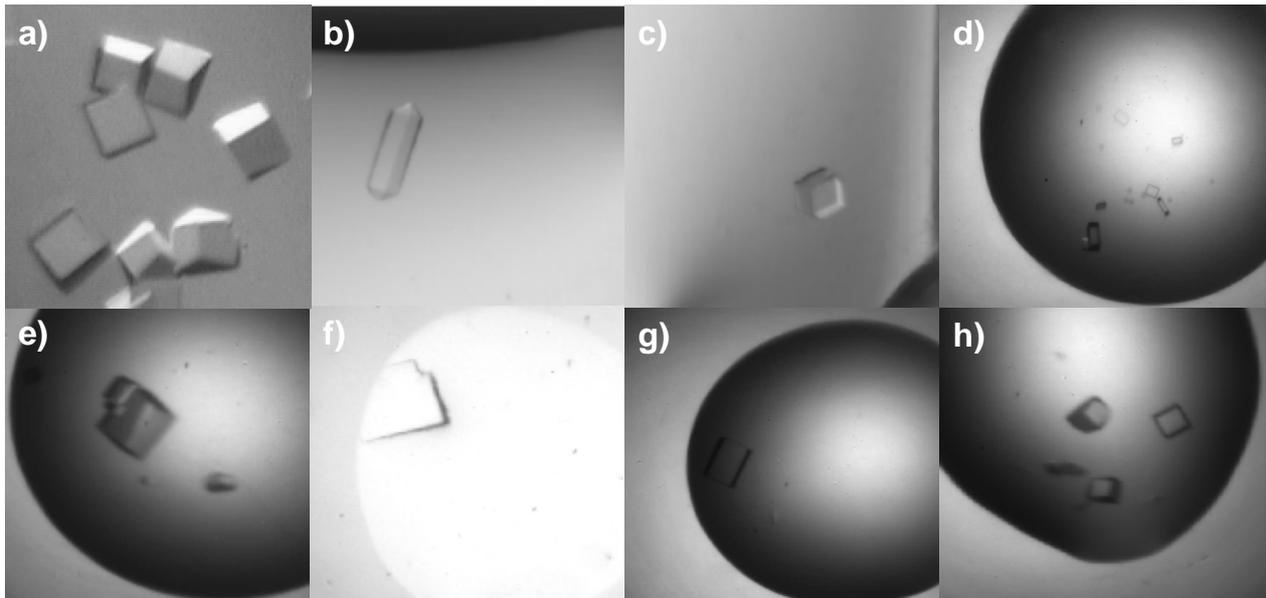


Abbildung 14: Kristalle der verschiedenen BDVM-Varianten.

Abgebildet sind die zur Strukturlösung verwendeten Proteinkristalle der verschiedenen BDVM-Varianten. In a) sind die Proteinkristalle von BDVM *wt* wie beschrieben in Kraus *et al.* zum Vergleich zu sehen (Kraus *et al.* 2002). In b) und c) sind zwei verschiedene Kristallformen von BDVM H112W (P6₃ bzw. R3) dargestellt. Teilabbildung d) zeigt die Variante BDVM R53A und e) BDVM F37A. Die Doppelvariante R34/53A ist in f) abgebildet. Die Dreifachvariante ist in g) und in h) ist die Vierfachvariante BDVM H112W R34/53A D95N dargestellt.

4.3 Datensammlung und Strukturaufklärung

Die Indizierung der erhaltenen Daten wurde mit den Programmen MOSFLM (Leslie 2006) oder xds (Kabsch 2010) durchgeführt. Das Phasenproblem für alle zu lösenden Strukturen wurde mit Hilfe der Programme Phaser (McCoy *et al.* 2005) oder Molrep (Vagin & Teplyakov 2010) gelöst. Diese Programme verwenden homologe Strukturen und berechnen nach erfolgreicher Platzierung dieser Struktur die Phasen für die neue Elektronendichte. Als Modell diente dabei die Struktur von BDVM *wt* (pdb-Code 3f1j). Die Verfeinerung der Strukturen erfolgte mit den Programmen Refmac5 (Murshudov *et al.* 2011) oder *Phenix* (Adams *et al.* 2002) nach dem Bau der Struktur mit dem Programm Coot (Emsley & Cowtan 2004). Das initiale Bauen und Verfeinern der Strukturen ist in Eigenleistung erfolgt. Abschließend wurden die Strukturen durch Dr. P. Kolenko (AG Stubbs, Universität Halle) überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Nach erfolgreicher Lösung der Strukturen ergaben sich die in Tabelle 5 aufgelisteten statistischen Werte für die kristallisierten BDVM-Varianten. Für die Variante BDVM H112W wurden Proteinkristalle in zwei verschiedenen Raumgruppen, R3 und P6₃, erhalten. Deren Zellkonstanten betragen $a = b = 158,07 \text{ \AA}$ und $c = 103,71 \text{ \AA}$ für die Raumgruppe R3 und $a = b = 123,32 \text{ \AA}$ und $c = 113,50 \text{ \AA}$ für die Raumgruppe P6₃. Beide Kristalle zeigten eine vergleichbare maximale Auflösung von $2,2 \text{ \AA}$ (R3) bzw. $2,4 \text{ \AA}$ (P6₃). In beiden Fällen ist pro asymmetrischer Einheit ein Homotetramer von BDVM H112W enthalten. Die Variante von BDVM R53A wuchs als kubischer (I432) Kristall, dessen asymmetrische Einheit die Kantenlängen $a = b = c = 137,82 \text{ \AA}$ aufwies und der zu einer maximalen Auflösung von $3,0 \text{ \AA}$ führte. Ebenfalls kubisch (I432) war der Kristall von BDVM F37A mit den Zellkonstanten $a = b = c = 139,63 \text{ \AA}$. Die maximale Auflösung wies hierbei $3,6 \text{ \AA}$ auf. Die Zellkonstanten von BDVM R34/53A (ebenfalls I432) waren $a = b = c = 139,73 \text{ \AA}$. Dieser Kristall hatte eine maximale Auflösung von $3,3 \text{ \AA}$. Auch die Variante BDVM H112W R34/53A wuchs in der Raumgruppe I432 ($a = b = c = 136,80 \text{ \AA}$) und führte zu einer Auflösung von $2,9 \text{ \AA}$. Der Kristall von BDVM H112W R34/53A D95N streute bis $3,3 \text{ \AA}$ und hatte die Kantenlängen $a = b = c = 137,42 \text{ \AA}$ in der Raumgruppe I432. Die asymmetrische Einheit aller kubisch gewachsenen Varianten von BDVM enthielt jeweils einen Monomer. Sämtliche Beugungsexperimente führten zu einer Vollständigkeit des Datensatzes im Bereich von 100% und zu einem guten Signal/Rausch-Verhältnis (I/σ). Nur im Fall von BDVM H112W in der Raumgruppe R3 kam es zur Ausbildung eines Zwillingskristalls.

Tabelle 5: Statistische Werte der vorliegenden Strukturen der verschiedenen Varianten von BDVM.

	BDVM H112W	BDVM H112W	BDVM R53A	BDVM F37A	BDVM R34/53A	BDVM H112W R34/53A	BDVM H112W R34/53A D95N
pdb-Code	4hi6	4hit		4hi5	4hiu	4hiw	4hiy
Raumgruppe	R3	P6 ₃	I432	I432	I432	I432	I432
Wellenlänge, Å	0,91840	0,9184	0,9184	0,9184	1,5418	0,91840	0,91840
Zellkonstanten							
a = b , c [Å]	158,07, 103,71	123,32, 113,50	137,82	139,63	139,73	136,80	137,42
$\alpha = \beta, \gamma$ [°]	90, 120	90, 120	90	90	90	90	90
Auflösungsbereich	82,2 - 2,2	48,3 – 2,4	99,0 – 3,0	69,8 – 3,6	49,3 - 3,3	48,4 – 2,9	56,0 – 3,3
Rmerge	0,063 (0,478)	0,057 (0,600)	0,096 (0,493)	0,134 (0,732)	0,090 (0,701)	0,107 (0,731)	0,155 (0,789)
I/σ	22,1 (4,5)	26,2 (3,2)	19,2 (5,3)	13,4 (3,2)	25,5 (3,6)	13,6 (2,8)	11,9 (3,2)
Vollständigkeit (working + test), %	99,8 (98,1)	98,9 (92,4)	100 (100)	99,7 (100)	100 (100)	100 (100)	99,4 (100)
Multiplizität	7,1 (7,1)	6,9 (5,9)	11,7 (11,9)	11,0 (11,4)	11,0 (11,4)	8,9 (9,5)	11,2 (11,5)
Wilson B, Å²	34	56	52	---	93	91	70
Rcryst, %	21,97	19,24	28,01	25,09	18,72	19,97	18,50
Rfree, %	24,33	23,00	33,60	32,00	20,84	27,67	23,23
Zwillingsfraktion	H,K,L (0,142)	---	---	---	---	---	---
Anzahl der nicht-							
Wasserstoffatome	4565	4482	1150	1116	1123	1109	1082
Protein	4418	4298	1118	1095	1078	1100	1077
Wasser	94	137	11	0	0	9	0
Chlorid / Sulfat	5 / 0	1 / 0	0	0	0	0	0 / 1
RNA	48	0	21	21	45	0	0
rmsd vom Idealwert							
Bindungslänge, Å	0,009	0,0120	0,007	0,006	0,013	0,0130	0,0084
Bindungswinkel, °	1,361	1,5178	1,056	1,008	1,474	1,6522	1,3122
Durchschnittlicher B-Faktor, Å²							
Hauptkette	40	49	52	105	88	65	76
	39	47	53	104	84	63	73

4.4 Röntgenkristallstrukturen der BDVM-Varianten

4.4.1 BDVM F37A

Das Phe37 geht eine π - π -Wechselwirkung mit dem Pyrimidin-Ring des Cytosin-5'-Monophosphats ein. Es wurde bei dieser Variante durch ein Ala, das zu dieser Wechselwirkung nicht in der Lage ist, ersetzt. So sollte die in BDVM *wt* beobachtete RNA-Bindung durch das Fehlen der wichtigen π - π -Stapelungsinteraktionen verhindert werden. BDVM F37A kristallisierte in der Raumgruppe I432 mit den Zellkonstanten $a = b = c = 139,64 \text{ \AA}$ und den Winkeln $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

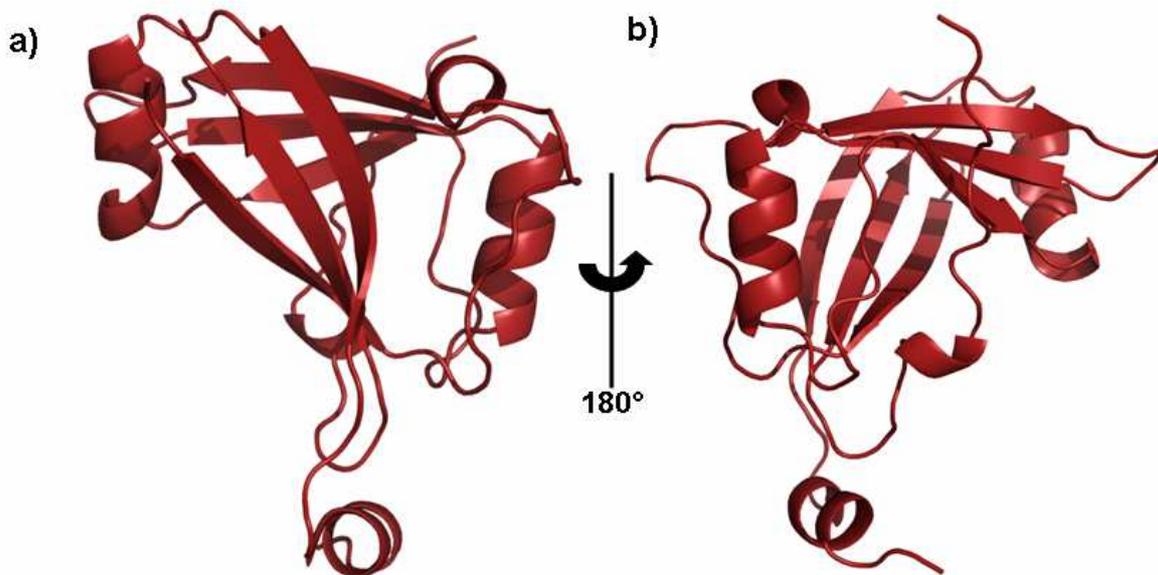


Abbildung 15: Übersicht der Struktur von BDVM F37A.

In Teilabbildung a) ist die Gesamtstruktur von BDVM F37A dargestellt. Man erkennt auch hier, wie für den *wt*, das zentrale in sich gedrehte β -Faltblatt, das von kleinen Helices flankiert wird. In Teilabbildung b) ist die Struktur um 180° um die y -Achse gedreht. In dieser Darstellung ist sehr gut die L-Form der Proteinstruktur zu sehen.

Die Darstellung der Struktur von BDVM F37A (Abbildung 15) weist im Wesentlichen die gleichen Charakteristiken auf, die schon für BDVM *wt* aufgezeigt wurden. BDVM F37A enthält ein zentrales, sechs strängiges anti-paralleles β -Sandwich, das aus zwei ebenfalls anti-parallelen β -Faltblättern mit jeweils drei β -Strängen besteht. Ebenso wie für den *wt* lässt sich auch für BDVM F37A aus dem

Monomer auf Grund der Kristallsymmetrie die biologische Form des BDVM-Homotetramers bilden (Abbildung 16). Dieses zentrale Motiv wird von mehreren kleinen α -Helices und Loop-Strukturen flankiert. Lediglich im Bereich des Loop30 fehlt Elektronendichte, so dass dieser strukturell nicht interpretiert werden konnte (Abbildung 17). Ziel der Mutation BDVM F37A war es, die für BDVM *wt* beschriebene RNA-Bindung durch Schwächung der π - π -Intertaktionen zu verhindern. Dennoch konnte nach dem Beugungsexperiment und der Prozessierung der Daten Elektronendichte beobachtet werden, die nicht Teil von BDVM F37A ist. Diese Dichte wurde als Cytosin-5'-Monophosphat (C5P) interpretiert, welches die Elektronendichte gut repräsentiert (Abbildung 18). BDVM F37A ist daher trotz des fehlenden Phe37 zur Bindung von Nukleinsäuren durch weitere, von der π - π -Stapelungsinteraktion abweichende Interaktionen in der Lage. Somit ist mit dieser Variante eine Untersuchung von RNA-freiem BDVM im zellulären Umfeld nicht möglich.

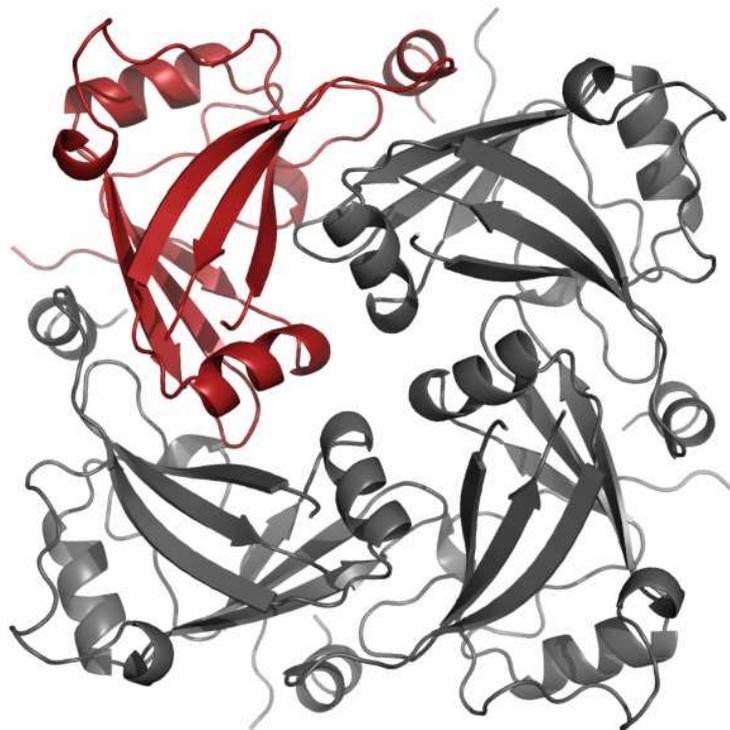


Abbildung 16: Tetramer von BDVM F37A.

BDVM F37A kristallisiert ebenso wie BDVM *wt* in der Raumgruppe I432. Damit ist es möglich, aus dem Monomer die eigentliche biologische Einheit des Tetramers aus symmetrieverwandten Proteinen zu bilden. Dabei ist das ursprüngliche Monomer rot dargestellt und die drei symmetrieverwandten Moleküle sind in grau gehalten.

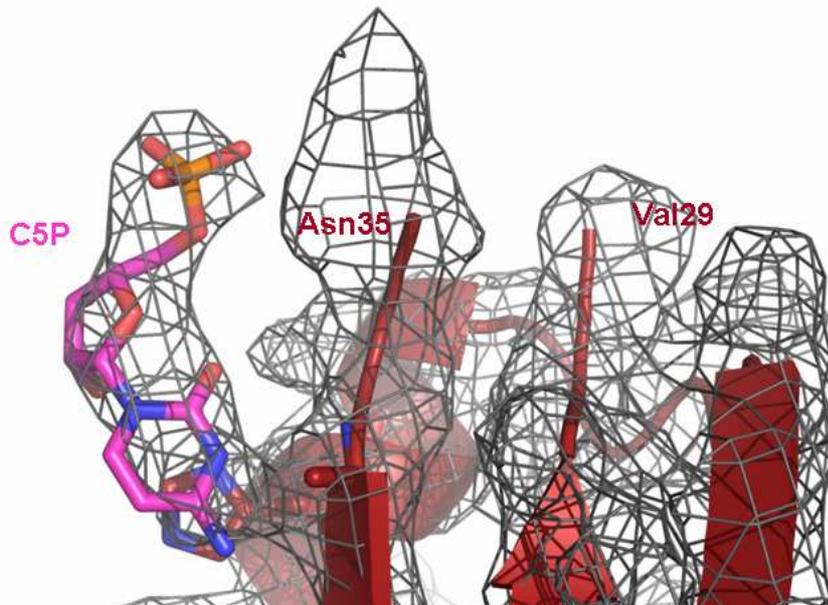


Abbildung 17: Darstellung der 2fofc-Elektronendichte (σ -Level = 1) für BDVM F37A und seinem Liganden C5P.

Dargestellt ist C5P als magentafarbene Stäbe sowie in rot die Cartoon-Darstellung von BDVM F37A. Das Protein ist dabei auf den Loop30 ausgerichtet. Im Bereich des Loop30, also zwischen Val29 und Asn35, ist keine Elektronendichte zu erkennen, so dass die Struktur dieses Bereiches nicht interpretiert werden konnte.

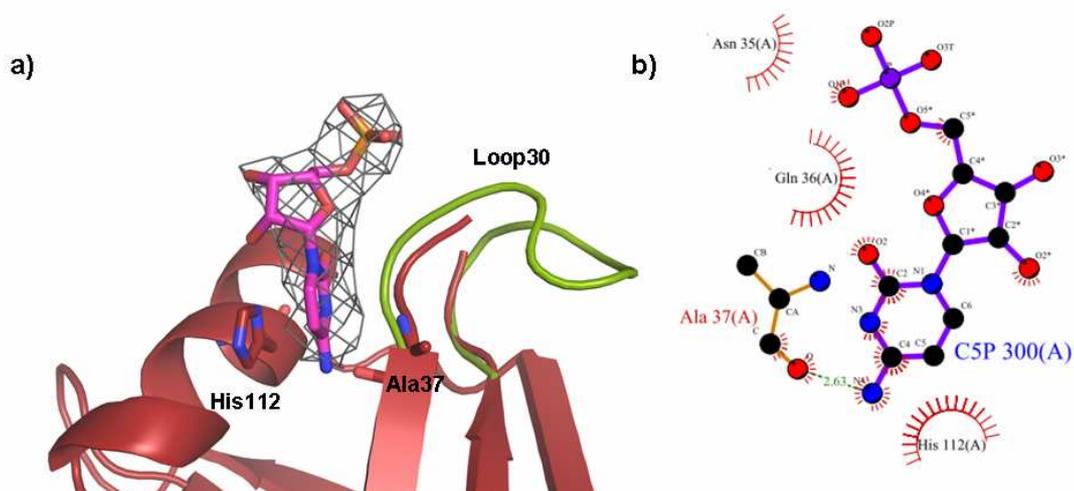


Abbildung 18: Elektronendichte des gebundenen Liganden C5P an BDVM F37A.

a) zeigt die finale 2fofc-Dichte als graues Gitter (σ -Level = 1) des gebundenen Liganden C5P an BDVM F37A. Als Stäbe sind die beiden Aminosäuren His112 und Ala37 dargestellt, welche zu den Hauptinteraktionspartnern der gebundenen Nukleinsäure gehören. Zusätzlich ist der Verlauf des Loop30 von BDVM *wt* (pdb-code: 3f1j) als grüner Cartoon zu sehen. b) zeigt schematisch die Interaktionen zwischen RNA-Ligand und Protein. Dabei ist zu erkennen, dass das Ala37 eine Wasserstoff-Brücke mit dem Cytosin-Ring eingeht, während Asn35, Gln36 und His112 im Wesentlichen zu hydrophoben Interaktionen beitragen.

4.4.2 BDVM H112W

Vergleichbar mit BDVM F37A sollte auch bei der Variante BDVM H112W die *wt* RNA-Bindung zwischen His112 und Phe37 verhindert werden. Das Einführen eines Trp an Position 112 sollte die RNA-Bindung durch einen sterischen Konflikt zwischen der RNA-Base und der voluminösen Seitenkette von Trp112 unterbinden. Für BDVM H112W wurden Kristalle unter zwei verschiedenen Bedingungen mit unterschiedlichen Raumgruppen erhalten (Tabelle 5). Eine Kristallform ist in Raumgruppe $P6_3$ und die andere in R3 gewachsen. Auf Grund der unterschiedlichen Raumgruppen und den daraus resultierenden verschiedenen Strukturen werden die Varianten BDVM H112W (Raumgruppe $P6_3$) und BDVM H112W (Raumgruppe R3) hier getrennt betrachtet.

4.4.2.1 BDVM H112W Kristallform $P6_3$

In der Raumgruppe $P6_3$ kristallisiertes BDVM H112W besitzt ein Tetramer in der asymmetrischen Einheit (Abbildung 19). Durch die kristallographische Symmetrie entlang der drei-zähligen Achse entsteht ein dicht gepackter, nicht kovalent verknüpfter, dreiecksförmiger Dodekamer (Schenkellänge $\sim 90 \text{ \AA}$)

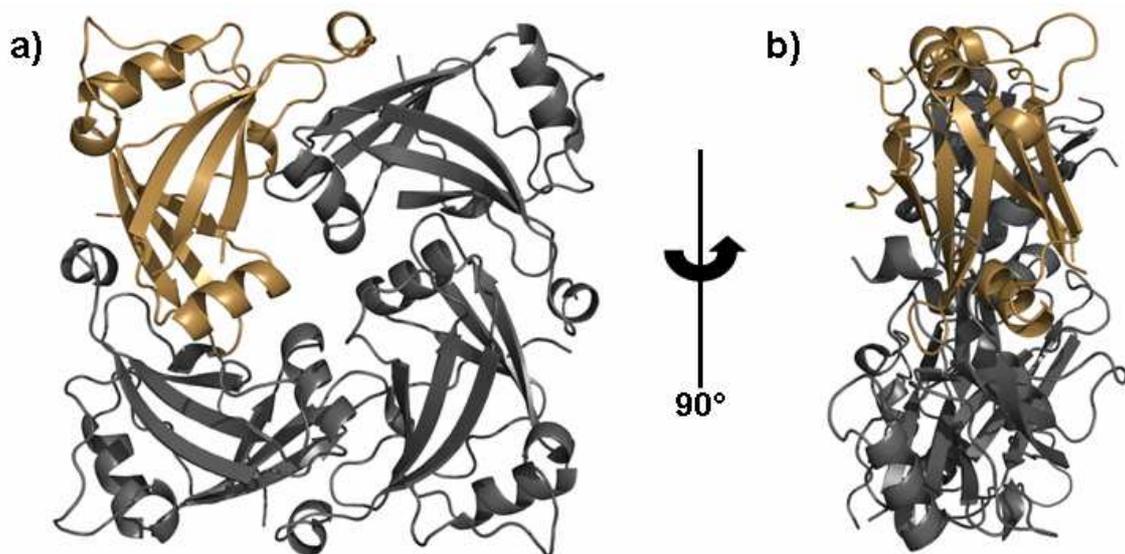


Abbildung 19: Tetramer von BDVM H112W in der Kristallform $P6_3$.

Dargestellt ist das Tetramer der asymmetrischen Einheit von BDVM in der Kristallform $P6_3$. Ein Monomer des Tetramers ist in braun dargestellt, die anderen drei in grau. In Teilabbildung b) ist das Tetramer um 90° um die y -Achse rotiert.

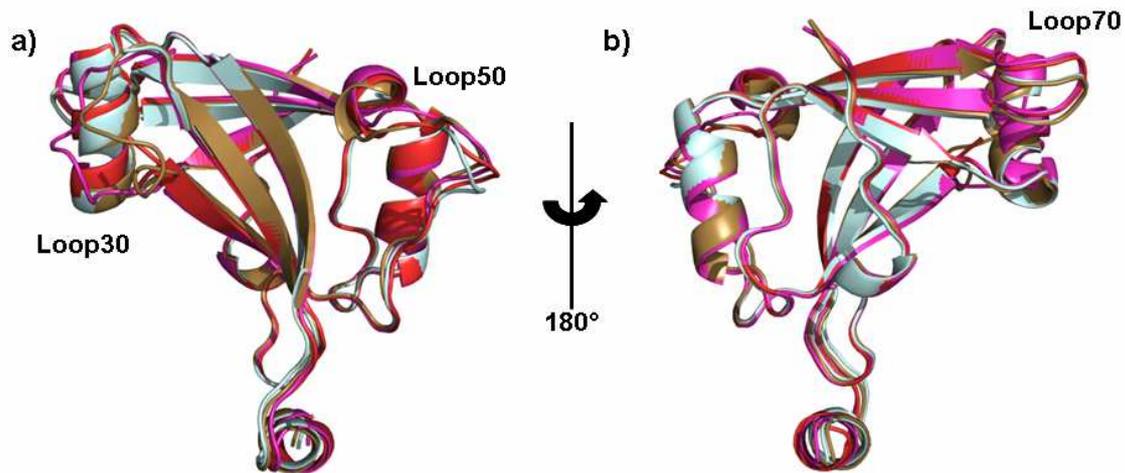


Abbildung 20: Unterschiede zwischen den Monomeren A, B, C und D innerhalb des Tetramers von BDVM H112W P6₃.

Dargestellt ist die jeweilige Cartoon-Repräsentation für die Monomere A (sand), B (pink), C (hellblau) und D (rot). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Monomere untereinander verschieden sind. Sie haben zwar ein gemeinsames strukturelles Gerüst, ähnlich dem von BDVM *wt*, weisen aber besonders in den Loop-Bereichen von Loop30 und Loop50 strukturelle Unterschiede auf.

In der Überlagerung aller Monomere des Tetramers von BDVM H112W P6₃ zeigt sich, dass jedes Monomer eine leicht veränderte Struktur aufweist (Abbildung 20). Besonders im Bereich des Loop30, aber auch im Bereich des Loop50, unterscheiden sich die Monomere voneinander, während die Grundstruktur jeweils die gleiche ist wie für BDVM *wt*. Auf Grund der drei-zähligen Symmetrieachse lässt sich aus dem Tetramer der asymmetrischen Einheit ein triangulärer Dodekamer bilden (Abbildung 21). Dabei formt jedes Monomer eine Seitenfläche des Dodekamers und interagiert mit den beiden jeweils benachbarten anderen Tetrameren. Bei genauerer Betrachtung der Interaktionen, die an der Ausbildung des Dodekamers beteiligt sind, zeigt sich die bedeutende Rolle des Arg34 und des Arg53 (Abbildung 22). Dabei ragen jeweils ein Arg34 und ein Arg53 des Tetramers wie ein Finger in die Bindungstasche, bestehend aus Asp64, Glu66, Phe118 und Gly12, eines benachbarten Tetramers innerhalb des Dodekamers.

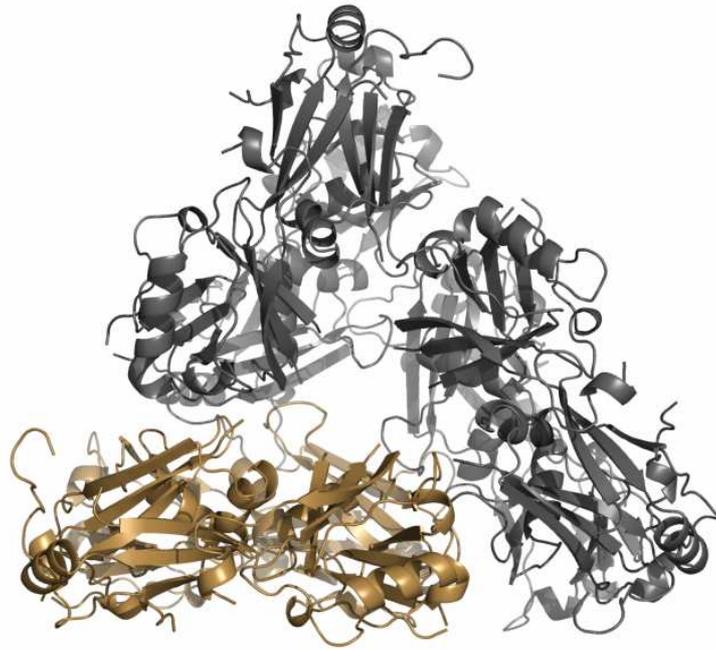


Abbildung 21: Aufbau des Dodekamers von BDVM H112W in der Raumgruppe $P6_3$ in der Seitenansicht.

In braun ist ein planares Tetramer von BDVM H112W in der Raumgruppe $P6_3$ gezeigt. Jeweils in grau sind die beiden symmetrieverwandten Tetramere dargestellt, aus denen sich der dreiecksförmige Dodekamer zusammensetzt. Der Dodekamer ähnelt einem gleichschenkligen Dreieck mit einer Schenkellänge von etwa 90 Å.

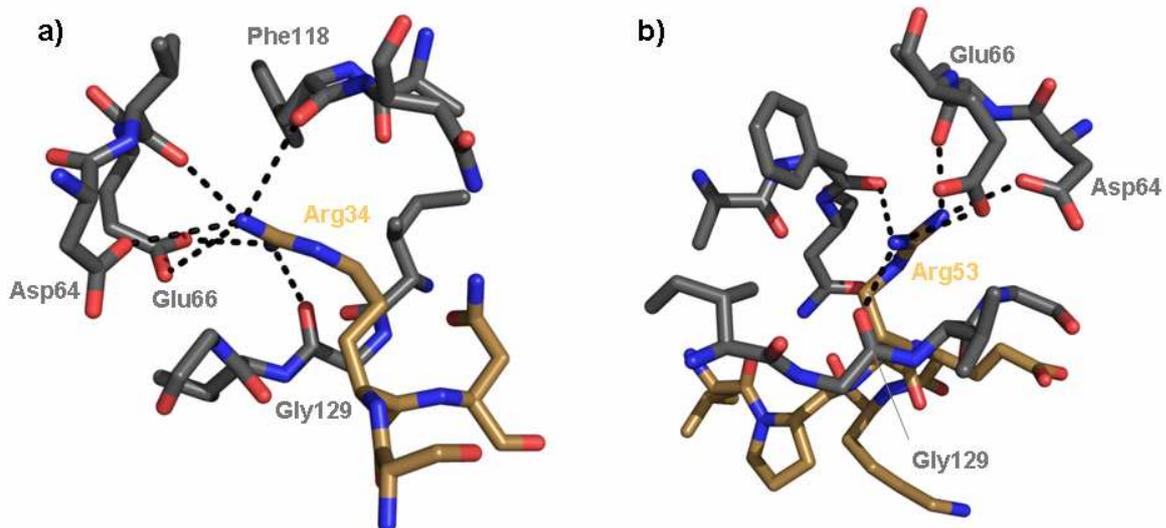


Abbildung 22: Interaktionen zwischen a) Arg34 und b) Arg53 mit einem benachbarten Tetramer innerhalb des Dodekamers.

Eine der Hauptinteraktionen zwischen zwei Tetrameren (Monomer eins braun, Monomer zwei grau) innerhalb des Dodekamers findet zwischen a) Arg34 bzw. b) Arg53 statt. In beiden Fällen interagieren die beiden Arg mit den gleichen Aminosäuren des benachbarten Tetramers. Diese sind Asp64, Glu66, Phe118 und Gly129.

Die Bildung des Dodekamers wird erst dadurch ermöglicht, dass zwischen Phe37 und Trp112 keine Nukleinsäure mehr gebunden ist. Es kommt zu einem Umklappen des Phe37 und zu einer Neuordnung des dazugehörigen Loop30 (Aminosäuren 26-37). Hierdurch wird eine neue Konformation des erwähnten Arg34 ermöglicht, die zur Interaktion zweier benachbarter Tetramere innerhalb des Dodekamers führt. Diese Neuordnung fällt für jedes Monomer innerhalb des Tetramers verschieden aus. Sie erklärt auch die unterschiedlichen Strukturen der einzelnen Monomere untereinander.

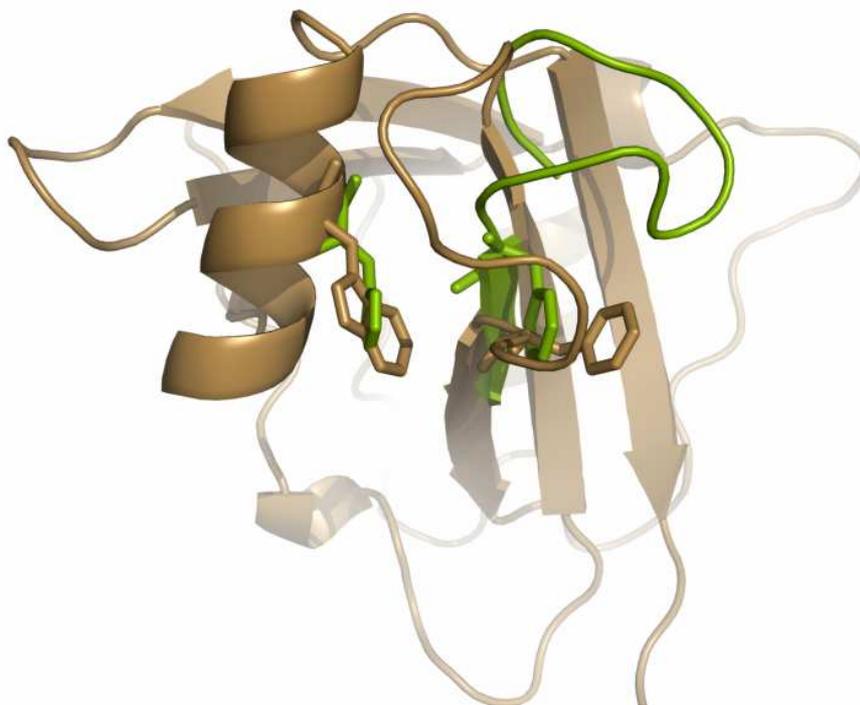


Abbildung 23: Konformationelle Änderung des Loop30 in BDVM P₆₃ durch die Einführung eines Tryptophans an Position 112.

In grün ist ein Teil der Struktur von BDVM *wt* gezeigt. Als Stäbe sind das Phe37 und das His112 sowie als Cartoon der Loop30 dargestellt. Die Gesamtstruktur als Cartoon ist für Monomer A von BDVM H112W (P₆₃) in braun gezeigt. Zusätzlich sind als Stäbe die Aminosäuren Phe37 und Trp112 wiedergegeben. Die Überlagerung von BDVM *wt* und BDVM H112W zeigt mit Ausnahme des Loop30 keine wesentliche strukturelle Änderung. Durch Umklappen des Phe37 in BDVM H112W kann der Loop30 eine neue Konformation einnehmen.

Jedoch verfügt nicht jeder Loop30 der Monomere innerhalb des Tetramers von BDVM H112W P₆₃ über eine Elektronendichte. Nur für das Arg34 der Monomere A und B, und damit auch deren Loop30-Bereiche, ist eine definierte Elektronendichte zu beobachten. Diese beiden Monomere sind es auch, deren Arg34 eine Rolle bei

der Interaktion zwischen zwei Tetrameren innerhalb des Dodekamers spielen. Es konnte daher bei der Variante BDVM H112W P₆₃ durch das Einbringen des Trp an Position 112 die für BDVM *wt* beschriebene RNA-Bindung verhindert werden.

4.4.2.2 BDVM H112W Kristallform R3

Für BDVM H112W konnte eine zweite Kristallisationsbedingung gefunden werden. Bei dieser kristallisierte BDVM H112W in der Kristallform R3. Es ergaben sich vergleichbare Ergebnisse wie für die P₆₃ Kristallform. Auch in der R3-Form ist in der asymmetrischen Einheit ein Tetramer enthalten, aus dem sich entlang der dreizähligen Achse ein dicht gepackter, nicht kovalent verknüpfter, dreiecksförmiger Dodekamer (Schenkellänge ~90 Å) ergibt (Abbildung 24).

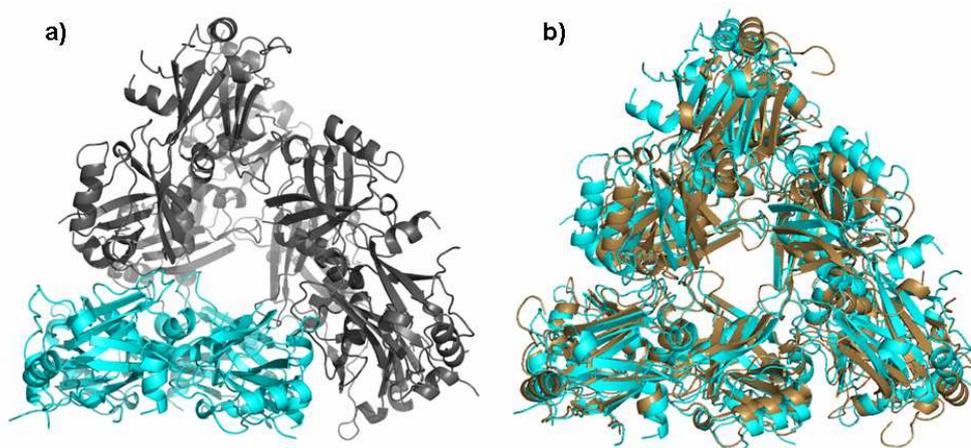


Abbildung 24: Dodekamer von BDVM H112W R3 a) allein und b) in Überlagerung mit dem Dodekamer von BDVM H112W P₆₃.

Für BDVM H112W in der Kristallform R3 ergibt sich ebenfalls ein dreiecksförmiger Dodekamer, bestehend aus drei einzelnen Tetrameren. In Teilabbildung a) ist ein Tetramer in cyan und die anderen beiden in grau dargestellt. In b) ist der Dodekamer aus der R3- (cyan) und der P₆₃-Kristallform (braun) überlagert.

Die Monomere von BDVM R3 eines Tetramers weisen, vergleichbar wie die von BDVM H112W P₆₃ (Abbildung 20), strukturelle Unterschiede zueinander auf (Abbildung 25). Diese liegen besonders in den Bereichen des Loop30 und des Loop50, während die Grundstruktur des gegeneinander verdrehten β -Sandwiches erhalten bleibt.

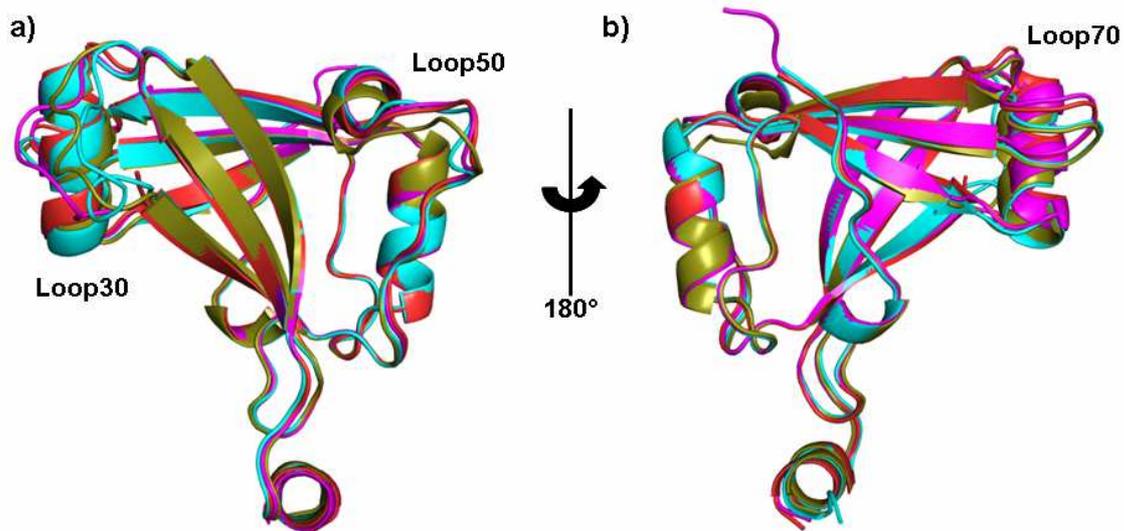


Abbildung 25: Unterschiede zwischen den Monomeren A, B, C und D innerhalb des Tetramers von BDVM H112W R3.

Dargestellt ist die jeweilige Cartoon-Repräsentation für die Monomere A (cyan), B (pink), C (sand) und D (rot). Die Monomere sind im Vergleich untereinander verschieden. Sie haben zwar ein dem *wt* von BDVM ähnliches strukturelles Grundgerüst, weisen aber besonders in den Loop-Bereichen Loop30 und Loop50 Unterschiede auf.

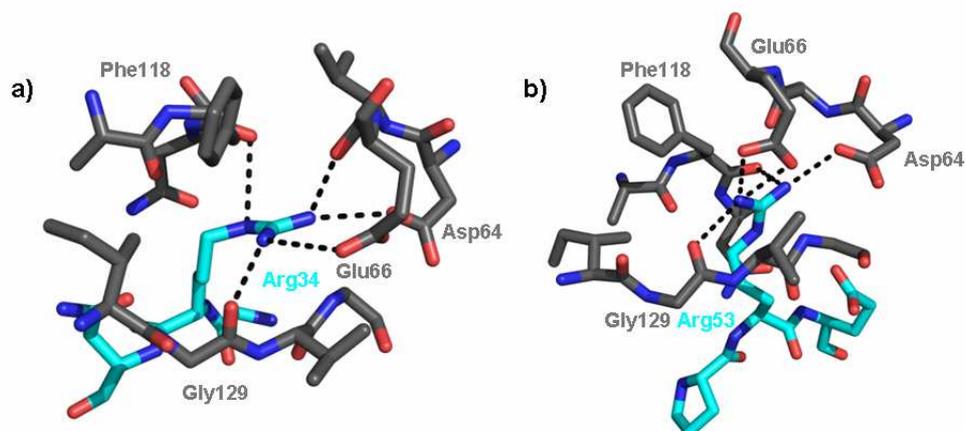


Abbildung 26: Beispielhafte Interaktionen zwischen zwei Tetrameren, vermittelt durch Arg34 und Arg53.

Eine der Hauptinteraktionen zwischen zwei Tetrameren (Monomer eins cyan, Monomer zwei grau) innerhalb des Dodekamers findet zwischen a) Arg34 bzw. b) Arg53 statt. In beiden Fällen interagieren die beiden Arg mit den gleichen Aminosäuren des benachbarten Tetramers. Diese sind Asp64, Glu66, Phe118 und Gly129.

BDVM H112W R3 hat mit BDVM H112W P6₃ darüber hinaus gemeinsam, dass die Bildung des Dodekamers erst durch das Fehlen der gebundenen Nukleinsäure

zwischen Phe37 und Trp112 ermöglicht wird. Dadurch kommt es, wie bereits für BDVM H112W P₆₃ beschrieben (Abbildung 23), zu einem Umklappen des Phe37 und einer Neuordnung des dazugehörigen Loop30 (Aminosäuren 26-37, siehe Abbildung 27). Hierdurch nimmt Arg34 eine neue Anordnung ein, die die Interaktion zweier benachbarter Tetramere innerhalb des Dodekamers ermöglicht. Wie auch bei BDVM H112W P₆₃ fällt diese Neuordnung für jedes Monomer innerhalb des Tetramers verschieden aus. Weiterhin sind die Anordnungen der einzelnen Loop-Bereiche auch zwischen den beiden Kristallformen BDVM P₆₃ und BDVM H112W R3 unterschiedlich (Abbildung 27).

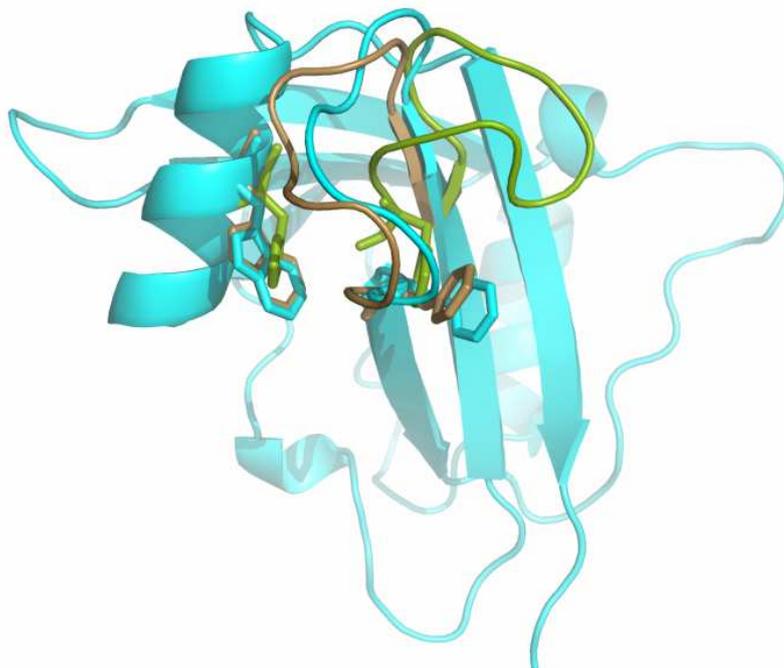


Abbildung 27: Konformationelle Änderung des Loop30 in BDVM H112W R3 durch die Einführung eines Trp an Position 112.

In grün ist ein Teil der Struktur von BDVM *wt* und in braun der von BDVM H112W (P₆₃) dargestellt. Als Stäbe sind das Phe37 und das His112 sowie als Cartoon der Loop30 gezeigt. Die Gesamtstruktur als Cartoon ist für BDVM H112W (R3) in cyan wiedergegeben. Zusätzlich sind als Stäbe die Aminosäuren Phe37 und Trp112 dargestellt. Die Überlagerung der Gesamtstruktur von BDVM *wt* und BDVM H112W zeigt keine wesentliche strukturelle Änderung, mit Ausnahme des Loop30. Durch Umklappen des Phe37 in beiden BDVM H112W-Formen ist der Loop30 in der Lage, eine neue Konformation einzunehmen.

Für die Gesamtstruktur des Monomers von BDVM H112W R3 ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu BDVM *wt* und BDVM H112W P₆₃ außer dem bereits genannten Loop30. In Abbildung 27 ist eine Überlagerung der

Strukturen von BDVM *wt*, H112W P₆₃ und H112W R3 dargestellt. Dabei ist die Grundstruktur die gleiche wie für BDVM *wt*, während sich für den Loop30 jeweils unterschiedliche Konformationen ergeben. Für die beiden Kristallformen von BDVM H112W ist das Phe37 im Vergleich zu BDVM *wt* um etwa 80° umgeklappt, da keine Nukleinsäure mehr an dieser Position gebunden ist. Dadurch kommt es zu einer Neuordnung des Loop30. Diese Neuordnung ist für die beiden Formen von BDVM H112W R3 und H112W P₆₃ verschieden, da auch der gebildete Dodekamer in den beiden Kristallformen leicht unterschiedlich ist (Abbildung 24).

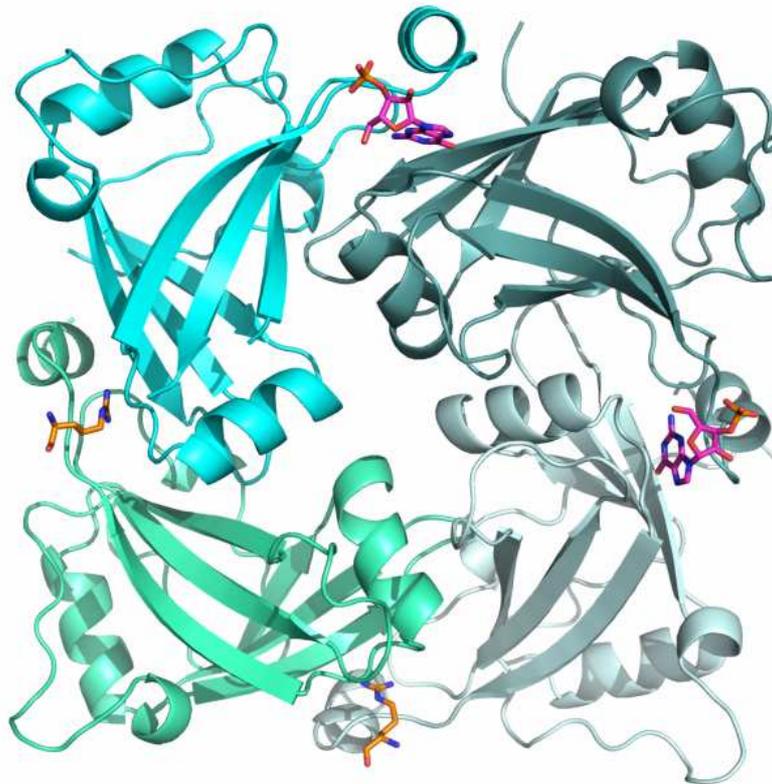


Abbildung 28: RNA-Bindungsstellen in BDVM H112W R3.

Der Tetramer von BDVM H112W R3, dessen Monomere A bis D unterschiedlich von hell nach dunkel angefärbt sind, weist zwei gebundene Guanosyl-3'-Monophosphate (3GP, magentafarbene Stäbe) auf. Diese befinden sich in Taschen, die von zwei benachbarten Monomeren A und B sowie den Monomeren D und A innerhalb des Tetramers ausgebildet werden. An der gleichen Stelle ist zwischen den Monomeren B und C sowie C und D jeweils ein Arg (orange) eines benachbarten Tetramers innerhalb des Dodekamers gebunden (Abbildung 26).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Kristallformen besteht darin, dass in der Kristallform R3 von BDVM H112W Elektronendichte

vorhanden ist, die nicht zum Protein gehört. In Analogie zu BDVM *wt* konnte diese als Nukleinsäure interpretiert werden. Allerdings ist hier kein C5P, sondern zweimal eine Guanosyl-3'-Monophosphat (3GP) gebunden. Beide Bindungstaschen zeigen die gleichen Interaktionen zwischen RNA und Protein. Die Nukleinsäure ist dabei jeweils zwischen zwei Monomeren innerhalb des Tetramers in einer Tasche liegend eingebettet.

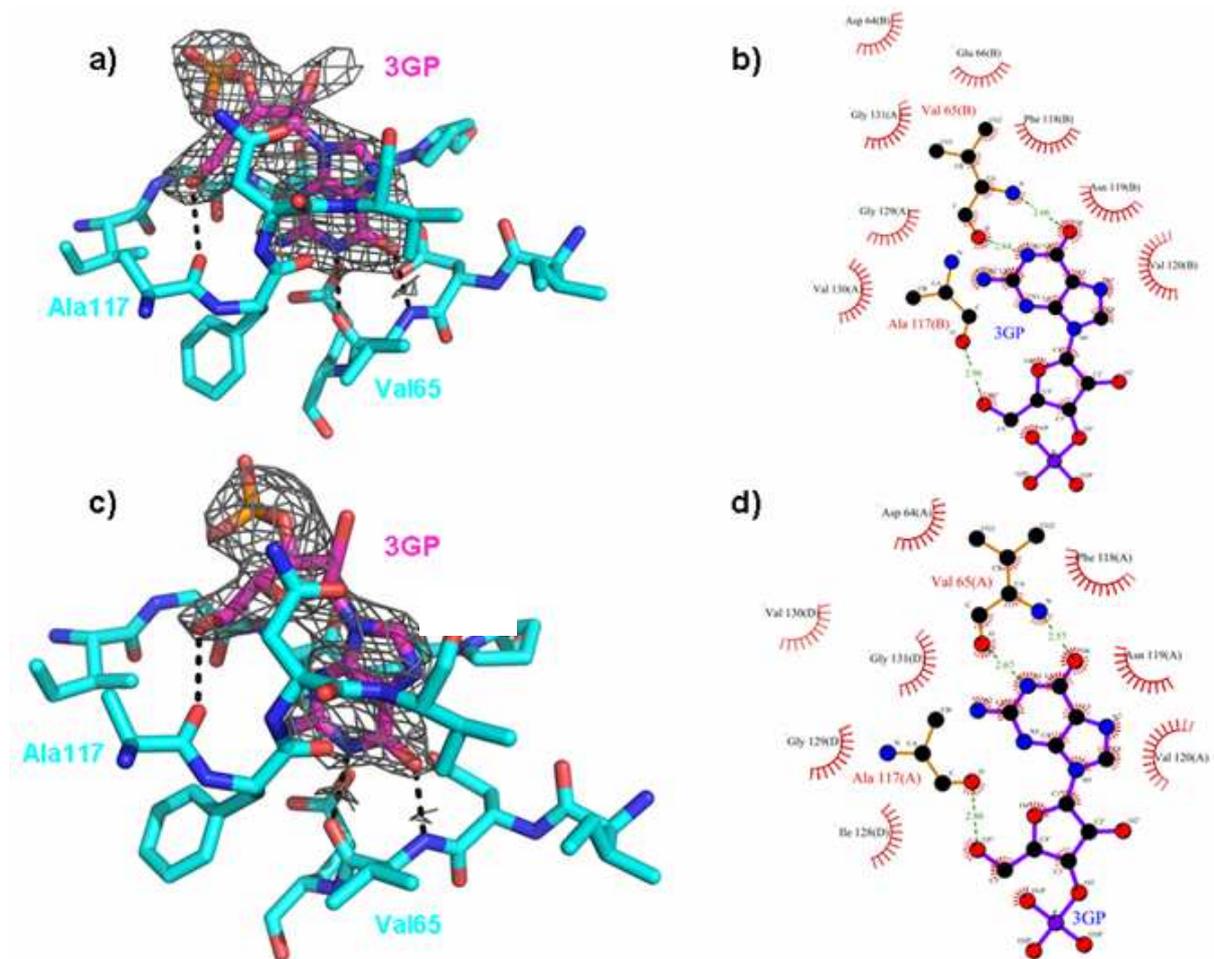


Abbildung 29: Interaktionen zwischen den beiden gebundenen 3GPs und BDVM H112W.

Für die beiden gebundenen 3GPs a) und c) sind die Interaktionen mit dem Protein angegeben. Die jeweiligen RNA-Protein-Interaktionen sind für die beiden gebundenen 3GPs gleich. Es existiert eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Proteinrückgrat von Val65 und dem Guanosin sowie zwischen dem Proteinrückgrat von Ala117 und der Ribose. Zusätzlich kommt es zu hydrophoben Interaktionen zwischen Protein und RNA, die auf Seite des Proteins über Asp64, Phe118, Asn119 und Val120 sowie zwischen Ile128, Gly129, Val130 und Gly131 der benachbarten Proteinkette vermittelt werden (b) und d)).

In Abbildung 29 sind die detaillierten Wechselwirkungen zwischen RNA und Protein für BDVM H112W dargestellt. Im Vergleich dieser Interaktionen mit den

Wechselwirkungen zweier benachbarter Tetramere innerhalb des Dodekamers zeigt sich, dass dabei die gleichen Aminosäuren eine Rolle spielen. Dabei handelt es sich um das Asp64, Phe118 und das Gly129, welche sowohl an der Interaktion mit dem Arg34 bzw. Arg53 des benachbarten Tetramers als auch an der Interaktion mit dem 3GP beteiligt sind.

4.4.3 BDVM R53A

In ersten Zellkulturexperimenten zeigte sich, dass das Ersetzen des Arg53 durch ein Ala zu einer Verlangsamung der Virus-Verbreitung in Vero-Zellen führte (Novotny 2011). Dabei wurde vermutet, dass diese Mutation den dodekameren Zustand, wie er für BDVM H112W nachgewiesen wurde (4.4.2), beeinflusst. Durch das Ersetzen des Arg53 fehlt einer der zentralen Interaktionspartner für die Ausbildung des Dodekamers. Allerdings konnten durch die Einführung der Mutation R53A keine Unterschiede im Bezug auf die Struktur im Vergleich zu BDVM *wt* beobachtet werden (Abbildung 30). BDVM R53A bildet synonym zu BDVM *wt* einen kristallographischen Tetramer. Ferner ist es zur Bindung einer Nukleotidbase zwischen den Aminosäuren 37 und 112 in der Lage (Abbildung 31).

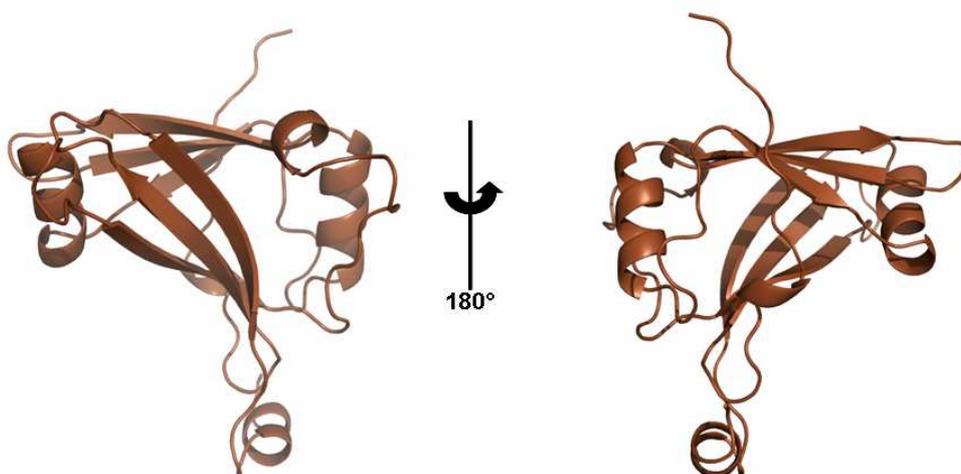


Abbildung 30: Kristallstruktur von BDVM R53A.

Auch die Kristallstruktur der Variante BDVM R53A weist die für BDVM typische Faltung auf. Das zentrale Motiv bildet dabei ein anti-paralleles β -Sandwich, das aus zwei ebenfalls anti-parallelen β -Faltblättern mit jeweils drei β -Strängen besteht. Dieses wird von mehreren kleinen α -Helices und Loop-Strukturen flankiert.

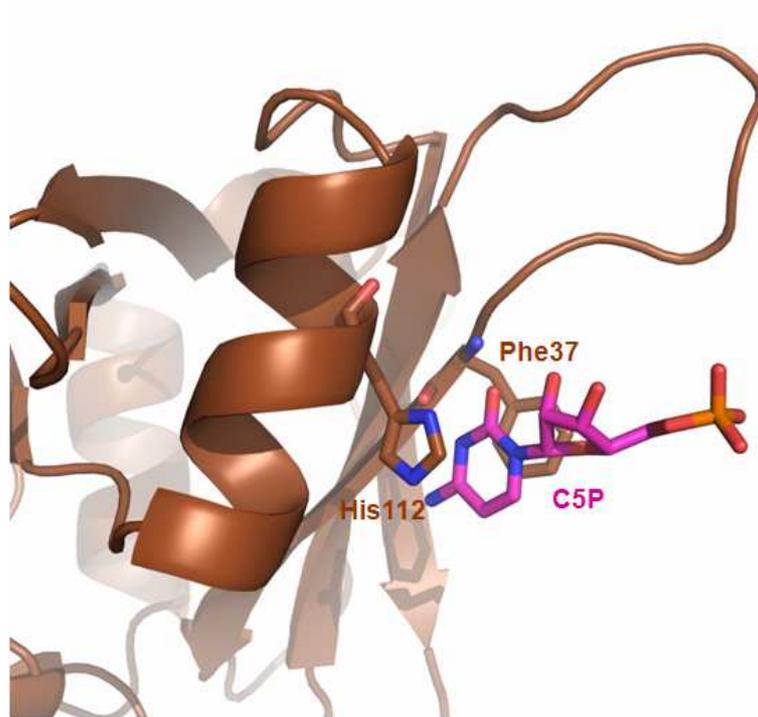


Abbildung 31: Bindungsstelle von C5P an BDVM R53A.

Auch in BDVM R53A (brauner Cartoon) ist zwischen dem Phe37 und dem His112 (beide als Stäbe dargestellt) ein C5P (magentafarbene Stäbe) gebunden.

4.4.4 BDVM R34/53A

Basierend auf den Daten von BDVM H112W ergibt sich die Grundlage für die Doppelmutante BDVM R34/53A. Diese sollte die für die Ausbildung des Dodekamers entscheidenden Interaktionen verhindern. Dabei handelt es sich wie unter 4.4.2 beschrieben um Arg34 und Arg53. Um die Interaktion zweier benachbarter Tetramere innerhalb des Dodekamers zu schwächen bzw. zu verhindern, wurden die beiden Arg jeweils durch ein Ala ersetzt. BDVM R34/53A kristallisierte wie BDVM *wt* und BDVM F37A in der Raumgruppe I432 mit einem Monomer pro asymmetrischer Einheit.

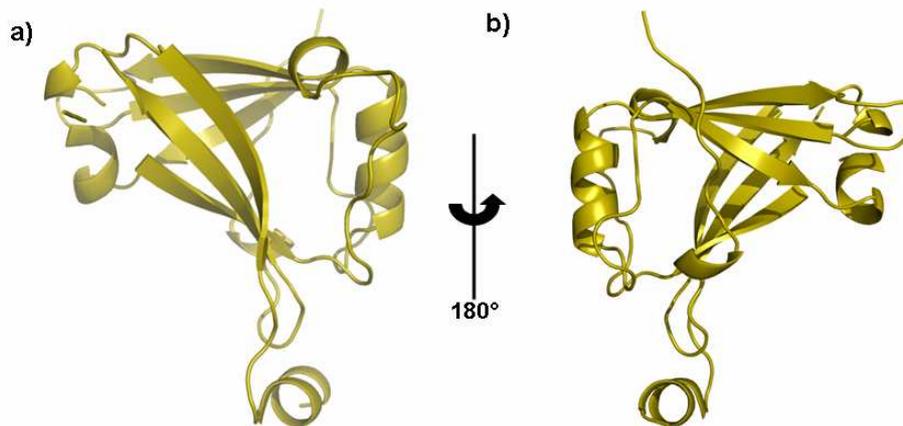


Abbildung 32: Monomer von BDVM R34/53A in zwei unterschiedlichen Orientierungen.

In Teilabbildung a) ist die Gesamtstruktur von BDVM R34/53A in dunkelgrün dargestellt. Man erkennt auch hier, wie für den *wt*, das zentrale in sich gedrehte β -Faltblatt, das von kleinen Helices flankiert wird. In Teilabbildung b) ist die Struktur um 180° um die y-Achse gedreht.



Abbildung 33: Tetramer von BDVM R34/53A.

Wie bereits für BDVM *wt* und auch für BDVM F37A beschrieben, kann aus dem in der asymmetrischen Einheit enthaltenen Monomer an Hand der Kristallsymmetrie die biologisch aktive Form des Tetramers erzeugt werden. Das Monomer der asymmetrischen Einheit von BDVM R34/53A ist in dunkelgrün dargestellt. Die drei durch die 4-zählige Symmetrie daraus erzeugten Monomere sind in grau abgebildet.

Wie für BDVM *wt* konnte auch für BDVM R34/53A zusätzliche nicht zum Protein gehörende Elektronendichte beobachtet werden. Dabei handelt es sich um ein C5P, das wie beim *wt* über eine Stapelungsinteraktion zwischen Phe37 und His112 gebunden ist. Es ist dabei interessant, dass nicht der gesamte Loop30 eine Elektronendichte aufweist, wohl aber die für die Interaktionen entscheidenden

Aminosäuren Phe37 und His112. Hingegen konnte keine Elektronendichte für die Reste 30 bis 35 beobachtet werden, wodurch dieser Bereich als flexibel gilt.

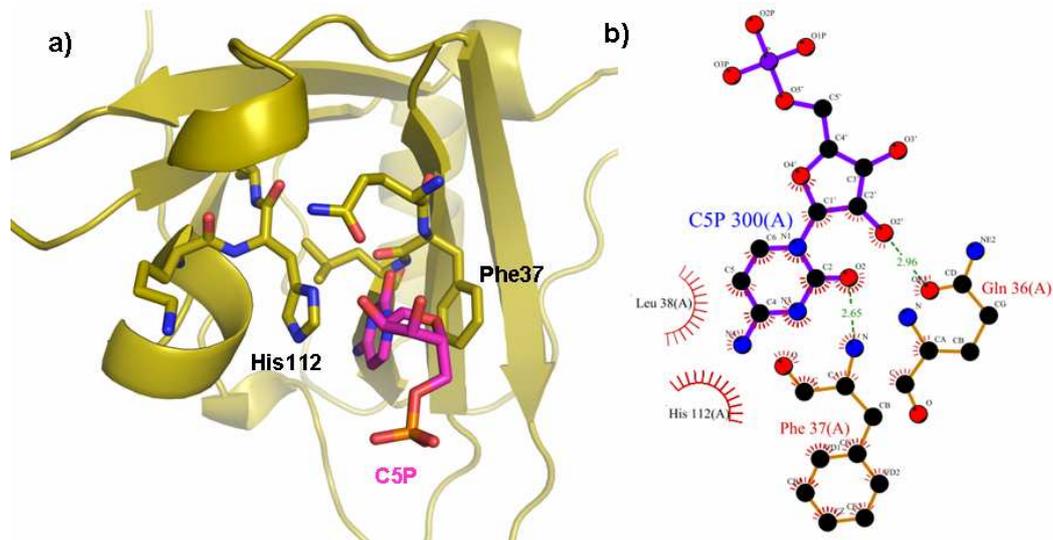


Abbildung 34: Bindungsstelle von C5P an BDVM R34/53A.

In Teilabbildung a) ist BDVM R34/53A in dunkelgrün dargestellt, wobei Phe37 und His112 als Stäbe wiedergegeben sind. Zusätzlich ist C5P als magentafarbene Stäbe abgebildet. Dabei fehlen im Bereich des Loop30 die Aminosäuren 30-35, da für diese keine Elektronendichte vorliegt. Die RNA-Protein-Interaktion ist in Teilabbildung b) schematisch dargestellt. C5P interagiert mit BDVM R34/53A über zwei Wasserstoffbrücken zwischen Gln36 und Phe37 und über zusätzliche hydrophobe Interaktionen zwischen Gln36, Phe37, Leu38 und His112.

Darüber hinaus konnte an einer zweiten Stelle von BDVM R34/53A nicht zum Protein gehörende Elektronendichte beobachtet werden. Dabei handelt es sich um die gleiche Position, an der auch schon in der R3-Kristallform von BDVM H112W Nukleinsäure gebunden ist. Doch an Stelle von 3GP ist bei BDVM R34/53A ein G5P gebunden. Dieses zeigt im Wesentlichen die gleichen RNA-Protein-Interaktionen wie sie zuvor für BDVM H112W R3 beschrieben wurden.

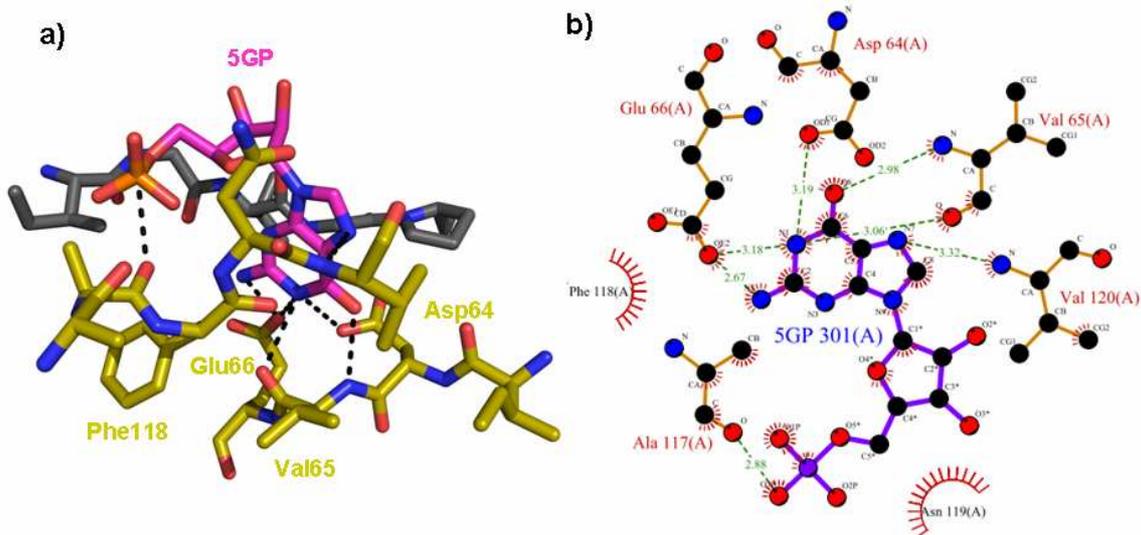


Abbildung 35: Interaktion zwischen 5GP und BDVM R34/53A.

In Teilabbildung a) ist ein Teilausschnitt von BDVM R34/53A in dunkelgrünen Stäben dargestellt. Zusätzlich ist 5GP als magentafarbene Stäbe abgebildet. Die RNA-Protein-Interaktion ist in Teilabbildung b) schematisch gezeigt. 5GP interagiert mit BDVM R34/53A über Wasserstoffbrücken zwischen Asp64, Val65, Glu66, Ala117 und Val120 sowie über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Phe118 und Asn119.

4.4.5 BDVM H112W R34/53A

Bei der Variante H112W R34/53A sollten die beiden Varianten BDVM H112W und BDVM R34/53A kombiniert werden. Durch die Mutation an Position H112W wurde ein Ausschluss der für BDVM *wt* beschriebenen RNA-Bindungsstelle angestrebt. Gleichzeitig sollte durch die Doppelmutation R34/53A die Ausbildung des Dodekamers, wie sie zuvor für BDVM H112W (4.4.2) beschrieben wurde, verhindert werden. Diese Variante kristallisierte ebenfalls in der Raumgruppe I432 mit einem Monomer in der asymmetrischen Einheit. Es zeigte sich für diese Variante wieder die für BDVM typische Faltung. Sie besteht aus dem zentralen, gedrehten β -Sandwich, das von kurzen α -Helices und Loop-Strukturen flankiert wird, wie es auch für den *wt* beobachtet werden konnte. Dabei ließ sich für diese Variante keine zusätzliche, auf gebundene Nukleinsäure hinweisende Elektronendichte nachweisen. Insbesondere im Bereich zwischen den Aminosäuren Phe37 und Trp112 wurde keine zusätzliche Elektronendichte beobachtet.

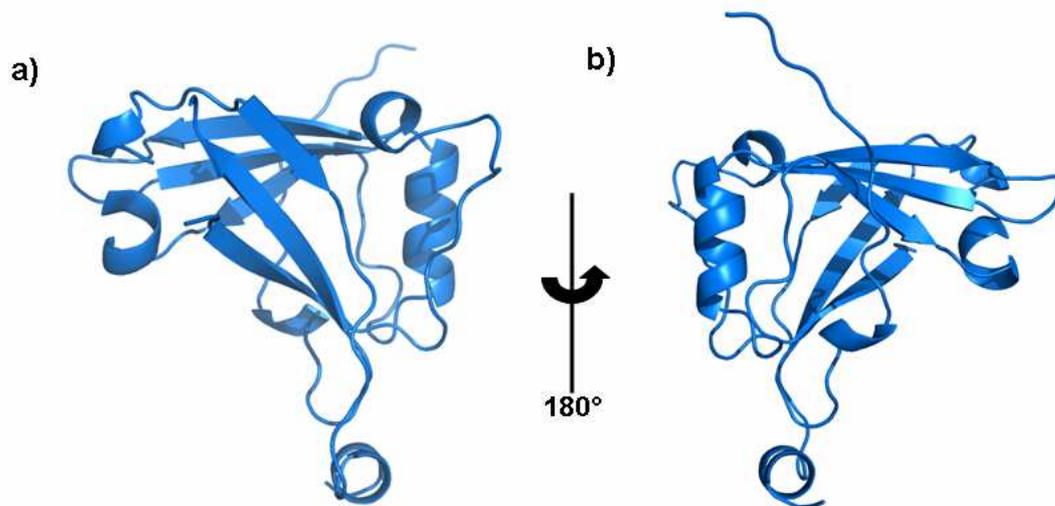


Abbildung 36: Monomer von BDVM H112W R34/53A, dargestellt in zwei Orientierungen.

In Teilabbildung a) ist die Gesamtstruktur von BDVM H112W R34/53A als blauer Cartoon dargestellt. Vergleichbar mit dem *wt* ist das zentrale in sich gedrehte β -Faltblatt, das von kleinen Helices und Loop-Strukturen flankiert wird. In Teilabbildung b) ist die Struktur um 180° um die y-Achse gedreht, so dass gut die typische L-Form des Proteins sichtbar wird.

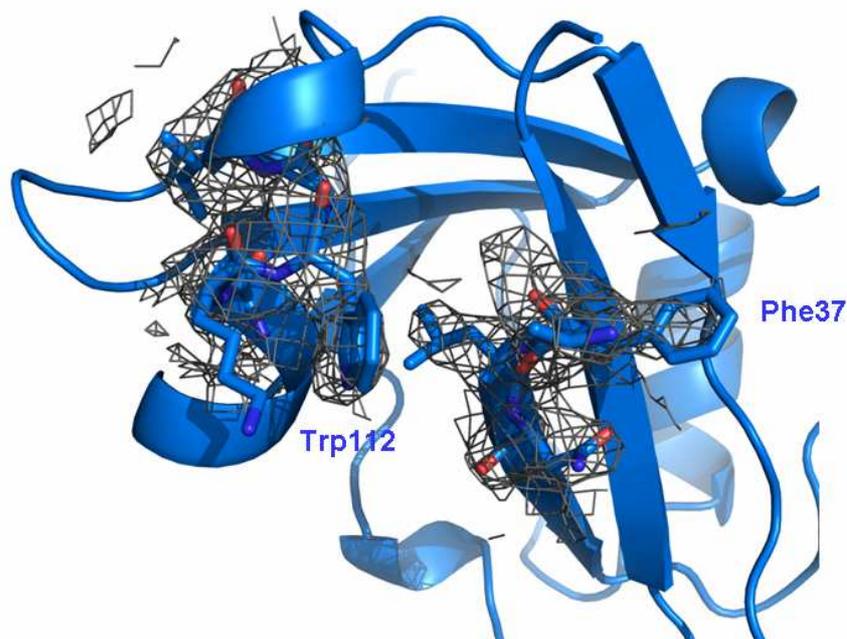


Abbildung 37: Ansicht der Region der RNA-Bindungsstelle von BDVM *wt* in BDVM H112W R34/53A.

In BDVM *wt* ist zwischen Aminosäure 37 und 112 eine Nukleinsäure gebunden. In BDVM H112W R34/53A, hier als blauer Cartoon dargestellt, ist im Bereich zwischen den Aminosäuren 35-37 und 110-114 (dargestellt als Stäbe) keine Elektronendichte (graues Netz, σ -Level 1,0) zu erkennen, die auf gebundene Nukleinsäuren schließen lässt.

4.4.6 BDVM H112W R34/53A D95N

Diese Variante basiert auf der in Abschnitt 4.4.5 beschriebenen Variante BDVM H112W R34/53A mit zusätzlich eingeführter Mutation D95N (4.7.4). In der Wachstumskinetik zeigte sich eine Infektiösität von BDVM H112W R34/53A nur bei Einführung einer zusätzlichen Mutation. Besonders bevorzugt scheint dabei eine Mutation des Asp an Position 95 zu einem Asn zu sein (Dautel *et al.* n.d.; Novotny 2011). Diese Variante kristallisierte wie BDVM H112W R34/53A in der Raumgruppe I432 mit einem Monomer in der asymmetrischen Einheit. Auch für BDVM H112W R34/53A D95N ergibt sich keine strukturelle Änderung. Der zugrunde liegende Faltungstyp enthält ein zentrales in sich gedrehtes β -Faltblatt, das von kleinen α -Helices und Loops flankiert wird.

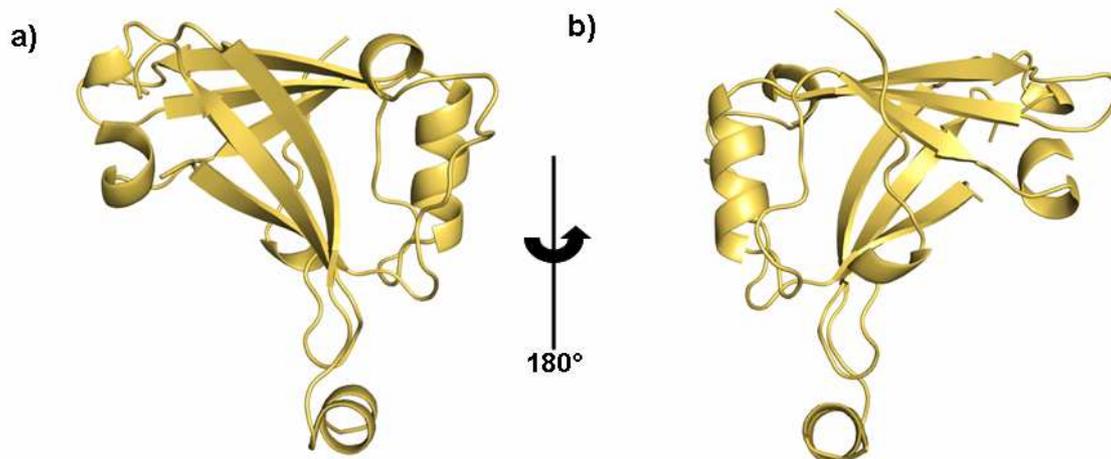


Abbildung 38: Darstellung von BDVM H112W R34/53A D95N in zwei Orientierungen.

In Teilabbildung a) ist die Gesamtstruktur von BDVM H112W R34/53A D95N als gelber Cartoon wiedergegeben. In Teilabbildung b) ist die Struktur um 180° um die y-Achse gedreht. Hierbei wird die BDVM-typische L-Form des Proteins sichtbar.

Es stellte sich auch bei dieser Variante die Frage, ob sich an Hand der Elektronendichte gebundene Nukleinsäuren identifizieren lassen. Von besonderem Interesse ist hierbei die für den *wt* beschriebene RNA-Bindungsstelle im Bereich zwischen den Aminosäuren 37 und 112. Dort konnte für BDVM H112W R34/53A D95N keine zusätzliche Elektronendichte beobachtet werden, die auf gebundene RNA hindeutet. Das gleiche gilt auch für BDVM H112W und BDVM H112W R34/53A, jedoch nicht für die weiteren beschriebenen Varianten.

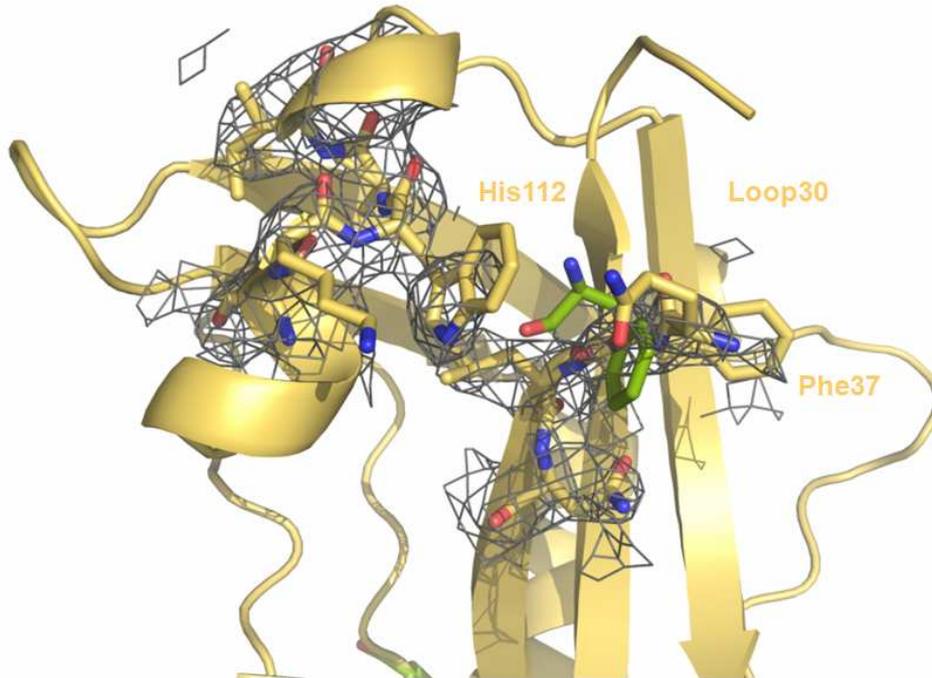


Abbildung 39: Potentielle RNA-Bindungsstelle in BDVM H112W R34/53A D95N.

Im Bereich zwischen den Aminosäuren 35-39 und 110-114 (die als gelbe Stäbe dargestellt sind) konnte keine zusätzliche Elektronendichte (graues Gitter, σ -Level 1,0) identifiziert werden. Der Rest des Proteins ist als gelber Cartoon abgebildet. Man kann jedoch erkennen, dass die Aminosäure Phe37 von ihrer ursprünglichen *wt*-Position (dargestellt in grünen Stäben) weggeklappt ist, so dass keine Stapelungs-Interaktion zwischen Trp112, RNA-Base und Phe37 möglich ist.

4.4.7 Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes verschiedener BDVM-Varianten

Bei der Größenausschlusschromatographie werden Partikel beim Durchströmen einer porösen Matrix auf Grund ihrer Größe separiert. Durch Bestimmung des Retentionsvolumens lässt sich auf das relative Molekulargewicht und damit auch auf den Oligomerisierungszustand der jeweiligen Variante schließen. Als Referenz wurde eine Mischpopulation von BDVM *wt* in seinem oktameren und tetrameren Oligomerisierungszustand verwendet. Entsprechend eluierte BDVM *wt* in zwei Peaks, wobei das kleinere Retentionsvolumen den oktameren und das größere Retentionsvolumen den tetrameren Zustand repräsentierte (Abbildung 40). BDVM R34/53A eluierte in nur einem Peak, dessen Retentionsvolumen dem des tetrameren BDVM *wt* entsprach. BDVM H112W eluierte in einem nachziehenden Peak, dessen Peakspitze bei einem geringeren Retentionsvolumen lag als das der beiden BDVM *wt*-Zustände. Ebenfalls in einem Peak eluieren die Varianten

BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N mit dem größten Retentionsvolumen aller Proteine. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden wurde das relative Molekulargewicht aus den ermittelten Retentionsvolumina berechnet (Tabelle 6).

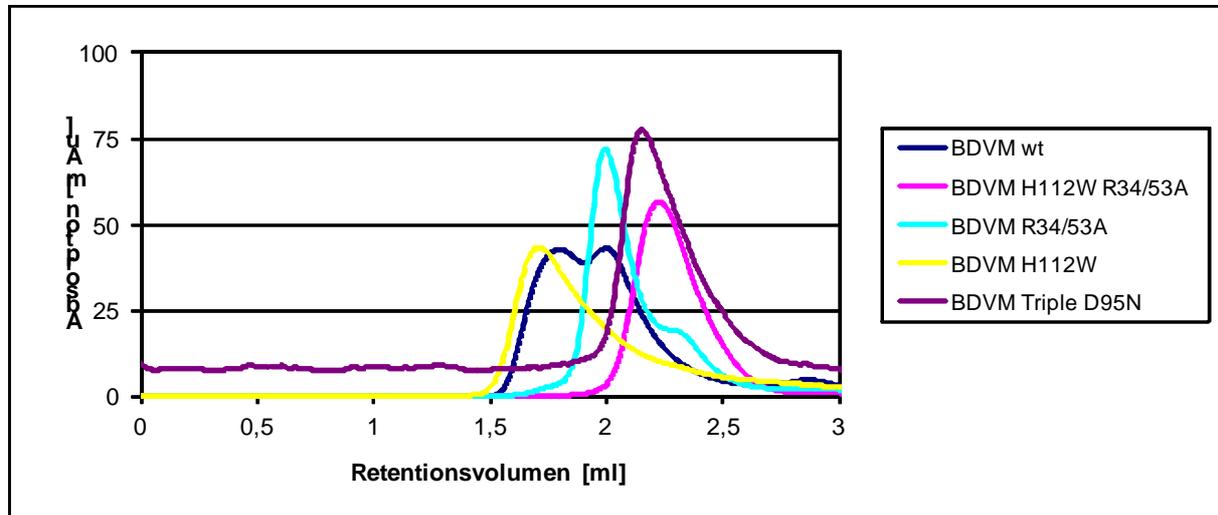


Abbildung 40: Analyse der Oligomerisierungszustände verschiedener BDVM-Varianten durch Größenausschlusschromatographie.

BDVM *wt* kommt entweder als Oktamer oder Tetramer vor, entsprechend ergeben sich zwei Peaks nach der Größenausschluss-Chromatographie. Die erste Peakspitze repräsentiert den oktameren und die zweite Peakspitze den tetrameren Zustand. BDVM H112W eluierte in einem nachlaufenden Peak mit einem kleineren Retentionsvolumen. BDVM R34/53A eluierte als einzelner Peak. Dessen Retentionsvolumen war vergleichbar mit dem des tetrameren BDVM *wt*. BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N eluierten ebenfalls in einem Peak bei einem Retentionsvolumen, das höher lag als das für tetrameres *wt* BDVM.

Tabelle 6: Auf Basis des ermittelten Retentionsvolumens der Größenausschlusschromatographie berechnete relative Molekulargewichte verschiedener BDVM-Varianten.

Mit Hilfe der ermittelten Kalibrierungsgeraden wurde an Hand der experimentell ermittelten Retentionsvolumina der verschiedenen BDVM-Varianten das relative Molekulargewicht in kDa berechnet.

Variante	Retentionsvolumen [ml]	relatives Molekulargewicht [kDa]
BDVM <i>wt</i> Tetramer	2,03	53,0
BDVM <i>wt</i> Oktamer	1,84	99,7
BDVM H112W	1,70	158,9
BDVM R34/53A	2,01	56,6
BDVM H112W R34/53A	2,26	24,7
BDVM H112W R34/53A D95N	2,18	32,2

4.4.8 Blue Native PAGE zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes der BDVM-Varianten

Bei der Blue Native PAGE handelt es sich um eine Sonderform der Polyacrylamidgelelektrophorese, bei der Proteine in ihrem nativen Zustand in Abhängigkeit ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, ergab sich für die tetramere Fraktion von BDVM ein Bandenmuster mit drei Banden. Für die oktamere Fraktion von BDVM *wt* wurde die gleiche Auftrennung erhalten. Auffallend war dabei, dass keine der Banden bei dem theoretischen Molekulargewicht lag. So zeigte sich die tetramere Bande bei etwa 130 kDa und die oktamere bei 260 kDa. Das theoretische Molekulargewicht dieser Zustände betrug dabei 65 bzw. 130 kDa. Der Unterschied im relativen Molekulargewicht ist dabei vermutlich auf eine ungenügende Maskierung mit dem verwendeten Farbstoff zurückzuführen. Für BDVM H112W war nur eine Bande auf der Höhe der obersten Bande von BDVM *wt* zu erkennen. BDVM R34/53A zeigte ein Laufverhalten, wie es auch für BDVM *wt* beobachtet werden konnte, ohne jedoch eine Bande auf Höhe von BDVM H112W aufzuweisen. BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N wiesen jeweils vier Banden auf. Zwei, die auf gleicher Höhe wie die tetramere und oktamere Bande BDVM *wt* lagen, und zwei, mit einem geringeren relativen Molekulargewicht. Eine zusätzlich durchgeführte SDS-PAGE (nicht gezeigt) wies auf keinen sichtbaren Proteinabbau oder Probenverunreinigungen hin. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Banden mit kleinerem relativen Molekulargewicht von BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N um Abbauprodukte handelt. Schlussfolgerend liegen BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N in einem Oligomerisierungszustand kleiner eines Tetramers vor. Auf Grund der ungenügenden Übereinstimmung zwischen BDVM *wt* in seinem tetrameren und oktameren Zustand mit dem Marker ist keine Abschätzung des relativen Molekulargewichts möglich.

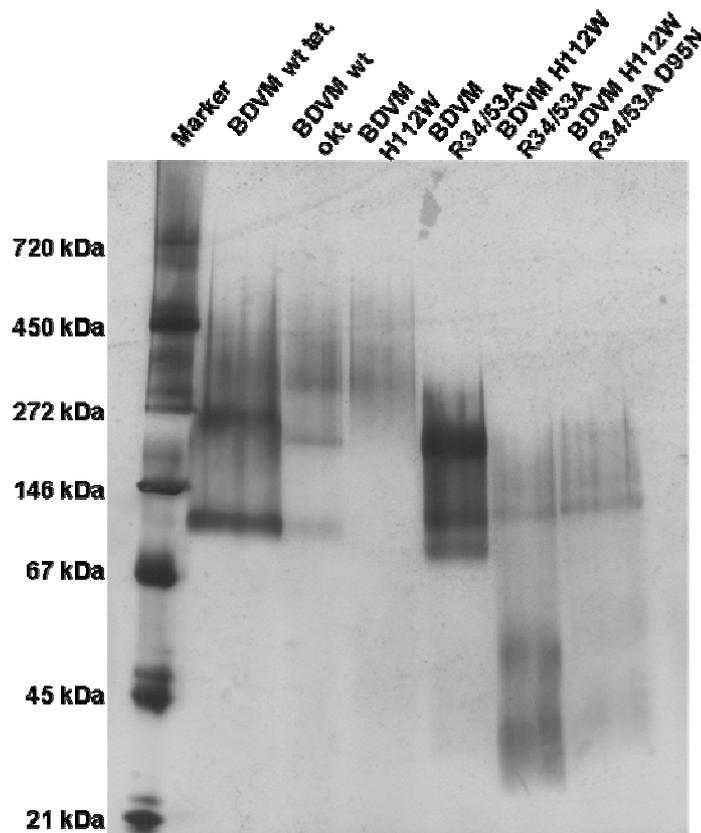


Abbildung 41: Blue Native PAGE verschiedener BDVM-Varianten.

Auf dem 4-16%igen Gradientengel sind von links nach rechts die Varianten BDVM *wt* Tetramer und Oktamer, BDVM H12W, BDVM R34/53A, BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N aufgetragen. Zur Abschätzung des relativen Molekulargewichts diente der Marker in der ersten Spur. Es ist deutlich zu erkennen, dass die verschiedenen BDVM-Varianten in unterschiedlichen Oligomerisierungszuständen vorkommen können. Neben dem tetrameren (65 kDa) und oktameren (130 kDa) Zustand, der für BDVM *wt* bekannt ist, weist BDVM H112W einen bisher unbekannt höheren Oligomerisierungszustand auf. Dagegen liegen BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N in Oligomerisierungszuständen kleiner als die des *wt* vor.

4.4.9 Analytische Ultrazentrifugation zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation lässt sich das relative Molekulargewicht eines Makromoleküls mit hoher Genauigkeit unabhängig von seiner Form bestimmen. Für die unter 4.4.8 beschriebenen Varianten von BDVM ergaben sich im Gleichgewichtslauf der analytischen Ultrazentrifugation folgende relative Molekulargewichte der Proben (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht der durch analytische Ultrazentrifugation bestimmten apparenten Molekulargewichte verschiedener BDVM-Varianten.

Variante	Konzentration [mg/ml]	s(apparent) [S]	relatives Molekulargewicht [kDa]
BDVM <i>wt</i>	0,3		65 (Kraus <i>et al.</i> 2005b)
BDVM H112W	0,3	8,7	170
BDVM R34/53A	0,3	3,9	62
BDVM H112W R34/53A	0,3	~1	16
BDVM H112W R34/53A D95N	0,3	<1	15

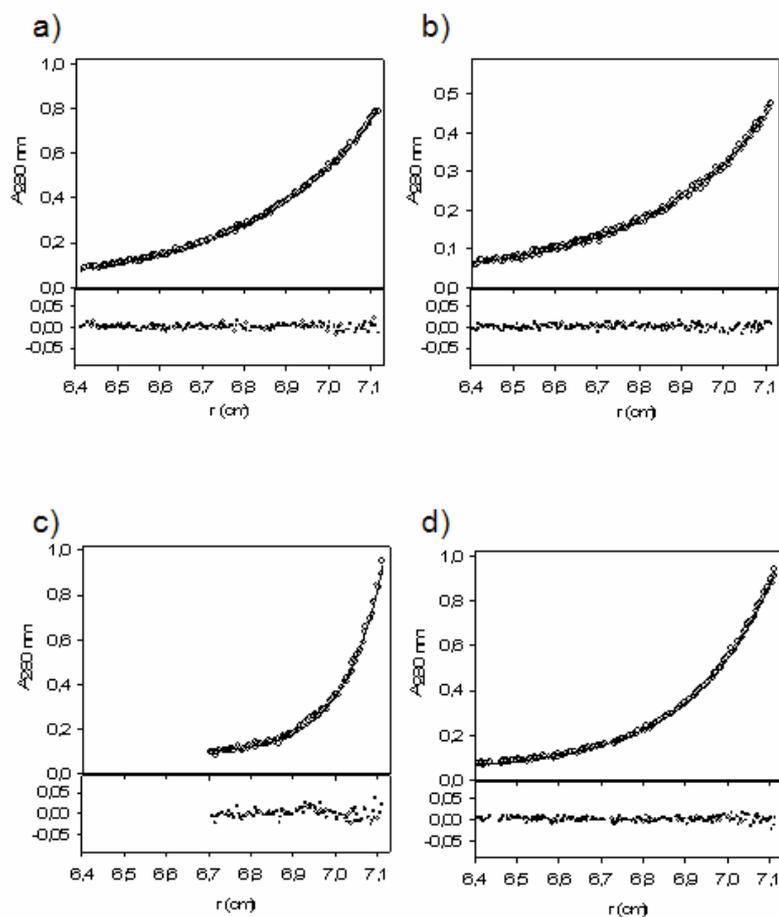


Abbildung 42: Datenpunkte der analytischen Ultrazentrifugationsläufe von a) BDVM H112W R34/53A, b) BDVM H112W R34/53A D95N, c) BDVM H112W und d) BDVM R34/53A.

Dargestellt sind die Daten der Sedimentationsgleichgewichtsläufe von vier verschiedenen BDVM-Varianten bei einer jeweiligen Konzentration von 0,3 mg/ml in 50 mM HEPES, 150 mM NaCl bei pH 7,6. Für die Varianten in a) und b) wurde dabei eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 16000 rpm, für c) 8000 und für d) von 10000 rpm angewandt. Die aus diesen Daten berechneten relativen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Die Ultrazentrifugationsläufe der Varianten BDVMH112W R34/53A, BDVM H112W R34/53A D95N, BDVM H112W und BDVM R34/53A sind in Abbildung 42 dargestellt. Dabei wiesen alle Proben eine Konzentration von 0,3 mg/ml auf. Im Fall von BDVM H112W zeigte sich ein leichtes Schwanken der Basislinie, die das Experiment allerdings nicht beeinflusst hat.

Im Vergleich der drei dargestellten Methoden zur Bestimmung des relativen Molekulargewichtes ist die analytische Ultrazentrifugation die genaueste Methode, da die Form des Proteins keine Einflussgröße ist. Zusätzlich ergaben sich Ergebnisübereinstimmungen im Vergleich mit der Bestimmung des relativen Molekulargewichts durch Größenausschlusschromatographie (4.4.7). In beiden Fällen wurde für BDVM H112W ein Dodekamer mit Hinweis auf weitere nieder-oligomere Spezies, für BDVM R34/53A nur ein Tetramer und für BDVM H112W R34/53A bzw. D95N jeweils ein Monomer ermittelt. Die Blue Native PAGE (4.4.8) deutete hingegen für alle untersuchten Varianten höheroligomere Spezies an, die mit den anderen beiden Methoden nicht bestätigt werden konnten.

4.5 Membranbindungseigenschaften von BDVM und seinen Varianten

Die Fähigkeit von viralen Matrixproteinen zur Interaktion mit Lipiden ist Voraussetzung dafür, dass die Matrixproteine eine ihrer natürlichen Funktionen, das Auskleiden der inneren Virushülle, ausüben können (Harty 2009; Ge *et al.* 2010). Um diese Eigenschaft der rekombinant exprimierten BDVM-Varianten zu untersuchen, wurde als Modellsystem eine Lipidmonoschicht verwendet. Bei dieser wurde die Interaktion des Proteins mit den Lipiden über die Veränderung des Oberflächendrucks verfolgt (Maget-Dana 1999). Um eine möglichst genaue Simulation des natürlichen Lipidumfelds von BDVM zu erreichen, wurde ein polarer Lipidextrakt aus dem Schweinegehirn verwendet.

Bereits bei der Kontrollmessung (Wasser) war eine Abnahme des Oberflächendrucks im polaren Gehirnextrakt mit der Zeit zu erkennen. Deutlich stärker war dieser Effekt jedoch bei der Injektion der BDVM-Varianten in die wässrige Subphase. Für BDVM *wt*, im Gemisch aus Tetramer und Oktamer vorliegend, zeigte sich eine nahezu lineare Abnahme des Oberflächendrucks in Abhängigkeit von der

Zeit. Etwas geringer fiel diese Abnahme des Oberflächendrucks für die Varianten BDVM H112W R34/53 (Triple) und BDVM H112W R34/53A D95N (Triple D95N) aus. Zum Beginn der Messung sank der Oberflächendruck schneller ab als im Vergleich zu BDVM wt, stabilisierte sich dann aber um den Wert von 18 mN/m, während der Oberflächendruck für die anderen BDVM-Varianten bis zum Ende der Messung hin nahezu linear abfiel. Für BDVM R34/53A ergab sich eine deutlich geringere Abnahme des Oberflächendrucks während der Messung. Allerdings ist der Kurvenverlauf mit dem von BDVM wt vergleichbar. Zur geringsten Abnahme des Oberflächendrucks kam es für die Variante BDVM H112W.

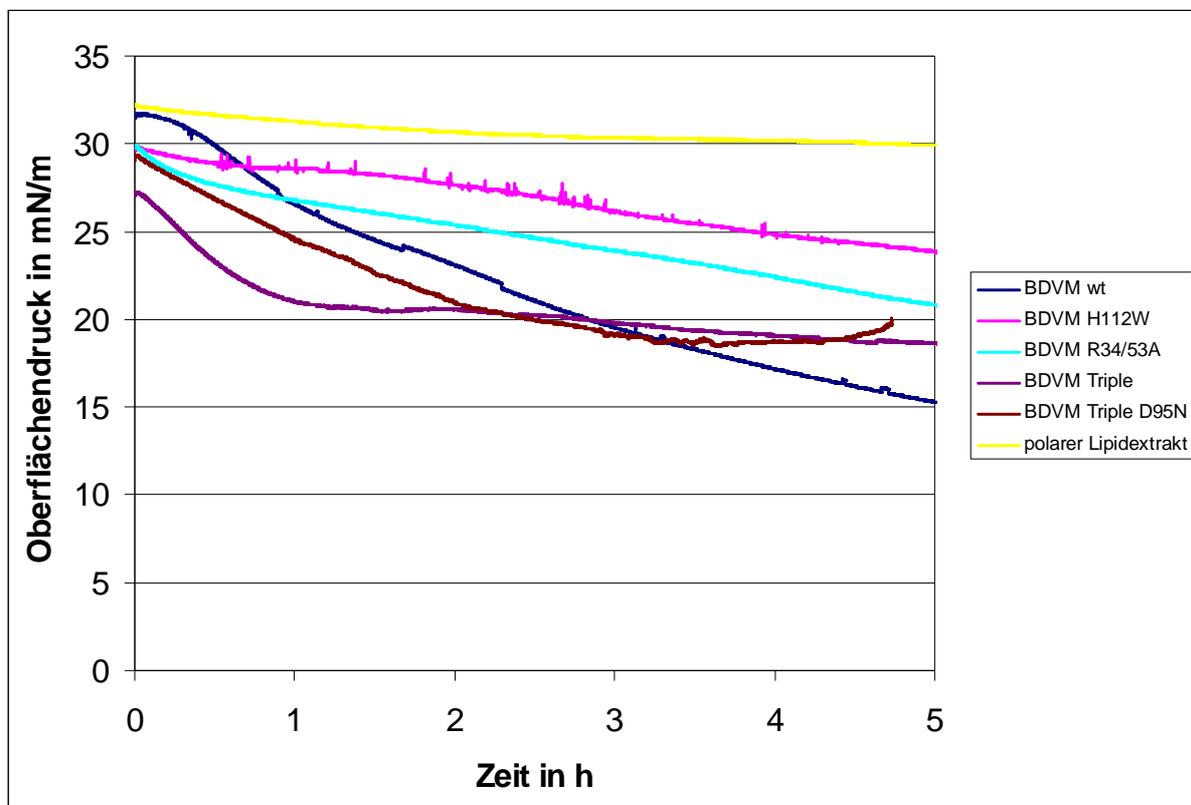


Abbildung 43: Messung der Oberflächenspannung nach Injektion von Protein in die Subphase.

Im zeitlichen Verlauf ist zu erkennen, dass nach Injektion des Proteins in die wässrige Subphase der Oberflächendruck mit der Zeit abnimmt. Am deutlichsten war dieser Effekt für BDVM wt, das als Mischfraktion aus Tetramer und Oktamer vorlag. Einen schwächeren Effekt auf den Oberflächendruck zeigten die beiden Varianten BDVM H112W R34/53A (Triple) und BDVM H112W R34/53A D95N (Triple D95N). Das Absinken des Oberflächendrucks war für BDVM R34/53A nochmals verringert und BDVM H112W zeigte den schwächsten Effekt in diesem Experiment. Als Kontrolle wurde in der Messung mit polarem Lipidextrakt ein vergleichbares Volumen Wasser injiziert.

4.6 Extraktion und Analyse der von BDVM gebundenen Nukleinsäuren

Zur Untersuchung der Nukleinsäurebindungseigenschaften und Auftrennung nach der Größe wurden die verschiedenen BDVM-Varianten zunächst gereinigt, die vorhandene Nukleinsäure extrahiert und anschließend radioaktiv markiert. Für die RNA-Sequenzierung musste die extrahierte RNA in DNA umgeschrieben und in *E. coli* kloniert werden.

4.6.1 Untersuchung von gereinigtem Protein auf gebundene Nukleinsäuren

Wie in 1.4.1 bereits beschrieben, kann der *wt* von BDVM ssRNA binden. Um einen ersten Hinweis auf die Nukleinsäurebindungseigenschaften der BDVM-Varianten zu bekommen, wurde von allen gereinigten Varianten ein Absorptionsspektrum im Bereich von 240 bis 320 nm aufgenommen. So wurde gleichzeitig der Bereich erfasst, in dem Nukleinsäuren (bei 260 nm) und Proteine (bei 280 nm) das eingestrahelte Licht maximal absorbieren. Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen, ob und welche Menge an Nukleinsäuren an die BDVM-Varianten gebunden war, wurden die erhaltenen Spektren auf einen Wert von 1 bei 280 nm normiert. Wie in Abbildung 44 dargestellt, wiesen die unterschiedlichen Varianten von BDVM bei einer auf eins normierten Absorption bei 280 nm deutlich unterschiedliche Absorptionen bei 260 nm auf. Die Absorption von BDVM H112W R34/53A lag bei 260 nm am niedrigsten und die der Variante BDVM H112W R34/53A D95N am höchsten.

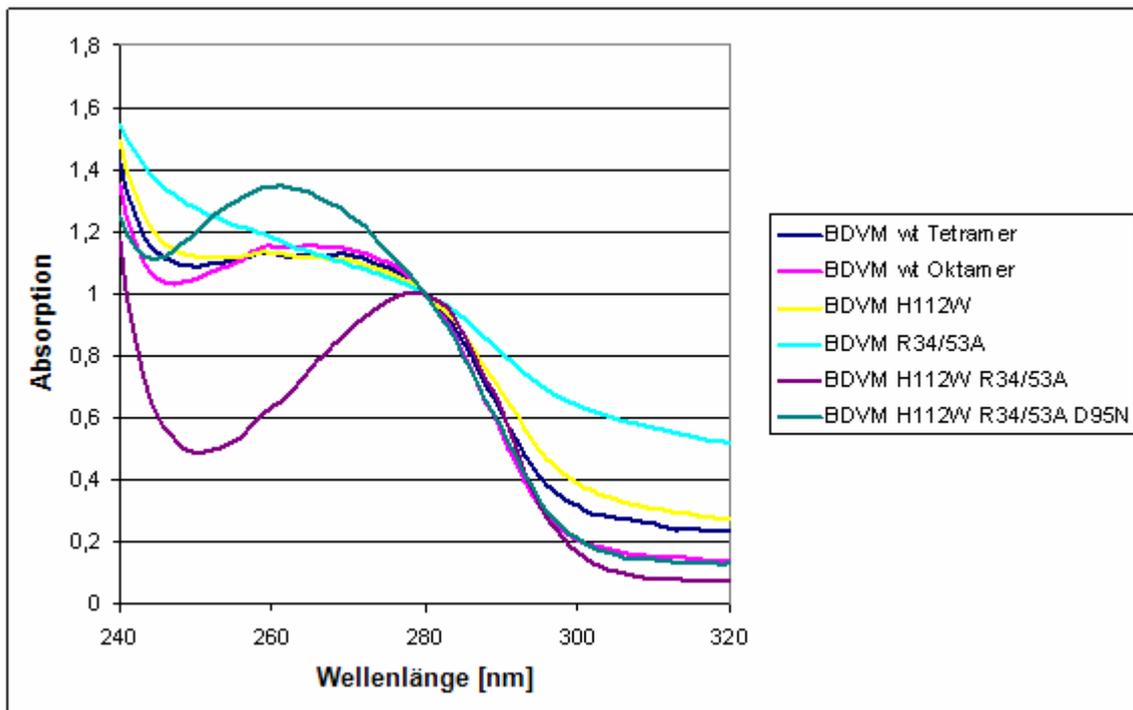


Abbildung 44: Normierte Spektren verschiedener BDVM-Varianten im Wellenlängenbereich von 240 bis 320 nm.

Zum Vergleich der Menge an möglicherweise gebundener Nukleinsäure wurden die Spektren verschiedener BDVM-Varianten im Wellenlängenbereich von 240 bis 320 nm aufgenommen und auf einen Wert von 1 bei 280 nm normiert. Die Variante BDVM H112W R34/53A wies eine wesentlich geringere Absorption bei 260 nm auf als die anderen Varianten. Die höchste Absorption bei 260 nm zeigte die Variante BDVM H112W R34/53A D95N. Die anderen dargestellten Varianten besitzen eine ähnliche Absorption bei 260 nm.

Ein anderes und übersichtlicheres Maß für den Gehalt an gebundener Nukleinsäure ist der Quotient der Absorption bei 280 nm, dividiert durch die Absorption bei 260 nm. Dabei gilt allgemein, dass ein Wert von $\frac{A_{280}}{A_{260}} \geq 1,75$ auf ein Protein hinweist, das frei von Verunreinigung mit Nukleinsäuren ist (Warburg & Christian 1941). Liegt das Verhältnis unterhalb dieses Wertes, gibt es qualitativ den prozentualen Anteil an enthaltener Nukleinsäure an. Darüber hinaus lässt sich aus dem Verhältnis ein Korrekturfaktor bestimmen. Mit dessen Hilfe kann die alleinige Absorption des Proteins bei 280 nm abgeschätzt werden.

Tabelle 8: Übersicht über die Absorptionswerte verschiedener BDVM-Varianten bei 280 und 260 nm sowie die daraus resultierenden Quotienten A_{280}/A_{260} .

Zu der jeweiligen Variante von BDVM und deren Oligomerisierungszustand ist die Absorption bei 280 und 260 nm angegeben. Der daraus berechnete Quotient A_{280}/A_{260} gibt Auskunft darüber, wieviel Nukleinsäure in Prozent in der jeweiligen Probe enthalten ist.

BDVM Variante	A_{280}	A_{260}	A_{280}/A_{260}	Korrekturfaktor	Nukleinsäure [%]
<i>wt</i> Tetramer	0,177	0,200	0,89	0,68	5,00
<i>wt</i> Oktamer	0,240	0,276	0,87	0,68	5,00
R53A	0,376	0,439	0,86	0,68	5,00
F37A	0,738	0,743	0,99	0,78	3,50
R34/53A	0,600	0,623	0,96	0,76	3,75
H112W	0,278	0,315	0,88	0,68	5,00
H112W R34/53A	0,229	0,145	1,58	1,06	0,35
H112W R34/53A D95N	0,141	0,189	0,75	0,55	8,00

In Tabelle 8 sind die Absorptionswerte bei 280 und 260 nm für verschiedene BDVM-Varianten wiedergegeben. Zusätzlich ist der Korrekturfaktor k für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Warburg & Christian (Warburg & Christian 1941) aufgeführt. Die Varianten BDVM *wt* Tetramer und Oktamer, BDVM R53A und BDVM H112W zeigten einen vergleichbaren Quotienten A_{280}/A_{260} . Für die Varianten BDVM F37A und BDVM R34/53A ergab sich ein geringerer Gehalt an Nukleinsäure als für die Variante BDVM H112W R34/53A. Den höchsten Gehalt an Nukleinsäure wies die Variante BDVM H112W R34/53A D95N auf.

4.6.2 Extraktion der an BDVM gebundenen RNA nach Reinigung des Proteins

Das gereinigte Protein wurde durch Proteinase K proteolytisch verdaut und anschließend die vorhandene Nukleinsäure über Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Von jeder Probe wurde ein Spektrum im Bereich von 240 bis 320 nm aufgenommen. Entscheidend sind dabei die Absorptionswerte bei 260, 270 und 280 nm. Diese geben Auskunft über die Konzentration und Qualität der Nukleinsäure und die Verunreinigung der Probe mit Phenol oder nicht abgetrenntem Protein.

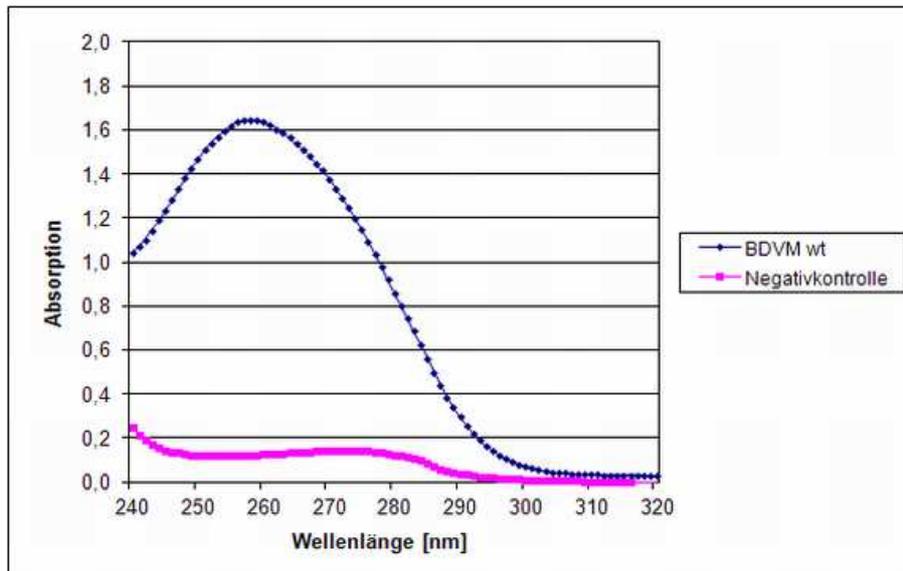


Abbildung 45: Spektrum der isolierten Nukleinsäure aus BDVM *wt* und der Negativkontrolle im Bereich von 240 bis 320 nm.

Dargestellt ist die Absorption der extrahierten Nukleinsäuren aus BDVM *wt* und BSA als Negativkontrolle. Es ist zu erkennen, dass nur die extrahierte Nukleinsäure aus BDVM *wt* Absorption mit einem Maximum im Bereich um 260 nm aufweist. Die Negativkontrolle zeigt hingegen nur eine sehr geringe Absorption mit einem Maximum bei etwa 270 nm, was auf eine Verunreinigung mit Phenol hindeutet.

Tabelle 9: Übersicht über die Reinheit und Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren nach der Reinigung verschiedener BDVM-Varianten.

Für alle Varianten und die Negativkontrolle (BSA) sind die spektroskopisch bestimmten Werte einer 1:30 Verdünnung bei 260, 270 und 280 nm gezeigt. Die daraus berechnete Gesamtausbeute an Nukleinsäure pro 1 mg gereinigtem Ausgangsprotein ist in der letzten Spalte angegeben.

Variante	Wellenlänge [nm]			A_{260}/A_{280}	total RNA [ng]
	A_{260}	A_{270}	A_{280}		
Negativkontrolle	0,006	0,005	0,004	1,50	240
BDVM <i>wt</i> Tetramer	0,094	0,079	0,046	2,04	3760
BDVM <i>wt</i> Oktamer	0,237	0,195	0,116	2,04	9480
BDVM H112W	0,103	0,088	0,055	1,87	4120
BDVM R34/53A	0,146	0,121	0,072	2,03	5840
BDVM H112W R34/53A	0,007	0,007	0,005	1,40	280
BDVM Triple D95N	0,079	0,069	0,047	1,68	3160

Um einen Vergleich aller extrahierten Nukleinsäureproben der verschiedenen BDVM-Varianten zu ermöglichen, sind die Absorptionswerte in Tabelle 9 zusammengefasst. Dabei wurde die Nukleinsäurekonzentration analog zu 3.6.4 berechnet. Es konnte aus allen BDVM-Varianten mit Ausnahme von BDVM H112W R34/53A Nukleinsäure extrahiert werden. Für BDVM H112W R34/53A lag die ermittelte Nukleinsäurekonzentration der Probe bei einem mit der

Negativkontrolle (BSA) vergleichbaren Wert. Bei allen Varianten außer BDVM H112W lag der Wert bei 270 nm deutlich unter dem bei 260 nm. Für diese Variante wurde ein aus den bestimmten Absorptionen von 260 und 280 nm errechneter Quotient zwischen 1,68 und 2,04 berechnet, was auf reine extrahierte RNA hindeutet.

4.6.3 5'-Dephosphorylierung der Nukleinsäureproben

Um eine effektive radioaktive 5'-Markierung der extrahierten Nukleinsäuren zu erreichen, wurde durch Alkalische Phosphatase (CIP) die Dephosphorylierung des 5'-Endes der extrahierten RNA sichergestellt. Das ist Voraussetzung für die Eignung der RNA als Substrat der PNK. Da die CIP die Rückreaktion der PNK ausführt, wurde die Nukleinsäureprobe nach Behandlung mit CIP erneut einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen, um die Nukleinsäure von CIP-Aktivität zu befreien. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 10. Auch nach der 5'-Dephosphorylierung mit CIP war es erneut möglich, aus allen RNA enthaltenden Proben Nukleinsäuren zu isolieren. Ebenso wie für die erste Nukleinsäureisolierung war auch hier jeweils die Absorption bei 270 nm geringer als bei 260 nm. Im Gegensatz zu der ersten Nukleinsäureisolierung ist auffallend, dass sowohl die Konzentrationen als auch der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm deutlich geringer waren.

Tabelle 10: Übersicht über die Reinigung der Nukleinsäureproben nach 5'-Dephosphorylierung durch CIP.

Aufgelistet ist die Ausbeute der Nukleinsäureextraktion nach deren 5'-Dephosphorylierung durch CIP. Gelistet sind die spektroskopischen Messwerte bei 260, 270 und 280 nm einer 1:30 Verdünnung sowie die errechnete Gesamtausbeute an RNA. Ebenfalls dargestellt ist der Quotient aus den bestimmten Absorptionen bei 260 und 280 nm.

Variante	Wellenlänge [nm]			A_{260}/A_{280}	total RNA [ng]
	A_{260}	A_{270}	A_{280}		
Negativkontrolle	0,004	0,004	0,003	1,33	240
BDVM <i>wt</i> Tetramer	0,031	0,029	0,026	1,19	1860
BDVM <i>wt</i> Oktamer	0,120	0,110	0,092	1,30	7200
BDVM H112W	0,067	0,064	0,059	1,15	4030
BDVM R34/53A	0,033	0,029	0,023	1,43	1980
BDVM H112W R34/53A	0,004	0,004	0,003	1,33	240
BDVM Triple D95N	0,038	0,033	0,025	1,52	2280
Marker (10-, 15-, 20-mer)	0,028	0,027	0,026	1,08	1680
Poly-(A) ₁₄	0,025	0,025	0,022	1,14	1500

4.6.4 5'-radioaktive Markierung der Nukleinsäureproben durch PNK und anschließender Verdau mit RNase T₁

Bei der Polynukleotidkinase handelt es sich um ein Enzym, das die γ -ständige Phosphatgruppe von γ -[³²P]-ATP auf ein freies 5'-OH-Ende einer Nukleinsäure überträgt und diese so markiert. Dabei unterscheidet die PNK weder zwischen DNA und RNA, noch ob diese einzel- oder doppelsträngig ist. Darüber hinaus ist die PNK auch in der Lage, sehr kurze Fragmente bis hin zu Dinukleotiden als Substrat zu akzeptieren. Durch diese Markierung wird nach der Auftrennung der isolierten RNA im denaturierten Harnstoffgel die Detektion einzelner Banden ermöglicht.

Nach der 5'-radioaktiven Markierung war für alle Nukleinsäureextrakte der BDVM-Varianten, außer für BDVM H112W R34/53A, ein Bandenmuster zu erkennen (Abbildung 46). Für die aus der tetrameren Fraktion von BDVM *wt* isolierten Nukleinsäuren waren Banden im Bereich zwischen drei bis sieben und 15 bis 17 Nukleotiden sichtbar. Für die oktamere Fraktion zeigten sich Banden im Bereich von 13 bis 20 Nukleotiden. Die Nukleinsäuren aus BDVM H112W wiesen ein ähnliches Bandenmuster im Bereich von 13 bis 20 Nukleotiden auf. Für die Variante BDVM R34/53A war ein vergleichbares Bandenmuster wie für den Tetramer von BDVM *wt* im Bereich von fünf bis 14 Nukleotiden sichtbar. Für BDVM H112W R34/53A war kein Signal zu erkennen. Die Fraktion der Variante BDVM H112W R34/53A D95N zeigte hingegen ein Bandenmuster der extrahierten Nukleinsäuren im Bereich von 7, 12 und 30 bis 40 Nukleotiden. Diese verschiedenen Bandenmuster deuten darauf hin, dass die unterschiedlichen BDVM-Varianten zur Bindung verschieden langer Nukleinsäure-Fragmente in der Lage sind.

Um eine Unterscheidung treffen zu können, ob es sich bei dem Nukleinsäureisolat tatsächlich um RNA handelte und ob diese einzel- oder doppelsträngig vorlag, wurde die extrahierte Nukleinsäure mit RNase T₁ verdaut. RNase T₁ ist eine Endonuklease, die spezifisch einzelsträngige RNA nach Guanosin-Resten schneidet. Der Erfolg des RNase T₁-Verdaus zeigte sich durch das entstehende typische Leiternmuster (Abbildung 46 b)). Für die Nukleinsäuren der tetrameren Fraktion von BDVM *wt* ergaben sich sehr kurze Fragmente, die deutlich unter der Markerbande von zehn Nukleotiden auftraten. Für die oktamere Fraktion von BDVM *wt* und das verdaute Nukleinsäureisolat aus BDVM H112W zeigte sich ein ähnliches Bandenmuster, das vergleichbar mit einer Leiter im Bereich von ein bis 15 Nukleotiden ist. BDVM R34/53A wies ein vergleichbares Bandenmuster wie

BDVM H112W auf. Für BDVM H112W R34/53A konnte erneut keine Bande detektiert werden. BDVM H112W R34/53A D95N wies ebenfalls ein leiterartiges Bandenmuster im Bereich von 2 bis 15 Nukleotiden auf, mit stärker ausgeprägten Banden bei 9 und 10 Nukleotiden.

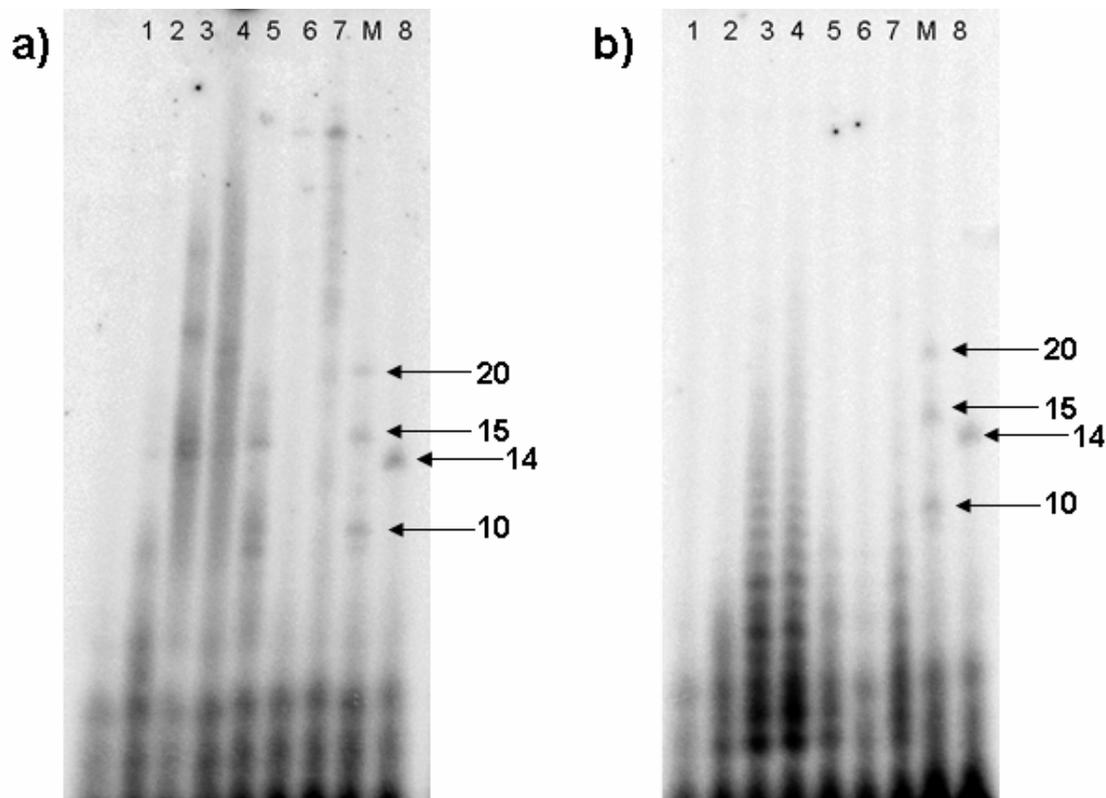


Abbildung 46: Denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel zur Auftrennung der 5'-markierten Nukleinsäureisolate a) vor und b) nach Verdau mit RNase T₁.

Nach Extraktion, 5'-Dephosphorylierung und 5'-radioaktiver Markierung wurden die Nukleinsäureproben auf einem 20%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Spur 1 zeigt die Extraktion aus BDVM H112W R34/53A, Spur 2 die extrahierte Nukleinsäure der tetrameren und Spur 3 die der oktameren Fraktion von BDVM *wt.* Spur 4 gibt die extrahierten Nukleinsäuren aus BDVM H112W, Spur 5 die aus BDVM R34/53A, Spur 6 die Negativkontrolle wieder. In Spur 7 sind die Nukleinsäureextrakte von BDVM H112W R34/53A D95N neben dem Marker (M) (10, 15 und 20 nt) und Poly-(A)₁₄ (8) aufgetragen. Alle Proben wurden nach dem RNase T₁-Verdau b) wie in a) aufgetrennt. Die Nummerierung der Proben ist in a) und b) identisch.

4.6.5 Klonierung und Sequenzierung der extrahierten RNAs

Um eine Information über die Sequenz der kurzen, an BDVM gebundenen RNAs zu erhalten, wurden diese extrahiert (3.6.2) und anschließend in cDNA umgeschrieben, amplifiziert, in einen Vektor ligiert (3.6.7) und sequenziert. Es

konnten für drei der vorliegenden BDVM-Varianten Daten aus der Sequenzierung erhalten werden. Dabei handelt es sich um die oktamere Fraktion von BDVM *wt*, BDVM H112W und BDVM H112W R34/53A D95N. Diese Varianten wiesen zudem bei der 3'-radioaktiven Markierung mittels Poly(A)-Polymerase ein Signal auf (Daten nicht gezeigt). Das Anfügen des Poly(A)-Schwanzes ist der erste entscheidende Schritt im Laufe der Klonierung der kurzen RNAs, so dass nur Poly(A)-haltige RNAs kloniert werden konnten. Die erhaltenen Sequenzen sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Erhaltene Sequenzen nach der Subklonierung der an verschiedene BDVM-Varianten gebundenen kurzen RNAs.

Wiedergegeben ist die 5'-3'-DNA-Sequenz der subklonierten kleinen RNAs aus BDVM ohne den Poly(A)-Schwanz und ohne die 5'-Restriktionsschnittstelle des Vektors. Für die oktamere Fraktion von BDVM *wt* konnten acht Sequenzen mit einer Länge zwischen 10 und 47 bp und für BDVM H112W neun Sequenzen mit einer Länge zwischen 11 und 52 bp ermittelt werden. Für BDVM H112W R34/53A D95N wurden nur zwei Sequenzen mit einer Länge von 10 bzw. 35 bp erhalten.

Klon	5'-Sequenz-3' (ohne Poly(A)-Schwanz)	Länge [bp]
BDVM <i>wt</i> 1	tcagatttcattctggtgg	19
BDVM <i>wt</i> 2	tcagattgtaatcctggcaccgatgctttcccagtttgctatgacg	47
BDVM <i>wt</i> 3	gtttttgggcttttctg	17
BDVM <i>wt</i> 4	tagatattagtttagtg	18
BDVM <i>wt</i> 5	gtttttggggcctttctgattatc	24
BDVM <i>wt</i> 6	tttctgttcg	10
BDVM <i>wt</i> 7	atatctgattttggcg	16
BDVM <i>wt</i> 8	atttcctggcgg	13
BDVM H112W 1	atcttcttgattgtggttggttctgttggtg	33
BDVM H112W 2	tcttcttgattgtggttggttctgttggtg	32
BDVM H112W 3	attttatattctggcttgtttct	23
BDVM H112W 4	aaattggtgttggccctctcgcccgacattcgatcttcagggccttagg	51
BDVM H112W 5	aattattcttttatattctggcttgtttctg	31
BDVM H112W 6	atztatgagtg	11
BDVM H112W 7	aaattggtgttggccctctcgcccgacattcgatcttcagggccttaggt	52
BDVM H112W 8	attgtggttgttggctgttggtg	24
BDVM H112W 9	tttctcttggttgttggtg	21
BDVM Triple D95N 1	aacgtatcgggggttcgaatccccctcaccgcc	35
BDVM Triple D95N 2	ggtgaggtgg	10

Alle Sequenzen der oktameren Fraktion von BDVM *wt* wiesen einen hohen G/T-Gehalt auf. Auffällig war dabei, dass einzelne Basen in sich wiederholenden Sequenzen vorkamen. Ähnliches ließ sich auch für an BDVM H112W gebundene RNA feststellen. Auch hier war der G/T-Gehalt der Sequenzen sehr hoch, und einzelne Basen wiederholten sich mehrfach hintereinander. Im Gegensatz dazu

waren die erhaltenen Sequenzen für BDVM H112W R34/53A D95N sehr G/C-reich, doch auch hier wiederholten sich einzelne Basen mehrmals.

4.7 Untersuchung der BDVM-Varianten im zellulären Umfeld

Zum besseren Verständnis der Mutationsauswirkungen der vorliegenden BDVM-Varianten sollten deren Eigenschaften in einem möglichst naturnahen Umfeld in Bezug auf Funktionalität, Verteilung und Infektiosität untersucht werden. Dafür wurden Oligoglioblastoma-Zellen, epitheliale Gehirnzellen aus dem Menschen, als viraler Wirtsorganismus verwendet. Alle in den folgenden Experimenten verwendeten rekombinanten BDV (rBDV) wurden von Dr. A. Martin, AG Schwemmle, Universitätsklinikum Freiburg, zur Verfügung gestellt. Experimente, in denen nur das Matrixprotein von BDV rekombinant exprimiert und untersucht werden sollte, wurden dagegen in Vero-Zellen durchgeführt.

4.7.1 Northern-Blot

Um zu untersuchen, ob und wenn ja wie sich die Transkriptionsrate und damit die Menge viraler mRNA der einzelnen BDVM-Varianten untereinander unterscheidet, wurde die total-RNA aus persistent infizierten Vero-Zellen isoliert, aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Dort erfolgte die Detektion der Zielsequenzen mit Hilfe einer spezifischen Sonde gegen die viralen Genabschnitte von BDV-L/G/M, BDV-G/M und BDV-M. Von allen total-RNA-Extrakten wurden 5 µg auf ein 1%iges Agarosegel geladen und die Proben einer elektrophoretischen Auftrennung unterzogen. Zur Kontrolle der auf das Gel aufgetragenen Menge an total-RNA-Extrakt und zum Ausschluss von RNA-Abbau in den Proben wurde die abgeschlossene elektrophoretische Auftrennung der Proben unter UV-Licht dokumentiert. Abbildung 47 zeigt, dass von allen Proben vergleichbare Mengen an total-RNA auf das Gel aufgetragen wurden. Lediglich BDVM H112W R34A (Probe M8) zeigte eine schwächere Bandenintensität im Vergleich zu den anderen Proben. Dabei war für alle Proben eine scharfe Bande für die 18 S und für die 28 S rRNA zu erkennen.

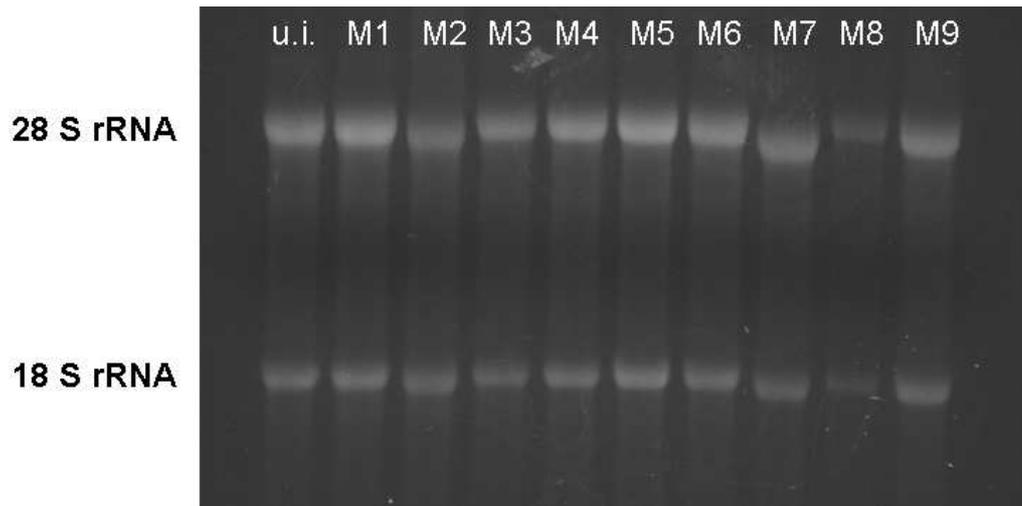


Abbildung 47: Agarosegel der aufgetrennten BDVM total-RNA-Extrakte aus persistent infizierten Vero-Zellen.

Aufgetragen wurden 5 µg eines total-RNA-Extraktes von nicht-infizierten (u.i.) Zellen sowie von persistent infizierten Vero-Zellen mit den BDVM-Varianten *wt* (M1), R34A (M2), F37A (M3), R53A (M4), R34/53A (M5), H112W (M6), H112W R34A (M7), H112W R53A (M8) und H112W R34/53A (M9). Linksseitig sind die Bandenhöhen für die 18 und 28 S rRNA angegeben. In allen Proben sind vergleichbar intensive Banden ohne Hinweis auf Abbau durch RNasen zu erkennen.

Als nächster Schritt folgte die Übertragung der total-RNA auf eine Membran mit Hilfe von Kapillarkräften. Abschließend erfolgte die Detektion verschiedener BDV-Transkripte mit Hilfe einer ^{32}P -markierten Sonde, welche den Nukleotiden 4014 bis 4729 des BDV-Genoms entsprach. Dadurch war es möglich, die Transkripte von BDV-L/G/M, -G/M und -M zu detektieren.

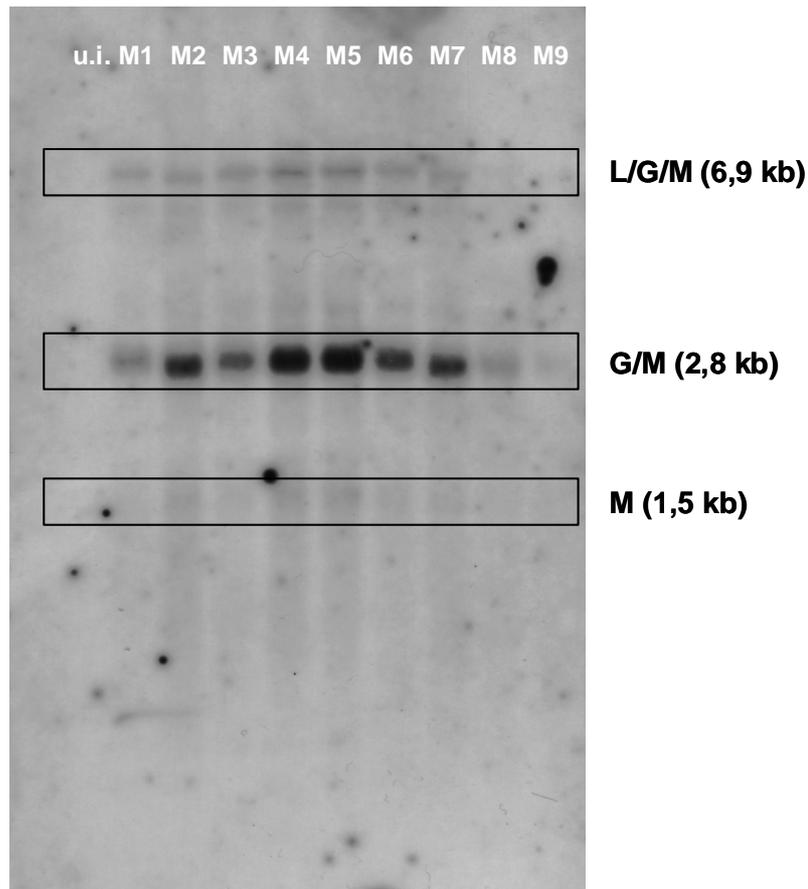


Abbildung 48: Northern-Blot der verschiedenen BDVM-Varianten mit RNA aus persistent infizierten Vero-Zellen.

Mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde können die BDVM enthaltenden RNA-Transkripte BDV-L/G/M (6,9 kb), BDV-G/M (2,8 kb) und BDV-M (1,5 kb) sichtbar gemacht werden. Diese wurden für nicht-infizierte Zellen (u.i.) als auch für die Zellen, die mit den BDVM-Varianten *wt* (M1), R34A (M2), F37A (M3), R53A (M4), R34/53A (M5), H112W (M6), H112W R34A (M7), H112W R53A (M8) und H112W R34/53A (M9) persistent infiziert waren, nachgewiesen.

Das Signal nach der Hybridisierung der total-RNA-Extrakte mit den markierten Sonden konnte nur schwach und nach langer Belichtungszeit für die einzelnen Banden detektiert werden (siehe Abbildung 47). Es wurde eine gleiche Bandenintensität für die Varianten BDVM *wt*, BDVM R34A, BDVM F37A, BDVM R53A, BDVM R34/53A und BDVM H112W und BDVM H112W R34A erhalten. Die Bandenintensität war deutlich geringer für die Varianten BDVM H112W R53A und BDVM H112W R34/53A. Die oberste Bande entspricht dabei dem BDV-L/G/M-Transkript. Darunter ist die Bande für das BDV-G/M-Transkript zu sehen. Die unterste Bande repräsentiert das Transkript von BDVM. Eine schwächere Intensität deutet dabei auf eine geringere Transkriptionsrate hin. Die beobachteten sehr schwachen Signale sind durch ein übermäßiges Waschen der Membran entstanden.

In einer Wiederholung des Experiments zeigte sich eine vergleichbare Bandenintensität für alle BDVM-Varianten (Novotny 2011). Somit kann eine vergleichbare Transkriptionsrate für alle BDVM-Varianten angenommen werden.

4.7.2 Western-Blot aller BDVM-Varianten

Um den Einfluss der eingebrachten Mutationen innerhalb von BDVM auf die zelluläre Translationsrate zu untersuchen, wurden die verschiedenen BDVM-Varianten in persistent infizierten Vero-Zellen mit Hilfe der Western-Blot-Methode detektiert (Abbildung 49). Dabei erfolgte neben der Detektion von BDVM auch gleichzeitig die Detektion des Nukleoproteins (BDVN) als ein Maß für die Virusmenge und die eines „Haushalts“-Proteins (β -Tubulin). Dadurch sollte sichergestellt werden, dass eine vergleichbare Menge an Ausgangsmaterial mit vergleichbarer Viruslast verwendet wurde.

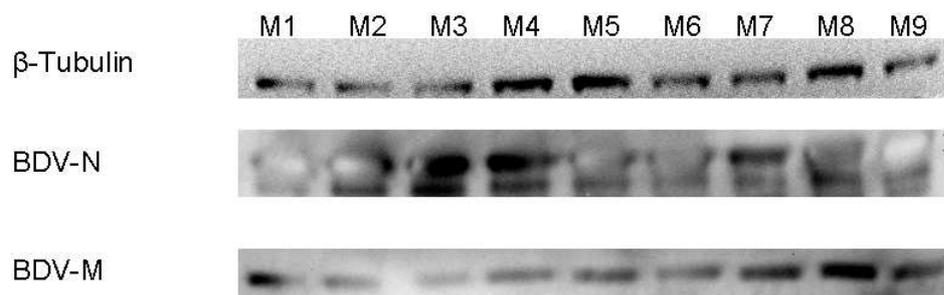


Abbildung 49: Western-Blot Analyse mit unterschiedlichen Primärantikörpern gegen β -Tubulin, BDVN und BDVM zur Detektion der zellulären Translationsrate in Abhängigkeit von BDVM-Mutationen.

Dargestellt sind die Proteinextrakte von persistent mit rBDV infizierten Vero-Zellen. Die rBDV enthalten dabei die BDVM-Varianten *wt* (M1), R34A (M2), F37A (M3), R53A (M4), R34/53A (M5), H112W (M6), H112W R34A (M7), H112W R53A (M8) und H112W R34/53A (M9). In der obersten Spur wurde ein Primär-Ak gegen β -Tubulin, ein zellinternes Haushaltsprotein, eingesetzt. In der mittleren Spur wurde ein Primär-Ak gegen BDVN angewandt, welches das häufigste Protein von BDV ist. In der untersten Spur wurde ein polyklonaler Ak gegen BDVM verwendet.

Die Analyse der Proteinextrakte von mit den verschiedenen BDVM-Varianten infizierten Vero-Zellen ergab, dass eine vergleichbare Menge an Ausgangsmaterial für jede Probe verwendet wurde (Abbildung 49). Das zeigt sich an den ähnlich intensiven Banden für β -Tubulin. Lediglich für die Varianten BDVM R34A (M2) und BDVM F37A (M3) wurde eine etwas schwächere Bandenintensität detektiert. BDVN

zeigte im Western-Blot eine Doppelbande, die auf die zwei verschiedenen Spleißvarianten p38 und p39 von BDVN zurückzuführen ist (Kobayashi *et al.* 1998; Schwemmler *et al.* 1998). Die analoge Bandenintensität deutet auf eine vergleichbare Viruslast der verwendeten Zellen für alle BDVM-Varianten hin. Für die Detektion von BDVM wurde ein polyklonaler Primär-Ak verwendet. Damit wurde ein Einfluss der verschiedenen BDVM-Mutationen auf das Western-Blot Ergebnis ausgeschlossen. Dabei war die Bandenintensität für die Varianten BDVM R34A (M2) und BDVM F37A (M3) geringer und für die Variante BDVM H112W R53A (M8) stärker. Für die restlichen Varianten ergab sich eine vergleichbare Bandenintensität. Daher haben die verschiedenen Varianten von BDVM keinen Einfluss auf die Translationsrate viraler Proteine in infizierten Zellen.

4.7.3 Bestimmung des Virustiters zur Erstellung einer Wachstumskinetik

Eine Grundvoraussetzung für die Erstellung einer Wachstumskinetik zur Beurteilung der Infektiosität der rBDV ist die Inkubation der Zellen zu Beginn mit der gleichen Anzahl infektiöser Partikel. Dazu muss die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln im Virusstock bekannt sein. Für die unterschiedlichen Varianten an zur Verfügung gestellten rBDVs ergaben sich folgende ermittelte Virustiter (Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht der ermittelten Virustiter der verschiedenen rBDV.

Aufgelistet sind die gemittelte Anzahl an infektiösen Viruspartikeln und deren Standardabweichung (St. Abw.) für die rBDV-Varianten *wt*, R34A, F37A, R53A, R34/53A, H112W, H112W R34A, H112W R53A und H112W R34/53A.

	Virustiter [Partikel/ml]	St. Abw.
BDVM <i>wt</i>	$7,31 \cdot 10^7$	$2,44 \cdot 10^7$
BDVM R34A	$8,13 \cdot 10^7$	$7,80 \cdot 10^6$
BDVM F37A	$1,71 \cdot 10^7$	$2,56 \cdot 10^6$
BDVM R53A	$6,06 \cdot 10^6$	$4,81 \cdot 10^5$
BDVM R34/53A	$9,04 \cdot 10^6$	$8,81 \cdot 10^5$
BDVM H112W	$7,26 \cdot 10^7$	$6,14 \cdot 10^6$
BDVM H112W R34A	$5,79 \cdot 10^7$	$2,33 \cdot 10^6$
BDVM H112W R53A	$5,92 \cdot 10^6$	$3,12 \cdot 10^5$
BDVM H112W R34/53A	$7,47 \cdot 10^6$	$9,15 \cdot 10^5$

Bei den rBDV-Stocks konnte durch eine Verdünnungsreihe die jeweilige Anzahl an infektiösen Viruspartikeln ermittelt werden. Dabei wiesen sämtliche Stocks eine Konzentration von infektiösen Partikeln im Bereich von 10^6 bis 10^7 pro ml mit einer Standardabweichung von etwa 10% auf. Die Konzentrationsunterschiede innerhalb der rBDV-Stocklösungen waren somit für die folgenden Experimente zur Beurteilung der Infektiösität nicht relevant.

4.7.4 Wachstumskinetik der rBDV in Oligoglioblastoma-Zellen

Die Analyse der Wachstumskinetik der verschiedenen rBDV-Varianten in Oligoglioblastoma-Zellen beschreibt die Funktionalität der vorliegenden BDVM-Varianten. Bei Oligoglioblastoma-Zellen handelt es sich um humane Zellen aus dem Gehirn, die eine möglichst naturnahe und stringente Wirtsumgebung für das Virus und seine verschiedene Varianten darstellen.

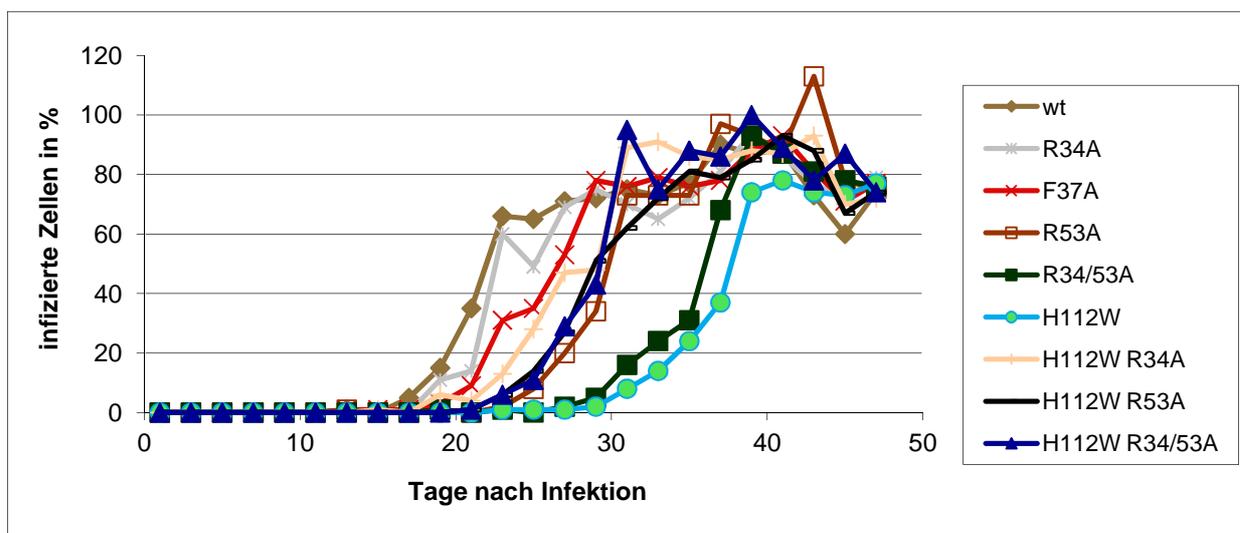


Abbildung 50: Wachstumskinetik der verschiedenen rBDV-Varianten in Oligoglioblastoma-Zellen.

Alle rBDV-Varianten weisen den typischen Kurvenverlauf einer BDV-Wachstumskinetik auf. Die mit rBDV mit der BDVM *wt*-Variante inkubierten Zellen wurden am schnellsten infiziert, gefolgt von Zellen mit den in rBDV vorliegenden Varianten BDVM R34A, BDVM F37A, BDVM H112W R34A, BDVM H112W R34/53A, BDVM H112W R53A, BDVM R53A, BDVM R34/53A und BDVM H112W.

Alle als rBDV vorliegenden BDVM-Varianten führten nach einer unterschiedlich langen Verzögerungszeit zu einem infektiösen Virus in der Zelle (Abbildung 50). Nach einer anfänglichen Verzögerung zwischen 19 und 31 Tagen erfolgte ein

exponentieller Anstieg der Kurve für infizierte Zellen, die anschließend wieder abflachte bis schließlich die letzte Phase (zwischen 23 und 39 Tagen) erreicht wurde. In dieser war dann ein gleichbleibender Anteil an Zellen persistent infiziert. Für alle vorhandenen rBDVs mit den enthaltenen verschiedenen BDVM-Varianten konnte eine komplette Wachstumskinetik aufgenommen werden. Das rBDV mit der BDVM-Variante des *wt* führte am schnellsten zu den meisten infizierten Zellen. Innerhalb von 28 Tage wurden 80% der Zielzellen infiziert. Die Variante BDVM R34A und BDVM F37A benötigten hierfür ebenfalls 28 Tage. Nach 30 Tagen waren 80% der Zellen durch die Varianten BDVM H112W R34/53A, H112W R34A und R53A infiziert. BDVM H112W R53A brauchte 32 Tage. BDVM R34/53A war mit 38 Tagen deutlich langsamer und BDVM H112W erreichte erst mit insgesamt 40 Tagen die maximale Anzahl an infizierten Zellen. Interessanterweise wurde keine 100%ige Infektion sondern jeweils nur etwa 80% erreicht. Wie bereits unter 4.7.1 beschrieben, können hierfür keine Einflüsse der Mutationen in BDVM auf die virale Transkription und auch nicht, wie unter 4.7.2 beschrieben, auf die virale Translation verantwortlich gemacht werden. Denn alle mit rBDV inkubierten Zellen zeigten vergleichbare Transkriptions- und Translationsraten der viralen Proteine BDVM und BDVN. Ebenso lagen keine Unterschiede bezüglich der zellulären Verteilung der einzelnen Varianten vor (Novotny 2011). Um das Auftreten weiterer Mutationen innerhalb der verschiedenen rBDVs während der Wachstumskinetik auszuschließen, wurde zum Endpunkt der Wachstumskinetik die total-RNA extrahiert und der virale, für BDVM kodierende Genombereich sequenziert. Diese Arbeiten wurden von Dipl.-Biologin R. Novotny (AG Schwemmler, Universitätsklinikum Freiburg) im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Novotny 2011). Sie konnte zeigen, dass alle vorhandenen rBDV-Varianten, mit Ausnahme von BDVM H112W R34/53A, über die Zeitdauer des Experiments stabil waren. Lediglich für BDVM H112W R34/53A konnte eine Mutation in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Dabei handelte es sich um die Mutation D95N.

Um den Einfluss der Mutation D95N auf die Infektiosität des Virus in Oligoglioblastoma-Zellen zu untersuchen, wurde diese Variante ebenfalls als Startpunkt für eine Wachstumskinetik verwendet. In diesem Experiment zeigte sich, dass die Variante BDVM H112W R34/53A D95N eine vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu BDVM *wt* hatte (Dautel *et al.* n.d.; Novotny 2011). Durch das Einbringen der Mutation D95N wurde die

Wachstumsgeschwindigkeit der Variante BDVM H112W R34/53A deutlich erhöht. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Wachstumskinetik von BDVM H112W R34/53A und dem Auftreten der Zusatzmutation D95N. Dazu wurde erneut eine Wachstumskinetik von BDVM H112W R34/53A aufgenommen und zu verschiedenen Zeitpunkten die virale RNA isoliert und auf das Auftreten der Mutation D95N hin untersucht. Die exponentielle Wachstumsphase von BDVM H112W R34/53A begann erst mit dem Erscheinen der Mutation D95N (Abbildung 51). Während dem weiteren exponentiellen Wachstumsverlauf wurde das Asp an Position 95 weitestgehend durch das Asn verdrängt, so dass am Ende nur noch die Variante BDVM H112W R34/53A D95N vorlag. Schlussfolgernd kann BDVM H112W R34/53A nur durch das Auftreten der Zusatzmutation D95N neue Zellen infizieren.

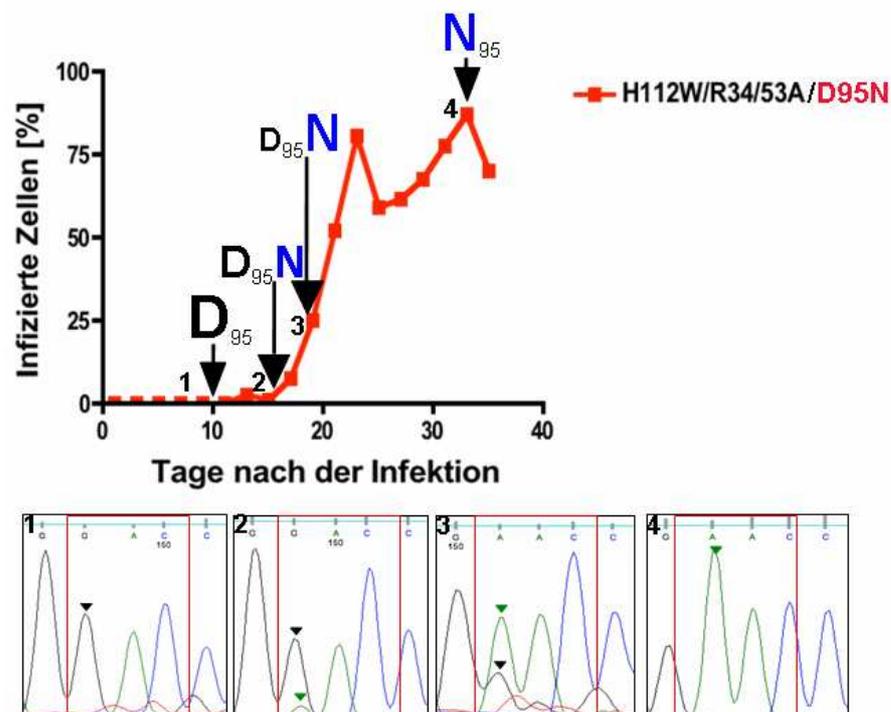


Abbildung 51: Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Aufkommen der Rettungsmutation D95N für das rBDV mit BDVM H112W R34/53A.

Zu vier verschiedenen Zeitpunkten wurde die zelluläre total-RNA extrahiert und der virale für BDVM kodierende Genomteil sequenziert. Dabei zeigte sich, dass mit fortlaufender Experimentdauer die Häufigkeit der Mutation D95N zunahm. In gleichem Maße erfolgte ein Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit (Dautel *et al.* n.d.; Novotny 2011).

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung verschiedener BDVM-Varianten und die anschließende Charakterisierung ihrer biochemischen und biologischen Eigenschaften, um neue Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen RNA-Bindung, Oligomerisierung und Funktionalität von BDVM zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit ist dies erfolgreich für die Varianten BDVM F37A, BDVM H112W, BDVM R53A, BDVM R34/53A, BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N gelungen.

5.1 Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen BDVM-Varianten

5.1.1 Vergleich der Grundstruktur aller BDVM-Varianten

Durch die eingeführten Mutationen an den Positionen 34, 53 bzw. 112 kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Gesamtstruktur der einzelnen BDVM-Varianten. Für alle Strukturen bleibt das auch schon für den *wt* beobachtete Strukturmotiv des zentralen gedrehten β -Sandwich erhalten. Dieses wird von kleinen α -Helices und Loop-Strukturen flankiert. Dennoch gibt es vereinzelte Unterschiede in Strukturabschnitten zwischen den BDVM-Varianten. Um einen einfachen Vergleich dieser strukturellen Unterschiede aller kristallisierten Varianten miteinander zu ermöglichen, ist die mittlere quadratische Abweichung des Proteinrückgrats der jeweiligen BDVM-Variante gegenüber BDVM *wt* in Abbildung 52 auf die Struktur des *wt* geplottet. Die größten strukturellen Unterschiede sind im Bereich der Aminosäuren 30 bis 40 zu beobachten. Interessanterweise liegt innerhalb dieses Bereichs die eingeführte Mutation an Position 34, bei der ein Arg gegen ein Ala ausgetauscht wurde. Zusätzlich kommt es noch zu strukturellen Veränderungen im Bereich des Loop50, wo sich ebenfalls eine der eingeführten Mutationen R53A befindet. Gerade diese beiden Regionen sind an der Ausbildung des für BDVM H112W (4.4.2) beobachteten Dodekamers beteiligt. Darüber hinaus wirkt der Loop30 an der für den *wt* beschriebenen Bindung der RNA mit.

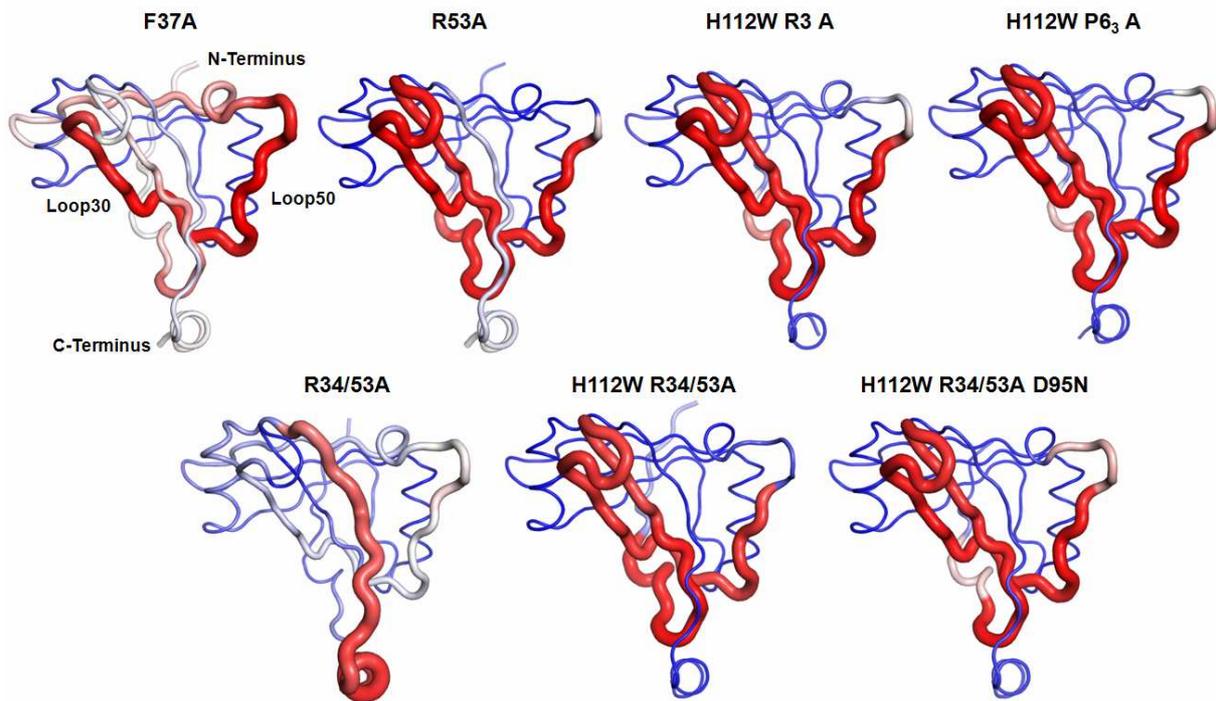


Abbildung 52: Strukturelle Abweichung der verschiedenen BDVM-Varianten im Vergleich zu BDVM *wt*.

Dargestellt ist die mittlere quadratische Abweichung des Proteinrückgrats der BDVM-Varianten F37A, R53A, H112W in den Kristallformen R3 und P_{6₃}, R34/53A, H112W R34/53A sowie BDVM H112W R34/53A D95N. Dabei ist die mittlere quadratische Abweichung in der Putty-Darstellung auf Basis von BDVM *wt* wiedergegeben. Die Stärke bzw. Färbung gibt die strukturelle Abweichung an. Dabei steht die blaue bzw. dünne Darstellung für eine geringe und die rote bzw. dicke Darstellung für eine hohe Abweichung. Im Wesentlichen kommt es in den Bereichen des Loop30 zu strukturellen Unterschieden. Das ist nicht der Fall für die Varianten BDVM F37A, R53A und R34/53A, da diese zwischen den Aminosäuren 37 und 112 RNA gebunden haben und somit die *wt*-Konformation annehmen. In geringerem Maße kommt es auch zu strukturellen Abweichungen im Bereich des Loop50.

5.1.2 Bedeutung des Loop30

An Hand der beiden Strukturen von BDVM H112W (4.4.2) konnte gezeigt werden, dass die RNA-Bindung zwischen den Aminosäuren 37 und 112 durch das Einführen eines Trp an Position 112 verhindert wurde. Es kommt dabei zu einer strukturellen Neuordnung des Loop30. Ursache dafür ist eine Konformationsänderung des Phe37, da es nicht mehr durch die π - π -Stapelungsinteraktion fixiert wird. Es ist neben dem His112 an der RNA-Bindung beteiligt. Zusammen mit dem Phe37 ändert auch der gesamte Loop30 seine

Konformation. Bei BDVM H112W wird dadurch eine Interaktion von Arg34 mit einem benachbarten Tetramer ermöglicht (Abbildung 22). Damit ist Arg34 entscheidend an der Entstehung des Dodekamers beteiligt. Es handelt sich hierbei um eine strukturelle Anpassung nach dem Verlust der gebundenen RNA zwischen Phe37 und His112. Eine solche Kontrolle des Oligomerisierungszustandes eines viralen Matrix-Proteins durch RNA-Bindung ist auch für Ebola's VP40 beschrieben worden. Dabei kommt es nur in Gegenwart von RNA zur Ausbildung des oktameren Zustandes (Gomis-Rüth *et al.* 2003).

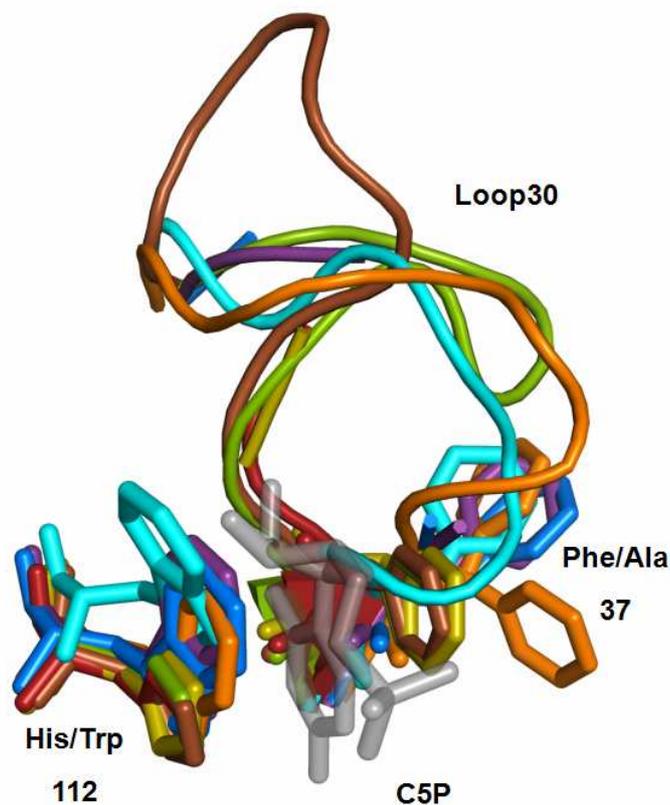


Abbildung 53: Unterschiedliche konformationelle Anordnungen des Loop30 in den verschiedenen Varianten von BDVM.

In unterschiedlicher Farbkodierung sind die verschiedenen Konformationen des Loop30 als Cartoon, mit den Aminosäuren 37 und 112 als Stäbe, der Varianten BDVM *wt* (hellgrün), BDVM R53A (braun), BDVM F37A (rot), BDVM H112W (Kristallform R3; cyan), BDVM H112W (Kristallform P6₃; orange), BDVM R34/53A dunkelgrün, BDVM H112W R34/53A (marine) und BDVM H112W R34/53A D95N (violett) sowie die von BDVM *wt* gebundene RNA in grauen Stäben dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass an Position 112, unabhängig davon ob dort ein His oder Trp ist, keine konformationelle Änderung stattfindet. Hingegen kann der gegenüberliegende Loop30 verschiedene Konformationen annehmen. Dies geschieht in Abhängigkeit von RNA-Bindung und ob der Loop30 durch eine neue Interaktion fixiert wird oder ob er flexibel bleibt.

In den BDVM-Varianten, die weder einen Dodekamer ausbilden noch über eine RNA-Bindung des Loop30 verfügen, kommt es zu keiner Fixierung des Loop30 in einer neuen Konformation. So ist für die Varianten BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N keine Elektronendichte für den Loop30 zu beobachten, da dieser auf Grund der fehlenden Fixierung im Proteinkristall flexibel ist. Das gilt nicht für die Varianten BDVM F37A, R53A und R34/53A, da hier die RNA-Bindung zwischen den Aminosäuren 37 und 112 noch besteht (Abbildung 34). Daher bleiben das Phe37 und damit auch der Loop30 in einer *wt*-ähnlichen Konformation fixiert. Man kann für den Loop30 im Wesentlichen drei Konformationen unterscheiden: erstens, wenn RNA gebunden ist und zweitens, wenn keine RNA gebunden ist und der Loop30 mit einem der benachbarten Tetramere im Dodekamer interagiert (H112W). Die dritte Möglichkeit ergibt sich, wenn keine RNA gebunden und der Loop30 nicht fixiert ist. Im letzten Fall kommt es wie bei BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N zu keiner bevorzugten Anordnung des Loop30.

5.1.3 Bedeutung des Loop50

Neben dem zuvor erwähnten Loop30 trägt auch das in Loop50 enthaltene Arg53 wesentlich zur Ausbildung des in BDVM H112W beobachteten Dodekamers bei (Abbildung 22). Allerdings sind die hier beobachteten strukturellen Änderungen der einzelnen Varianten geringer als für den Loop30 (Abbildung 54). Die Ausbildung des für BDVM H112W beobachteten Dodekamers unter der Teilnahme des Arg53 erfolgt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Das setzt eine Beteiligung des Arg34 an der Ausbildung des Dodekamers durch die Abwesenheit der RNA-Bindung zwischen den Aminosäuren 37 und 112 voraus. In allen anderen Varianten ist das Arg53 zugänglich. Aber erst die neue Konformation und Interaktion des Arg34, wie im Fall von BDVM H112W, ermöglicht eine Dodekamerisierung.

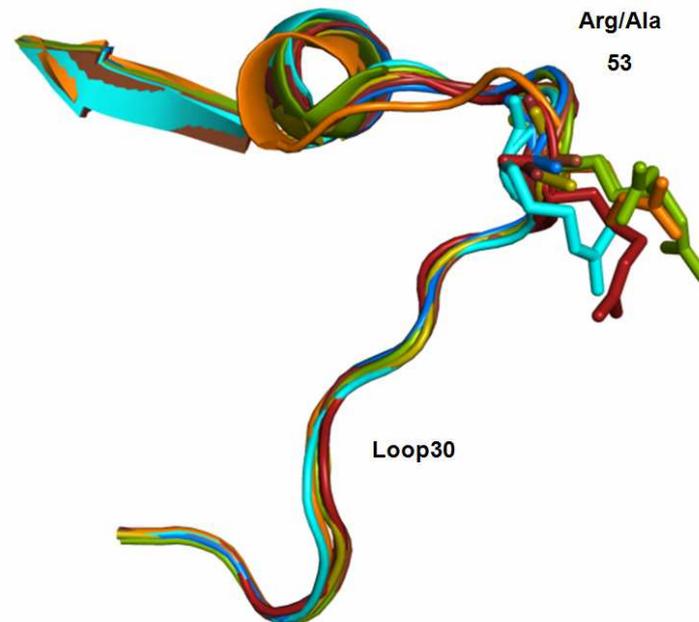


Abbildung 54: Konformationelle Anordnungen des Loop50 in den verschiedenen Varianten von BDVM.

In unterschiedlicher Farbkodierung sind die verschiedenen Konformationen des Loop50 als Cartoon mit Arg53 als Stäbe der Varianten BDVM *wt* (hellgrün), BDVM R53A (braun), BDVM F37A (rot), BDVM H112W (Kristallform R3; cyan), BDVM H112W (Kristallform P6₃; orange), BDVM R34/53A dunkelgrün), BDVM H112W R34/53A (marine) und BDVM H112W R34/53A D95N (violett) dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass es unabhängig von den unterschiedlichen Varianten und im Gegensatz zum Loop30 und zum Arg34 keine wesentliche konformationelle Änderung des Arg53 und Loop50 gibt.

5.1.4 Neue RNA-Bindungsstellen innerhalb von BDVM

Für die Varianten BDVM H112W in der Kristallform R3 und BDVM R34/53A konnte jeweils Elektronendichte im Kristall beobachtet werden, die nicht zum Protein gehörte. In beiden Fällen wurde dabei die gleiche Bindungsstelle mit einer Nukleinsäure besetzt. Allerdings war bei BDVM H112W R3 ein 3GP (Abbildung 29) und im Fall von BDVM R34/53A ein 5GP (Abbildung 34) gebunden. Diese neuen RNA-Bindungsstellen lassen sich möglicherweise auch auf den *wt* von BDVM übertragen (Abbildung 55). Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass sich diese neuen Bindungsstellen mit dem von Neumann *et al.* vorgeschlagenen Bindungsmodell decken (Neumann *et al.* 2009). So befindet sich besonders im Bereich des Guanosinrings Elektronendichte, die durch Neumann *et al.* nicht interpretiert wurde.

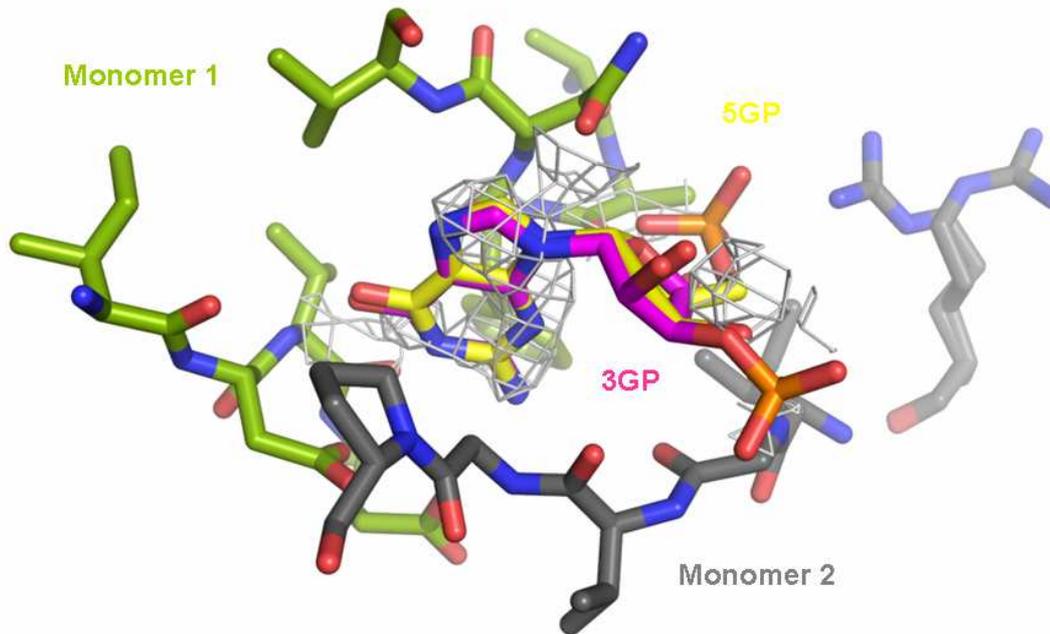


Abbildung 55: Übertragung der neuen RNA-Bindungsstellen aus BDVM H112W (R3) und BDVM R34/53A auf BDVM *wt*.

Abgebildet ist die 2fofc-Elektronendichte von BDVM *wt* als hellgraues Gitter (σ -Level 1,0), sowie die Stab-Darstellung im Bereich der Aminosäuren des Monomers 1 63-66 (grün) und 116-120 (grün) und des Monomers 2 126-132 (grau). Zusätzlich sind die in BDVM H112W (Kristallform R3) und BDVM R34/53A an dieser Stelle gebundenen Nukleinsäuren 3GP (aus H112W R3, magenta) und 5GP (aus BDVM R34/53A, gelb) als Stäbe dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich im Bereich der neu aufgefundenen Nukleinsäuren, besonders in der Umgebung des Guanosinrings, nicht interpretierte Elektronendichte für BDVM *wt* befindet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen das Vorhandensein von mehr als einer RNA-Bindungsstelle für BDVM. Dadurch kann BDVM einzelsträngige RNA mit einer Länge von bis zu 16 nt binden und diese auch vor dem Verdau durch RNasen schützen (Neumann *et al.* 2009). Die neu beschriebene RNA-Bindungsstelle liegt in der von Neumann *et al.* vorgeschlagenen Kavität von BDVM (Abbildung 56). Dadurch ist es dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA möglich, mit den positiv geladenen Oberflächen von BDVM zu interagieren.

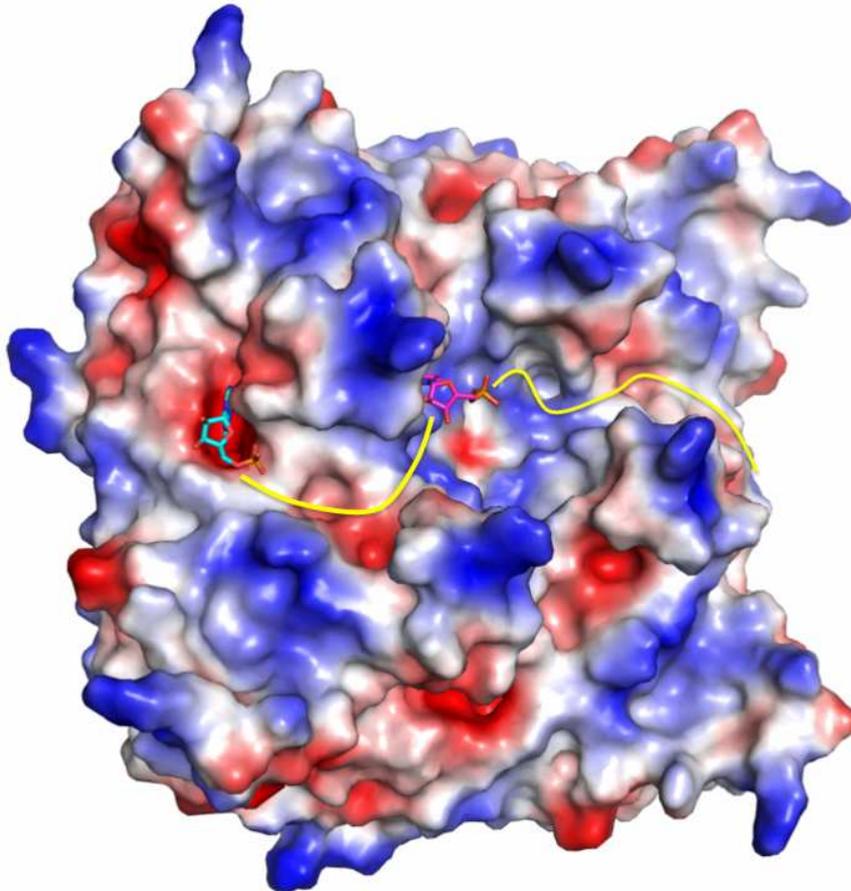


Abbildung 56: Möglicher Verlauf der gebundenen ssRNA in BDVM.

Für BDVM wt ist das elektrostatische Potential auf der Proteinoberfläche (rot: positiv, blau: negativ) wiedergegeben. Zusätzlich sind die gebundenen RNAs, C5P (magenta) und 3GP (cyan) sowie deren möglicher Verlauf dargestellt. Die gebundenen RNAs liegen dabei jeweils in den Kavitäten der Proteinoberfläche von BDVM und sind so vor dem Verdau durch RNAsen geschützt.

5.1.5 Oligomerisierungszustände der verschiedenen BDVM-Varianten

Über die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation (4.4.9) und der Größenausschlusschromatographie (4.4.7) ließ sich einheitlich nachweisen, dass BDVM H112W als Dodekamer vorliegt. Dabei gab es auch Indikationen für das Auftreten von niedriger-oligomeren Spezies. Für BDVM R34/53A ergab sich in beiden Experimenten ein reiner Tetramer. Dagegen wurden für BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N jeweils rein monomere Spezies ohne Hinweis auf einen höheren Oligomerisierungszustand gefunden. In der Blue Native PAGE (4.4.8) zeigten sich insbesondere für die Varianten BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N auch höhere Oligomerisierungszustände, die einem Dimer und Tetramer entsprechen würden. Für BDVM R34/53A wurde neben dem tetrameren auch ein oktamerer Zustand

nachgewiesen. Für BDVM H112W konnte der dodekamere Zustand bestätigt werden. Für die beiden Oligomerisierungszustände von BDVM *wt* wiesen die Ergebnisse der Blue Native PAGE auf ein Dodekamer hin, der nicht in der Größenausschlusschromatographie und der analytischen Ultrazentrifugation bestätigt werden konnte (Kraus *et al.* 2005b). Es ist bekannt, dass die Blue Native PAGE unter nicht idealen Bedingungen höher-oligomere Banden für ein Protein erzeugen kann (Braz & Howard 2009). Es war darüber hinaus zu erkennen, dass die aus dem verwendeten Größenstandard ermittelten relativen Molekulargewichte der BDVM-Varianten nicht mit denen aus der analytischen Ultrazentrifugation und der Größenausschlusschromatographie übereinstimmten. BDVM zeigte bereits im Bradford-Assay eine unzureichende Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau an das Protein. Bei der Blue Native PAGE wird der gleiche Farbstoff eingesetzt. Durch die mangelnde Maskierung der Ladungen des Proteins kann es daher zu nicht korrekten Werten für die relativen Molekulargewichte in der Blue Native PAGE kommen. Da die Größenausschlusschromatographie und die analytische Ultrazentrifugation übereinstimmende Ergebnisse lieferten, wurden diese Daten für die Ermittlung der verschiedenen Oligomerisierungszustände von BDVM in Tabelle 13 verwendet.

Tabelle 13: Oligomerisierungszustände der verschiedenen BDVM-Varianten gemäß der Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation und der Größenausschlusschromatographie.

Variante	Oligomerisierungszustand
BDVM <i>wt</i> Tetramer	Tetramer
BDVM <i>wt</i> Oktamer	Oktamer und Tetramer
BDVM H112W	Dodekamer (Hinweis auf kleinere Spezies)
BDVM R34/53A	Tetramer
BDVM H112W R34/53A	Monomer
BDVM H112W R34/53A D95N	Monomer

Zusätzlich zu den Oligomerisierungszuständen wurden auch Experimente zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes verschiedener BDVM-Varianten im zellulären Umfeld unternommen (Dautel *et al.* n.d.). Dabei wurde BDVM in Vero-Zellen exprimiert, die Zellen aufgeschlossen und der Zellextrakt über eine Größenausschlusschromatographie getrennt. Es erfolgte die Auftrennung jeder

einzelner Fraktion über ein SDS-Gel und die anschließende Detektion von BDVM im Western-Blot (Abbildung 57) (Novotny 2011).

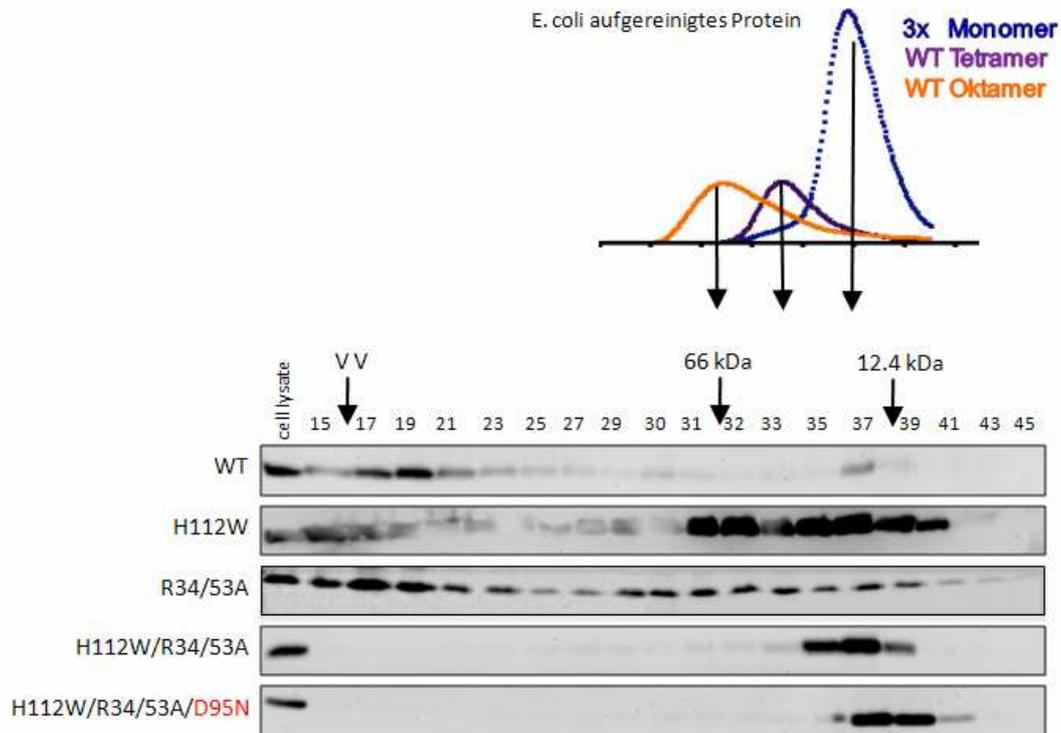


Abbildung 57: Analyse des Oligomerisierungszustandes verschiedener BDVM-Varianten in Vero-Zellen.

Die Varianten BDVM *wt*, H112W, R34/53A, H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A wurden rekombinant in Vero-Zellen exprimiert. Der Zellaufschluss wurde durch Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Dabei eluierte BDVM *wt* in Form von hocholigomeren Spezies nahe des Ausschlussvolumens (VV) (Fraktionen 17 und 19) und als Monomer (Fraktion 37). BDVM H112W eluierte verstärkt im Bereich zwischen 10 und 80 kDa (Fraktionen 31-41), abgeschwächt im Bereich über 80 kDa und im Bereich des VV (Fraktion 15 und 17). BDVM R34/53A zeigte über den gesamten chromatographischen Trennvorgang eine ähnlich starke Elution. BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N eluieren dagegen überwiegend in den Fraktionen 35-39 bzw. 37-39, in denen auch der aus *E. coli* gereinigte Monomer von BDVM H112W R34/53A vorlag (Novotny 2011; Dautel *et al.* n.d.).

Im zellulären Umfeld liegt BDVM *wt* überwiegend in Form von hocholigomeren Spezies vor. Ein sehr kleiner Teil wurde als Tetramer und Oktamer identifiziert. Zusätzlich zeigte sich, dass BDVM *wt* nur in geringem Maße als Monomer vorliegt. Der überwiegende Anteil von BDVM H112W eluierte in einem Bereich zwischen 10 und 80 kDa, also als Monomer bzw. Tetramer, sowie im Bereich über 80 kDa, und als höher oligomere Proteinspezies. BDVM R34/53A eluierte über den gesamten

Verlauf der Größenausschlusschromatographie in vergleichbarem Maße, so dass hier eine Vielzahl von oligomeren Spezies vorliegen. BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N eluierten hingegen nur in drei benachbarten Fraktionen im Bereich von knapp über 12 kDa. Im Bereich dieser Fraktionen eluierte auch in *E. coli* rekombinant hergestelltes und gereinigtes monomeres BDVM H112W R34/53A. Diese Daten belegen, dass BDVM *wt* im zellulären Umfeld in Form höher oligomerer Spezies vorliegt. Es kann so seine Hauptfunktion, das Auskleiden reifer Viruspartikel, ausüben (Lenard 1996; Gaudier *et al.* 2002; Graham *et al.* 2008; Harty 2009). Interessanterweise liegt dennoch ein gewisser Teil von BDVM *wt* als Monomer vor, der so für gereinigtes rekombinantes BDVM *wt* nicht identifiziert werden konnte. Dabei könnte es sich sowohl um ein funktionelles Monomer als auch um denaturiertes BDVM handeln. BDVM H112W zeigte eine höhere Diversität als BDVM *wt* und trat als Monomer, Tetramer, Oktamer, Dodekamer und höher-oligomere Spezies auf. Bei den höher-oligomeren Spezies könnte es sich hier wie auch bei BDVM *wt* um einen funktionellen Oligomerkomplex handeln. Dieser spielt eine Rolle bei der Reifung der Viruspartikel. An Hand der vorliegenden Daten kann angenommen werden, dass BDVM H112W in der Zelle als Dodekamer vorliegt, da es ebenfalls im Bereich zwischen dem Ausschlussvolumen und 80 kDa eluierte. Für BDVM R34/53A konnte mittels Western-Blot-Analyse eine große Bandbreite an verschiedenen Oligomeren nachgewiesen werden. Für BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N zeigten sich, ebenso wie für die in *E. coli* exprimierten und gereinigten Varianten, nur Banden in den Fraktionen 35-39 bzw. 37-39. Diese entsprechen mit einem relativen Molekulargewicht im Bereich von 12,4 kDa einem Monomer.

Zusammengefasst konnten die in dieser Arbeit beobachteten Oligomerisierungszustände von BDVM H112W, H112W R34/53A und H112W R34/53A D95N im zellulären Wirtsumfeld von BDVM bestätigt werden. Allerdings wurden dabei sowohl für BDVM *wt*, als auch BDVM H112W und BDVM R34/53A weitere Oligomerisierungszustände ermittelt. Ein Nachweis dafür war in den *in vitro* Experimenten im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Für BDVM H112W konnten zwei Kristallformen mit einem dodekameren Zustand erhalten werden. Diese sind dennoch strukturell verschieden (4.4.2). An Hand der vorliegenden Daten ist nicht eindeutig geklärt, welche der beiden Kristallformen in Lösung bzw. im zellulären Wirtsumfeld vorkommt. Lediglich die

rhombohedrale Kristallform weist gebundene RNA auf. Eine RNA-Extraktion war aus gereinigtem BDVM H112W erfolgreich (4.6.2). Daher kann eine rhombohedrale Kristallform in Lösung angenommen werden. Ob auch die hexagonale Form vorkommt ist unklar. Im Fall von BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N ist der überwiegende Oligomerisierungszustand in Lösung und im zellulären Wirtsumfeld das Monomer. Da auf Grund des vorliegenden Trp an Stelle des His an Position 112 keine RNA mehr im Zentrum gebunden ist, kommt es nicht zur Ausbildung eines solch stark ausgeprägten Netzwerkes wie es am Beispiel von BDVM *wt* gezeigt werden konnte (Abbildung 58). Im *wt* vermittelt die gebundene RNA-Base ein Interaktionsnetzwerk zwischen zwei benachbarten Monomeren innerhalb des Tetramers über die Aminosäuren His112^D (His112 der Kette D), Lys111^A und Glu108^D. Bei BDVM H112W R34/53A D95N kommt es durch das Fehlen der zentral gebundenen RNA nicht zur Ausbildung des zuvor genannten Interaktionsnetzwerkes. Zusätzlich nimmt das Lys111 mit seiner zentralen Rolle in diesem Interaktionsnetzwerk eine andere Konformation als in BDVM *wt* ein. Dies schwächt zusätzlich die Interaktionen zwischen den Monomeren, so dass dadurch eine Ausbildung des Homotetramers nicht ermöglicht wird.

Es existiert dennoch ein kristallographischer Tetramer, dessen Struktur sowohl für BDVM H112W R34/53A als auch für BDVM H112W R34/53A D95N diskutiert wurde. Dabei handelt es sich nicht um die biologische sondern um eine nicht-physiologische Form. Deren Entstehung ist auf die Kristallisation zurück zu führen, bei der sehr hohe Proteinkonzentrationen in Gegenwart von Präzipitantien genutzt werden. Durch die Dampfdiffusion werden während der Kristallisation steigende Konzentrationen des Proteins erreicht, die dazu führen, dass sich nicht-physiologische Interaktionen ausbilden können (Carugo & Argos 1997; Kalinowska-Tłuścik *et al.* 2010; Plevka *et al.* 2008). Eine Bevorzugung der nicht-physiologischen, tetrameren Form gegenüber der monomeren Form ist möglich, da sich diese Symmetrie innerhalb des Proteinkristalls widerspiegelt und dadurch der Kristallisation förderlich ist (Banatao *et al.* 2006; Chruszcz *et al.* 2008).

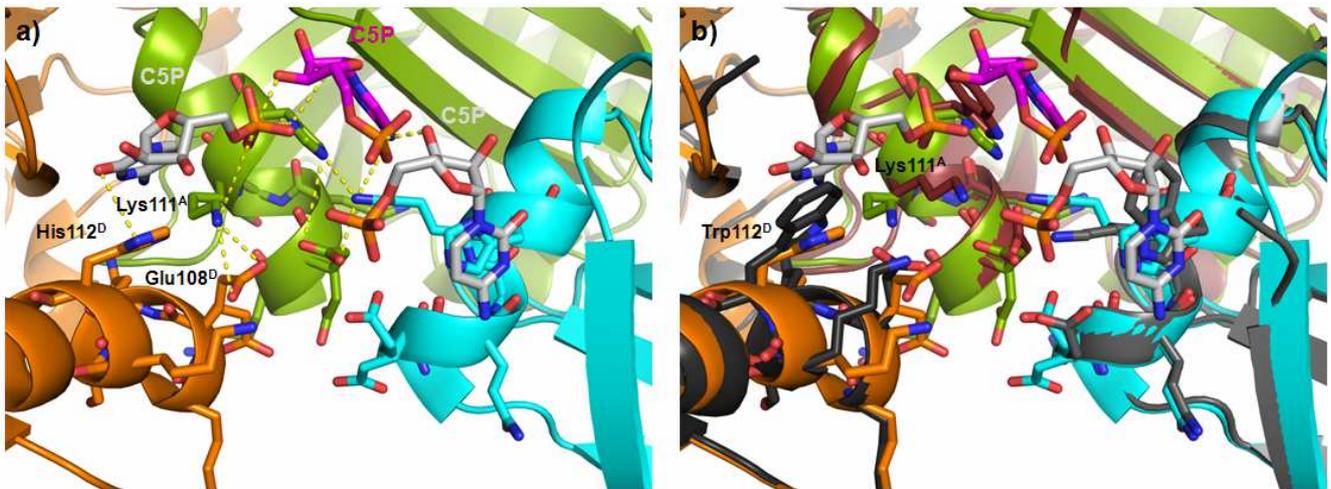


Abbildung 58: Interaktionsnetzwerk innerhalb des Tetramers von a) BDVM *wt* und b) dem kristallographischen Tetramer von BDVM H112W R34/53A D95N.

Dargestellt sind in a) die drei Monomere (A: grün, B: cyan und D: orange) von BDVM *wt* als Cartoon. Zusätzlich sind drei gebundene RNA-Basen (weiß: D, magenta: A, weiß: B) und die Aminosäuren 108-112 als Stäbe abgebildet. In a) ist das Interaktionsnetzwerk zwischen der RNA-Base^D und His112^D, Lys111^A und Glu108^D zu erkennen. In b) sind drei Monomere von BDVM H112W R34/53A D95N den Monomeren A, B und D von BDVM *wt* überlagert. Dabei ist zu sehen, dass durch die fehlenden RNA-Basen das Interaktionsnetzwerk in der zuvor beschriebenen Form nicht mehr existiert. Dadurch nimmt das Lys111^A in BDVM H112W R34/53A D95N eine andere Konformation als im *wt* ein.

Von den verbleibenden Oligomerisierungszuständen konnten nicht alle kristallisiert werden. Daher liegt nicht für alle Oligomerisierungszustände eine Strukturinformation vor. Der bereits von Kraus *et al.* (2005) beschriebene oktamere Zustand von BDVM konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich kristallisiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür liegt im oktameren Zustand selbst: Er ist nicht bevorzugt und geht zeitabhängig in den tetrameren Zustand über bis sich ein Gleichgewicht einstellt (Kraus *et al.* 2005b).

5.2 Oberflächenaktivität der verschiedenen BDVM-Varianten

Wie unter 4.5 gezeigt werden konnte, sind alle verwendeten BDVM-Varianten in unterschiedlichem Maße oberflächenaktiv. BDVM *wt* wies die stärkste Interaktion mit Lipiden auf, gefolgt von BDVM H112W R34/53A, BDVM H112W R34/53A D95N, BDVM R34/53A und BDVM H112W. Der abnehmende Oberflächendruck im Verlauf der Messung reflektiert die Kondensation der Lipide auf Grund der Protein-Lipid-Interaktion. Generell wird für virale Matrixproteine eine elektrostatische Interaktion mit

negativ geladenen Lipiden angenommen (Gaudier *et al.* 2002; Money *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2005; Murray *et al.* 2005; McDonnell *et al.* 1998).

Dabei ist es überraschend, dass die beiden monomeren Varianten BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N zu einer stärkeren Kondensation der Lipide führen als die tetramere Variante BDVM R34/53A und die dodekamere Variante H112W. Es wird angenommen, dass die Oligomerisierung viraler Matrixproteine die elektrostatische freie Energie der Interaktion mit negativ geladenen Membranen erhöht (Murray *et al.* 2005). Die schwächere Interaktion von BDVM R34/53A mit der Lipidmonoschicht ergibt sich durch die zwei fehlenden Arg. Diese können sonst zu einer Protein-Lipid-Interaktion beitragen (Reuter *et al.* 2009). Allerdings fehlen diese beiden Arg auch in den Varianten BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N, die eine stärkere Oberflächenaktivität aufweisen. Eventuell sind für diese Varianten auf Grund des monomeren Zustandes strukturell andere Protein-Lipid-Interaktionen möglich als für die höher-oligomeren Varianten von BDVM. Auch im zellulären Umfeld konnten für die beiden monomeren Varianten keine höher oligomeren Spezies detektiert werden (Dautel *et al.* n.d.). Daher erscheint eine Oligomerisierung dieser beiden Varianten an der Lipidschicht als unwahrscheinlich. Die geringste Oberflächenaktivität weist BDVM H112W auf. Das ist durch die Fähigkeit nur eines Tetramers des Dodekamers zur Interaktion mit der Lipidmonoschicht zu erklären. Das Ergebnis ist eine geringere Konzentration von BDVM H112W an der Lipidschicht im Verhältnis zu den anderen Varianten. Weiterhin ist es möglich, dass die Protein-Lipid-Interaktion eine konformationelle Änderung des Proteins hervorruft. Als Resultat kommt es zur Ausbildung neuartiger Komplexe wie es für das Ebola-Virus beschrieben wurde (Scianimanico *et al.* 2000). Möglicherweise behindert der dodekamere Zustand von BDVM H112W diese konformationelle Änderung. Diese Erkenntnis stimmt mit den Ergebnissen von Murray *et al.* überein. In beiden Fällen findet keine weitere Oligomerisierung statt, die die elektrostatische freie Energie der Interaktion mit der negativ geladenen Membran erhöht (P. S. Murray *et al.* 2005). Für die Untersuchung von Art und Anzahl der konformationellen Änderungen nach der Bindung der verschiedenen BDVM-Varianten an eine negative Lipidschicht müssen weiterführende Analysen zum Beispiel mit der Methode der Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektrometrie durchgeführt werden.

5.3 RNA-Bindungseigenschaften der verschiedenen BDVM-Varianten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus allen Varianten außer BDVM H112W R34/53A Nukleinsäuren extrahiert werden. Eine erfolgreiche Zuordnung der verschiedenen BDVM Oligomerisierungszustände zu unterschiedlichen Spezies an gebundenen ssRNAs war möglich. Darüber hinaus wurde eine Sequenzinformation für die gebundene ssRNA für drei der vorhandenen BDVM-Varianten erhalten.

Im Gegensatz zu den von Neumann *et al.* (2009) publizierten Daten konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die tetramere Fraktion von BDVM *wt* wesentlich kürzere RNAs bindet als der oktamere Zustand (Dautel, *et al.* n.d.). Die Verwendung einer Sephadex-Säule zur Entfernung des radioaktiven Mono-Nukleotids in der Veröffentlichung von Neumann *et al.* führte zu einem Ausschluss aller Nukleinsäuren kleiner 12 nt von der späteren Analyse (Lieber 2006). Für BDVM H112W konnten RNAs mit einer größeren Länge als für die *wt*-Zustände von BDVM isoliert werden. Die Bindung dieser RNAs beruht dabei auf den beiden in dieser Arbeit neu beschriebenen RNA-Bindungsstellen in der R3-Kristallform, welche sehr wahrscheinlich auch auf den *wt* übertragen werden können. Diese Bindungsstellen sind auch im dodekameren Zustand von BDVM H112W auf Grund ihrer Lage an der dem Lösungsmittel zugewandten Seite des Proteins frei zugänglich. Das beweist die RNA-Bindung von BDVM H112W auch in Lösung. Somit kommt schlussfolgernd mindestens die in der rhombohedrale Kristallform wiedergegebenen Struktur in Lösung vor.

Für die rein tetramere Variante BDVM R34/53A konnten RNAs mit einer Länge, die zwischen der RNA-Länge der tetrameren und der oktameren Fraktion von BDVM *wt* liegen, isoliert werden. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen für den *wt* überein. Die tetramere Fraktion bindet kürzere RNAs als der oktamere Zustand. Das könnte darauf hindeuten, dass der Oktamerzustand von BDVM nur bei der Bindung eines ausreichend langen RNA-Fragments (>10 nt) realisiert werden kann. Diese RNA dient somit als Bindeglied zweier BDVM-Tetramere. Für diese Theorie spricht, dass für BDVM *wt* der oktamere Zustand in den tetrameren übergehen kann, während der umgekehrte Fall wesentlich langsamer ist (Kraus *et al.* 2005b). Darin könnte auch begründet sein, dass es bisher nicht gelungen ist, Proteinkristalle des

oktameren Zustandes zu erhalten. Die Halbwertszeit von RNA, die den Oktamer möglicherweise stabilisiert, liegt in Lösung bei wenigen Minuten. Es ist aber auch möglich, dass die beiden Arg 34 und 53 eine Rolle bei der Ausbildung des Oktamers spielen, welche bei BDVM R34/53A durch Ala ersetzt wurden. Auf Grund der fehlenden Strukturinformationen kann kein Beweis dafür erbracht werden. Wenn das von Neumann *et al.* (2009) und Kraus *et al.* (2005) vorgeschlagene Modell korrekt ist, bildet sich der oktamere Zustand von BDVM aus zwei in Sandwichform übereinander gelagerten Tetrameren. Eine Interaktion der beiden Tetramere könnte indirekt über eine im Sandwich gebundene RNA realisiert werden. An dieser Interaktion würde dann eines oder beide der zuvor erwähnte Arg beteiligt sein.

Für den monomeren Zustand von BDVM H112W R34/53A konnte keine gebundene RNA nachgewiesen werden. Die Fähigkeit zur RNA-Bindung erhält diese Variante erst durch das Einführen der Mutation an Position 95. Damit ist die Variante BDVM H112W R34/53A D95N als Monomer zur RNA-Bindung in der Lage. Diese Variante kann neben kurzen RNAs auch deutlich längere RNAs binden. Für BDVM H112W R34/53A D95N wird eine niedrig-affine, vorwiegend elektrostatische Protein-RNA-Interaktion angenommen. Im Zusammenhang mit längeren RNA-Fragmenten ergibt sich so eine größere mögliche Kontaktfläche, was zu einer stärkeren Bindung führt (Magee & Warwicker 2005). Zusätzlich ergibt sich auf Grund der Struktur kein eindeutiges RNA-Bindungsmodell für die Variante H112W R34/53A D95N. Es entsteht durch die Mutation an Position 95 lediglich ein im Vergleich zum *wt* stärker positiv geladener Bereich an der Oberfläche des Proteins (Abbildung 59). Dieser Bereich könnte eine mögliche Stelle für eine der zuvor genannten, nicht-spezifischen Protein-RNA-Interaktionen sein. Für die Bindung einer RNA zwischen 30 und 40 nt an BDVM H112W R34/53A D95N wäre eine Umwicklung des Monomers mit RNA, ähnlich wie bei Histonen und DNA (Luger *et al.* 1997), vorstellbar. Das ermöglicht eine Vielzahl an unspezifischen Protein-RNA-Interaktionen.

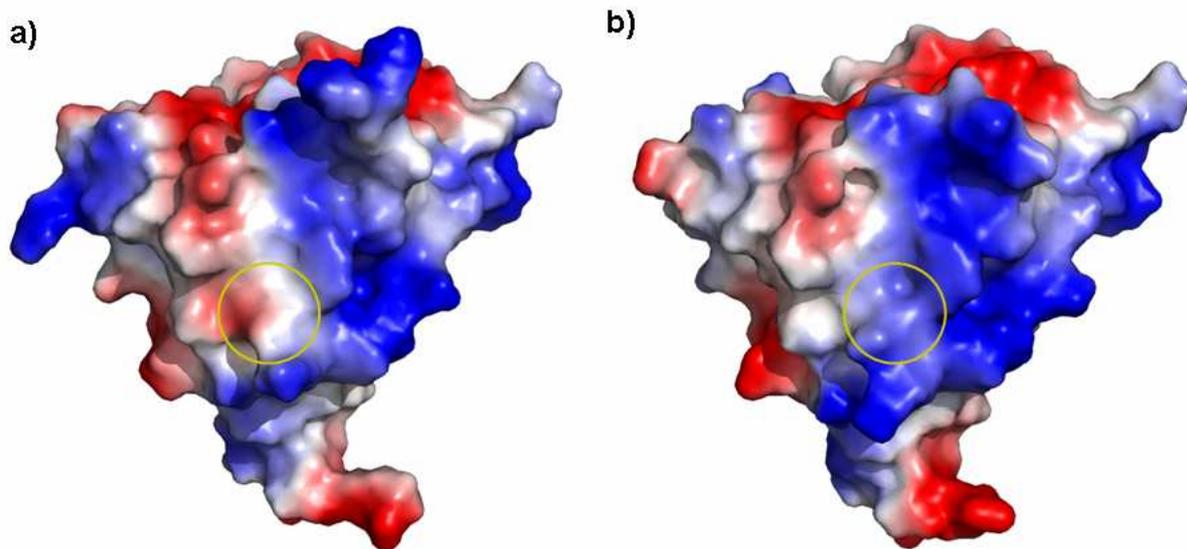


Abbildung 59: Oberflächenladung von a) BDVM *wt* und b) BDVM H112W R34/53A D95N.

Dargestellt ist die geglättete Oberflächenladung von BDVM *wt* (pdb-Code: 3f1j) und BDVM H112W R34/53A D95N, wobei die negativen Ladungen in rot und die positiven in blau abgestuft sind. Mit dem gelben Kreis ist die Lage der Mutation D95N gekennzeichnet. Im Vergleich zeigt sich, dass diese Region für die Variante H112W R34/53A D95N stärker positiv geladen ist als für den *wt*.

Die Sequenzinformationen der gebundenen RNAs für die Varianten BDVM *wt* im oktameren Zustand, BDVM H112W und BDVM H112W R34/53A D95N weisen untereinander kein gemeinsames Sequenzmotiv auf. Die Länge der erhaltenen RNAs wurde durch die denaturierende Harnstoff-Gelelektrophorese bis auf die Ausnahme der sehr langen RNAs bestätigt. Die durch reverse Transkription ermittelten DNA-Sequenzen für den oktameren Zustand von BDVM *wt* sind dabei sehr reich an Thymin. Dies entspricht auf RNA-Ebene einer Uridin-reichen Sequenz. Dabei ist auffallend, dass die Sequenzen wenige bis gar keine Cytidine aufweisen, obwohl ein Cytosin von Neumann *et al.* als die von BDVM *wt* gebundene Base vorgeschlagen wurde (Neumann *et al.* 2009). Allerdings erwähnten die Autoren auch die Möglichkeit eines Uridins als gebundene Base. Der hohe Gehalt an Guanidinen macht eine Besetzung der neu gefundenen RNA-Bindungsstelle auch im *wt* möglich (5.1.4). Die Länge der Sequenzen für die Variante BDVM H112W betrug 11 bis 33 nt und zwei Sequenzen mit 51 bzw. 52 nt. Mit Ausnahme der beiden langen RNAs stimmen diese Ergebnisse mit denen der denaturierenden Harnstoff-Gelelektrophorese überein. Die RNAs größerer Länge sind wahrscheinlich nicht in das Gel eingedrungen. So war für BDVM H112W im obersten Bereich des Gels ein Signal ohne Längenzuordnung zu erkennen (Abbildung 46). Dieses Signal könnte

den RNAs mit 51 bzw. 52 nt entsprechen. Die erhaltenen RNA-Sequenzen für BDVM H112W sind ähnlich wie die für den oktameren Zustand von BDVM *wt* reich an Thymin und Guanin. Dieses Resultat stimmt mit der rhombohedralen Kristallstruktur von BDVM H112W überein, in der zwei RNA-Bindungsstellen für 3GP gefunden wurden. Allerdings fehlen Informationen über die Art der RNA-Bindung an das Protein, da keine Detektion weiterer Bindungsstellen in der Struktur möglich war.

Die Klonierung der von BDVM H112W R34/53A D95N gebundenen RNA resultierte in nur zwei auswertbaren Sequenzen. Dabei handelt es sich um eine G/T-reiche Sequenz mit einer Länge von 11 nt und eine G/C-reiche Sequenz von 38 nt Länge. Die Sequenzen weisen keine Homologie auf. Die RNAs sind daher nicht über eine bestimmte Erkennungssequenz sondern unspezifisch an BDVM H112W R34/53A D95N gebunden. Für die Klonierung der kleinen RNAs erfolgte als Erstes das Anfügen eines Poly(A)-Schwanzes durch die Poly(A)-Polymerase. Eine RNA ist nur dann ein Substrat für dieses Enzym, wenn sie ein frei zugängliches 3'OH-Ende und eine Länge von mehr als zehn Nukleotiden besitzt. Das könnte eine Erklärung für die fehlenden Sequenzinformationen der anderen Varianten sein. So wurde in Experimenten zur Markierung des 3'-Endes der extrahierten RNAs durch die Poly(A)-Polymerase kein Signal für den tetrameren Zustand von BDVM *wt*, BDVM R34/53A und nur ein sehr schwaches Signal für BDVM H112W R34/53A D95N detektiert (Daten nicht gezeigt). Daher konnten für BDVM H112W R34/53A D95N nur zwei Sequenziererergebnisse erhalten werden.

Die vorliegenden Daten liefern zum aktuellen Zeitpunkt den detailliertesten Einblick in die RNA-Bindungseigenschaften verschiedener Oligomerisierungszustände eines viralen Matrix-Proteins. Bisher war lediglich für Ebola's VP40 bekannt, dass es im oktameren Zustand ein RNA-Trinukleotid bindet (Gomis-Rüth *et al.* 2003). Für das Matrix-Protein von RSV hingegen wurde die RNA-Bindung unabhängig von der Länge der RNA nachgewiesen (Rodríguez *et al.* 2004). Die Protein-RNA-Wechselwirkung erfolgt hier im Wesentlichen durch Arg und Lys, ähnlich wie im Fall der neuen RNA-Bindungsstellen von BDVM. Dennoch ist bisher unklar, weshalb verschiedene virale Matrix-Proteine aus der Ordnung der *Mononegavirales* zur RNA-Bindung in der Lage sind. Eine mögliche Erklärung liegt in der RNA-Bindung als Suppressor des RNA-Silencing wie bei Ebola's VP40 (Fabozzi *et al.* 2011). Bei anderen negativ-strängigen Viren ist die Rolle der Matrix-Protein-RNA-Interaktion zumindest teilweise geklärt. So ist zum Beispiel beim Influenza-Virus

das Matrix-Protein M1 zusammen mit der viralen RNA dafür verantwortlich, dass der Prozess der Selbstanordnung des Nukleoproteins in seine helikale Struktur vorangetrieben wird (X. Huang *et al.* 2001). Es vermittelt somit die Verkapselung des RNA-Nukleoproteins in die virale Membranhülle. Das bifunktionale M-Protein muss für diesen Prozess zur gleichzeitigen Bindung von RNA und der Membran fähig sein (Sha & M Luo 1997). Ein Nachweis dieser direkten Interaktion zwischen Matrix-Protein und der viralen RNA erfolgte für *Mononegavirales* bisher weder in dem elektronenkryomikroskopischen Modell für VSV (Ge *et al.* 2010) noch für das Marburg-Virus (Bharat *et al.* 2011). Für BDVM kann sie dennoch nicht ausgeschlossen werden. Eine direkte Umhüllung des Ribonukleokapsids und damit eine mögliche Interaktion viraler RNA mit dem Matrix-Protein, wie es für das Masern-Virus dokumentiert ist, erscheint möglich (Liljeroos *et al.* 2011). Allerdings zeigten sich im Rahmen dieser Arbeit keine Anhaltspunkte für eine spezifische Erkennung des viralen Genoms durch BDVM. Die ermittelten Sequenzen (4.6.5) der gebundenen RNAs weisen in BLAST- und sequenzbasierten Vergleichsanalysen keine Ähnlichkeit mit dem viralen Genom von BDV auf. Eine weitere mögliche Erklärung liegt in dem Ursprung der isolierten RNA aus dem Expressionsorganismus *E. coli*. Die RNA enthält damit vermutlich keine spezifische Erkennungssequenz. Läge aber eine hohe Spezifität für die Erkennungssequenz von BDVM vor, wäre zumindest eine Identifikation BDV-Genom ähnlicher Sequenzen zu erwarten.

5.4 Einfluss von Oligomerisierung und RNA-Bindung auf das Wachstum der rBDV

Zur weiterführenden Untersuchung der viralen Eigenschaften der verschiedenen BDVM-Varianten wurden von Dr. A. Martin (Universitätsklinikum Freiburg, AG Schwemmle) rekombinante Bornaviren mit den entsprechenden Mutationen in BDVM hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese rBDV hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften charakterisiert.

Weder auf der Stufe der viralen Translation (4.7.1) noch auf der Stufe der Transkription (4.7.2) konnten Unterschiede für die einzelnen Varianten von BDVM experimentell festgestellt werden. Neben der Transkription und der Translation spielt für die Funktionalität von BDVM auch dessen zelluläre Lokalisierung eine wichtige

Rolle. BDVM kann in der Wirtszelle sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommen (Kraus *et al.* 2001; Chase *et al.* 2007). Für die vorliegenden Varianten von BDVM konnte kein Einfluss der einzelnen und kombinierten Mutationen auf die sub-zelluläre Lokalisation nachgewiesen werden. Alle Varianten waren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (Novotny 2011). Obwohl sich die verschiedenen BDVM-Varianten hinsichtlich ihrer Transkriptions- und Translationsrate sowie der sub-zellulären Lokalisierung nicht unterscheiden, zeigen sich deutliche Unterschiede in ihrer Wachstumskinetik (4.7.4). Die Varianten BDVM R53A und BDVM F37A wiesen eine nur schwach attenuierte Wachstumskinetik im Vergleich zu BDVM *wt* auf. Das gleiche Ergebnis wurde auch für BDVM H112W R34/53A erhalten. Allerdings kompensiert das Auftreten einer Rettungsmutation bei dieser Variante die eigentlich mangelnde Infektiosität (Abbildung 51). An Hand der bisher diskutierten Ergebnisse ergeben sich zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Die verschiedenen Oligomerisierungszustände von BDVM haben einen direkten Einfluss auf die Verbreitungsrate des Virus.
2. Die RNA-Bindungseigenschaften von BDVM haben einen Einfluss auf die Verbreitungsrate des Virus.

Für das virale Matrix-Protein VP40 des Ebola-Virus ist die Oligomerisierung eine notwendige Voraussetzung für die Knospung reifer Viruspartikel (Panchal *et al.* 2003). Dabei ist der genaue Oligomerisierungszustand von VP40 für diesen Vorgang nicht bekannt. Es ist der des Monomers (R. W. Ruigrok *et al.* 2000), des Hexamers (Nguyen *et al.* 2005), des Oktamers (Gomis-Rüth *et al.* 2003) oder ein bisher unbekannter Zustand möglich. Am wahrscheinlichsten ist der Hexamer, da er den membrangebundenen Zustand darstellt (Nguyen *et al.* 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine nicht als Oktamer vorkommende Variante von VP40 noch immer in der Lage ist, VLPs zu bilden (Hoenen *et al.* 2005). Interessanterweise bildet auch schon ein um die Aminosäuren 1-30 verkürztes VP40 VLPs (Yamayoshi & Kawaoka 2007). In der Wirtszelle spielen allerdings für die Entstehung reifer Viruspartikel vermutlich noch ein oder mehrere zusätzliche, bisher unbekannte Wirtsfaktoren eine Rolle (Neumann *et al.* 2005). Andererseits konnte für Ebola's VP40 auch nachgewiesen werden, dass die RNA-Bindungseigenschaft eine

notwendige Voraussetzung im Lebenszyklus des Virus ist (Gomis-Rüth *et al.* 2003). Der RNA-gebundene Oktamerzustand von VP40 ist dabei essentiell für die Replikation des Virus (Hoenen *et al.* 2005). Interessanterweise ändern sich bei der RNA-Bindung und der dadurch induzierten Bildung des oktameren Zustandes von VP40 die gleichen Proteinregionen (β 1- β 2, α 4 und β 3- β 4 (Gomis-Rüth *et al.* 2003)) wie auch bei BDVM (Neumann *et al.* 2009). So zeigen diese beiden Proteine zwar eine äußerst geringe Sequenzähnlichkeit (weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene), weisen aber dennoch eine Änderung der gleichen Proteinregionen nach der Bindung von RNA auf.

Für das Nipah-Virus (Ordnung: *Mononegavirales*; Gattung: *Paramyxovirinae* (Harcourt *et al.* 2000)) ist bereits das Matrix-Protein allein für die VLP-Bildung ausreichend. Keine VLP-Bildung wird bei Mutationen beobachtet, die die Interaktion mit zellulären Faktoren verhindern (Ciancanelli & Basler 2006; Patch *et al.* 2008). Dadurch verschiebt sich die sub-zelluläre Lokalisation des Matrix-Proteins in den Nukleus der Wirtszelle (Ciancanelli & Basler 2006). Das ist ein Hinweis auf die Notwendigkeit eines Wirtsfaktors für die Bildung reifer Viruspartikel beim Nipah-Virus ähnlich wie für das Ebola-Virus. In beiden Fällen ist aber die Oligomerisierung des viralen Matrix-Proteins eine Voraussetzung für die Bildung reifer Virus-Partikel. Das führt zu der Annahme, dass dieser Punkt auch für BDVM gilt. Denn Virus-Varianten wie zum Beispiel BDVM H112W R34/53A, die nicht zur Oligomerisierung in der Lage sind, zeigen keine Verbreitung des Virus über reife Virus-Partikel (Ciancanelli & Basler 2006; Hoenen *et al.* 2010). Besonders interessant ist die Variante BDVM H112W R34/53A D95N. Es handelt sich um eine monomere Variante mit der Fähigkeit zur RNA-Bindung und einer dem *wt* vergleichbaren Wachstumskinetik (Dautel *et al.* n.d.; Novotny 2011). Normalerweise ist die Bildung von Homo-Oligomeren eine Voraussetzung für die Funktionalität von viralen Matrix-Proteinen (Lenard 1996; Harty 2009; Graham *et al.* 2008; Gaudier *et al.* 2002). Auch beim Ebola-Virus sind nur die Oligomere funktionell aktiv. Dabei spielen diese eine entscheidende Rolle bei der Morphogenese der Partikel und der Transkription viraler Gene (Hoenen *et al.* 2010).

Für das Mason-Pfizer-Virus aus der Gattung der *Retroviridae* ist die Variante R55F des Matrix-Proteins als reines Monomer bekannt (Vlach *et al.* 2009). Dabei basiert der monomere Zustand darauf, dass die Variante R55F rigider ist als der *wt*. Die drei Voraussetzungen für die Oligomerisierung - strukturelle Präorganisation,

induced fit und konformationelle Selektion - können dadurch nicht mehr ausgeführt werden (Srb *et al.* 2011). Die monomere Variante R55F weist eine veränderte virale Gestalt, verminderte Inkorporation des Glykoproteins und einen Verlust der Infektiösität auf (Yasuda & Hunter 2000). Ähnliches ergibt sich im Hinblick auf die Infektiösität für die Variante BDVM H112W R34/53A, jedoch nicht für die Variante BDVM H112W R34/53A D95N. Dadurch bestätigt sich, dass RNA-Bindung von BDVM einen Einfluss auf die Verbreitung des Virus hat.

Inzwischen existieren verschiedene elektronenmikroskopische Strukturen ganzer Viren aus der Ordnung der *Mononegavirales*. So konnten unter anderem die virale Struktur und der Aufbau von VSV (Ge *et al.* 2010), Marburg-Virus (Bharat *et al.* 2011) und Ebola-Virus (Bharat *et al.* 2012; Beniac *et al.* 2012) im Detail aufgeklärt werden. Das Matrixprotein VP40 von Ebola interagiert mit dem C-Terminus des Nukleoproteins und bildet zusammen mit diesem in der frühen Phase der Partikelbildung helikale Strukturen aus (Bharat *et al.* 2012). Beniac *et al.* konnten eine Interaktion des VP40 mit der viralen Membran innerhalb des Viruspartikels bei gleichzeitiger Bindung von VP40 an das Nukleokapsid nachweisen (Beniac *et al.* 2012). Die initiale Bildung des helikalen Viruspartikels wird beim Marburg-Virus durch das Nukleoprotein allein ausgelöst. Im Zuge dieses Vorgangs bindet jedes Nukleoprotein sechs RNA-Basen. Dabei findet eine ungewöhnliche Interaktion zwischen dem Matrix- und dem Nukleoprotein statt, bei der das Matrix-Protein keine geordnete Struktur während der Partikelbildung einnimmt (Bharat *et al.* 2011). Dabei sind das Nukleo- und das Matrix-Protein allein zur Bildung oligomerer Komplexe in der Lage, die sich während der weiteren Reifung assoziieren müssen (Bharat *et al.* 2011). Eine eigenständige Oligomerisierung konnte bereits für das Nukleoprotein von BDV nachgewiesen werden (Rudolph *et al.* 2003). Inwieweit dabei die einzelnen Oligomere von BDVM und BDVN und deren Entstehung während der Virusreifung eine Rolle spielen, ist bisher nicht geklärt. Dass die verschiedenen Oligomerisierungszustände von BDVM möglicherweise für die Bildung reifer Viruspartikel von Bedeutung sind, zeigt sich an Hand vorhandener Daten von VSV. In der kryo-elektronenmikroskopischen Struktur von VSV konnte eine direkte Interaktion zwischen dem Nukleoprotein und der viralen RNA beobachtet werden (Ge *et al.* 2010; Heinrich *et al.* 2012). Diese stellt möglicherweise den Startpunkt der Partikelreifung dar. In deren weiteren Verlauf bildet sich dann eine geordnete Interaktion zwischen dem Nukleo- und dem Matrix-Protein von VSV aus. Die

Funktion der an VSV-N gebundenen RNA und eine mögliche Interaktion dieser mit VSV-M sind bisher unklar. VSV-N ist ebenso wie das Nukleoprotein des Marburg-Virus und BDVN zur Ausbildung homo-oligomerer Strukturen befähigt. Bei VSV scheinen diese Strukturen in der Anfangsphase der Viruspartikelbildung eine Rolle zu spielen (Ge *et al.* 2010). Das ist auch für das Nukleoprotein von BDV möglich.

Zusammengefasst ergeben die Analysedaten dieser Arbeit und die Daten aus der Literatur folgendes Bild: Die Homo-Oligomerisierung des Matrix-Proteins ist Voraussetzung für die Bildung reifer Virus-Partikel, wie es am Beispiel des Ebola- und des Nipah-Virus gezeigt wurde (Hoenen *et al.* 2005; Hoenen *et al.* 2010; Yasuda & Hunter 2000). Die Interaktion zwischen dem jeweiligen Nukleo- und Matrix-Protein ist dabei von entscheidender Relevanz während der Virusreifung (Ge *et al.* 2010; Heinrich *et al.* 2012; Bharat *et al.* 2011). Die Varianten BDVM H112W und BDVM H112W R34/53A demonstrieren, dass die Bedeutung der Homo-Oligomerisierung auch für BDVM gilt. BDVM H112W zeigt eine abgeschwächte Interaktion mit einer Lipidmonoschicht und ein stark verzögertes Wachstum im Vergleich zu BDVM *wt*. Es ist denkbar, dass der dodekamere Zustand weniger geeignet für die Einnahme eines noch höheren oligomeren Zustandes ist. Dieser ist aber Voraussetzung für die Bildung reifer Virus-Partikel. Bei BDVM H112W R34/53A handelt es sich um eine monomere Variante, die zwar mit einer Lipidmonoschicht interagieren kann, aber in Oligoglioblastoma-Zellen kein Wachstum zeigt. Für BDVM H112W R34/53A konnte weder in Lösung noch im zellulären Umfeld ein höherer Oligomerisierungszustand als der des Monomers beobachtet werden. Somit ist diese Variante auch nicht in der Lage, über die Homo-Oligomerisierung an der Bildung reifer Virus-Partikel teilzunehmen. Der Oligomerisierungszustand von BDVM hat schlußfolgernd einen direkten Einfluss auf die Verbreitungsrate des Virus über die Knospung reifer Viruspartikel. Eine mögliche fehlende Interaktion zwischen BDVM H112W R34/53A mit BDVN als Erklärung für die beobachteten Effekte ist unwahrscheinlich, da die Einzelvarianten BDVM H112W und BDVM R34/53A infektiöse Viruspartikel bilden, auch wenn die Vermehrung des Virus über reife Viruspartikel für BDVM H112W attenuiert ist. Verdeutlicht wird dieses Erkenntnis zusätzlich durch das mit dem *wt* vergleichbare Wachstum der monomeren Variante BDVM H112W R34/53A D95N.

Allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass die BDVM-Fähigkeit zur RNA-Bindung ohne Einnahme eines besonderen Oligomerisierungszustandes Einfluss auf die Verbreitungsrate des Virus hat. Die einzige Variante ohne Vermehrung in Oligoglioblastoma-Zellen ist das monomere und nicht zur RNA-Bindung befähigte BDVM H112W R34/53A. Im zellulären Umfeld steht diese Variante unter Evolutionsdruck, so dass bevorzugt BDVM H112W R34/53A D95N durch natürliche Selektion entsteht. BDVM H112W R34/53A D95N ist weiterhin ein reines Monomer, aber im Gegensatz zu BDVM H112W R34/53A zur RNA-Bindung in der Lage. Das führt zu einer vergleichbaren Wachstumskinetik dieser Variante mit BDVM *wt* (Dautel *et al.* n.d.; Novotny 2011). Dennoch bildet BDVM H112W R34/53A D95N vermutlich keine reifen Viruspartikel, sondern verbreitet sich über eine Infektion von Zelle zu Zelle, wie sie bereits zuvor für BDV beschrieben wurde (Clemente & de la Torre 2007). Es ist vorstellbar, dass nur monomeres BDVM einen infektiösen Komplex ähnlich dem RNP bilden kann (Chase *et al.* 2007). Diese infektiöse Einheit gelangt dann über einen noch nicht näher bekannten Weg in die Nachbarzelle. BDVM ist für diesen Vorgang essentiell. Eine BDVM-defiziente Virusvariante führt zwar zu einer persistenten Infektion in einer Einzelzelle, aber weder zu einer Verbreitung über reife Virus-Partikel noch über Zell-zu-Zell-Übertragung in Zellkulturexperimenten (Daito *et al.* 2011). Wie aber ist die Bildung infektiöser BDVM H112W R34/53A D95N Partikel möglich, die Voraussetzung für die Erstellung der Wachstumskinetik ist? Eine Erklärung liegt vermutlich in der Verwendung eines artifiziellen Vorgehens zur Erzeugung der eingesetzten rBDV, um eine höhere Ausbeute an Virus-Partikeln zu erhalten (Pauli & Ludwig 1985). BDV bildet generell nur eine sehr geringe Menge an infektiösen Partikeln pro infizierter Zelle (Pauli & Ludwig 1985). Die attenuierte Wachstumskinetik von BDVM H112W und BDVM R34/53A könnte also auch darin begründet sein, dass weniger monomeres BDVM vorhanden und somit der Zell-zu-Zell-Transfer einer infektiösen Einheit vermindert ist. Dagegen konnte auch für BDVM *wt* im zellulären Umfeld eine monomere Fraktion von BDVM beobachtet werden (Dautel *et al.* n.d.; Novotny 2011). Da das *wt*-Monomer die von Neumann, P. *et al.* (2009) beschriebene RNA-Bindungsstelle besitzt, ist eine RNA-Bindung des *wt* Monomers wahrscheinlich. Damit erfüllt es die bisher angenommenen Voraussetzungen für die Zell-zu-Zell-Übertragung. BDVM *wt* kann also sowohl den Infektionsweg über reife Virus-Partikel als auch über Zell-zu-Zell-Übertragung gehen.

Schlussfolgernd ist eine Differenzierung zwischen einer Verbreitung des Virus über reife Virus-Partikel und dem Zell-zu-Zell-Übertragungsweg erforderlich. Für die Bildung reifer Viruspartikel ist ein höherer geordneter Oligomerisierungszustand Voraussetzung, während für die Zell-zu-Zell-Übertragung ein RNA-bindendes BDVM-Monomer zusammen mit anderen, bisher unbekanntem Proteinen, notwendig ist. Abschließend muss noch die Rolle des Dodekamers und des Oktamers im Lebenszyklus von BDV betrachtet werden. Für den dodekameren Zustand liegen im Gegensatz zu dem des Oktamers Strukturinformationen vor. Diese belegen, dass die in BDVM *wt* beobachtete RNA-Bindungsstelle (Neumann *et al.* 2009) für die Ausbildung des Dodekamers nicht besetzt sein darf. Einen Hinweis auf das Vorkommen des dodekameren Zustandes findet sich in Abbildung 57 (Dautel *et al.* n.d.; Novotny 2011). So zeigte BDVM H112W in transfizierten Vero-Zellen ebenso wie BDVM *wt* einen Zustand höherer Oligomere, aber auch in geringerem Maße vorkommende niedriger oligomere Spezies. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich darunter auch der dodekamere Zustand für BDVM *wt* befindet. Allerdings ist dessen Rolle noch nicht geklärt. Denkbar ist die Funktion des dodekameren Zustandes als eine Art „Ruhe- oder Speicherzustand“ von BDVM. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Induktion des Dodekamers durch Interaktion mit einem bisher unbekanntem Bindungspartner. Indirekt könnte die Bedeutung der dodekameren Spezies am Beispiel der Variante BDVM R34/53A veranschaulicht werden, da gereinigtes BDVM R34/53A nur als Tetramer vorkommt. Das stark verzögerte Wachstum dieser Variante könnte somit sowohl auf das Fehlen des Dodekamers als auch des Oktamers zurück zu führen sein. Im zellulären Umfeld hingegen nimmt BDVM R34/53A die größte Bandbreite an oligomeren Zuständen ein, so dass das Vorkommen als Oktamer und als Dodekamer nicht ausgeschlossen werden kann. Das erschwert eine Interpretation der in dieser Arbeit beobachteten Effekte in Bezug auf den Einfluss des dodekameren bzw. oktameren Zustandes. Zusätzlich fehlen strukturelle Informationen für den Oktamerzustand von BDVM. Neumann *et al.* nehmen an, dass das Oktamer in Form eines Sandwiches aus zwei BDVM-Tetrameren gebildet wird (Neumann *et al.* 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnten Hinweise erarbeitet werden, dass entweder die beiden Arg34 und Arg53 oder aber eine Mindestlänge der gebundenen RNA Bedingung für die Ausbildung des Oktamers aus zwei Tetrameren ist. Denn für BDVM R34/53A, das nur als

Tetramer, nicht aber als Oktamer existiert, konnten nur kürzere gebundene RNA-Fragmente als für den oktameren Zustand von BDVM *wt* beobachtet werden.

Abschließend sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und deren Interpretation schematisch in Abbildung 60 zusammengefasst. Die RNA(magenta)-bindende tetramere Variante von BDVM (grün) kann entweder im Zytoplasma oder im Zellkern vorliegen. Befindet sie sich im Zytoplasma, kann sie als Homo-Oligomer an der Bildung reifer Viruspartikel (Knospung) beteiligt sein und so eine neue Zielzelle infizieren. Es ist aber auch möglich, dass der tetramere Zustand von BDVM im Zytoplasma in den dodekameren (hellblau) bzw. oktameren (orange) Zustand übergeht. Diese beiden Übergänge sind für das Tetramer auch im Zellkern denkbar. Darüber hinaus ist ein Übergang Tetramers in den monomeren, RNA-bindenden Zustand (rot) möglich. Eine Beteiligung von Wirtsfaktoren an diesen Zustandsübergängen ist noch nicht geklärt. Diese monomere, RNA-bindene Variante muss auch im Zytoplasma vorkommen, wo sie mit anderen Proteinen zusammen eine infektiöse Einheit von BDV bildet, die an der Zell-zu-Zell-Übertragung beteiligt ist. Als eine solche infektiöse Einheit ist ein BDV-RNP mit dem gebundenen viralen Genom denkbar. Für die monomere, nicht RNA-bindende Variante von BDVM (dunkelblau) ergibt sich eine unbekannte zelluläre Verteilung, ohne dass sich infektiöse Viruspartikel bzw. eine infektiöse Einheit bilden können.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, erstmals einen detaillierten Einblick in den Zusammenhang zwischen dem Oligomerisierungszustand von BDVM und dessen Fähigkeit zur ssRNA-Bindung zu erlangen. Dazu wurden verschiedene Varianten von BDVM hergestellt, die einen veränderten Oligomerisierungszustand und/oder veränderte RNA-Bindungseigenschaften aufwiesen. Schon die zur Beseitigung der aus BDVM *wt* bekannten RNA-Bindungsstelle eingebrachte Punktmutation in Position 112 führte zu einem bisher unbeschriebenen Oligomerisierungszustand als Dodekamer und zu einem veränderten Muster der gebundenen RNA. Basierend auf dieser Variante wurden weitere Mutation an den Positionen 34 und 53 eingeführt, die die Ausbildung des neuartigen Oligomerisierungszustandes verhindern sollten. Durch Kombination dieser Varianten entstand die Doppelmutante R34/53A. Sie liegt gereinigt als reiner Tetramer vor. Die Triplemutante BDVM H112W R34/53A hingegen existiert als Monomer. Weiterhin ist die Trippelmutante nicht mehr zur ssRNA-Bindung in der Lage. Während der Charakterisierung dieser Varianten im zellulären Umfeld konnten keine Unterschiede für die virale Transkriptions- und Translationsrate nachgewiesen werden. Ebenfalls unterschieden sich die zellulären Verteilungen der BDVM-Varianten nicht untereinander.

Die Proteinkristallstrukturen aller analysierten BDVM-Varianten zeigten nur kleine Differenzen untereinander. Strukturelle Neuarrangements liegen vor allem in den Loop30- und Loop50-Bereichen. Der Loop30 ist mitverantwortlich für die in BDVM *wt* beschriebene RNA-Bindung. Ist diese RNA-Bindungsstelle nicht besetzt, kann der Loop30 eine neue Konformation einnehmen. Somit stellt der Loop30 eine Art Sensor für gebundene RNA an der RNA-Bindungsstelle dar. Ist RNA gebunden, kommt es zu einer Fixierung des Loops. Ist keine RNA gebunden, kann er eine neue Konformation einnehmen. Auf dieser neuen Konformation basiert die Ausbildung des Dodekamers der Variante BDVM H112W. Es handelt sich schlussfolgernd um eine RNA-regulierte Kontrolle der Oligomerisierungszustände von BDVM. Für die monomeren Varianten hat der Loop30 keine solche Bedeutung. Darüber hinaus wurden für die Varianten BDVM R34/53A und BDVM H112W neue RNA-Bindungsstellen in dieser Arbeit identifiziert, die sich auf den *wt* übertragen lassen.

Als Resultat ergibt sich ein deutlich besseres Modell für die Bindung der ssRNA an BDVM *wt*. Dieses Modell deutet auf eine Fixierung der RNA in den kanalförmigen Vertiefungen von BDVM hin.

Die untersuchten BDVM-Varianten wiesen deutlich veränderte Ausbreitungsgeschwindigkeiten im zellulären Umfeld auf. Alle Varianten replizierten sich langsamer als der *wt*, wobei BDVM H112W die niedrigste Verbreitungsrate zeigte. In weiterführenden Experimenten konnte in Zusammenarbeit mit der AG Schwemmle (Universitätsklinikum Freiburg) bestätigt werden, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Variante BDVM H112W R34/53A in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten einer kompensatorischen Mutation steht. Besonders bevorzugt ist dabei die Mutation D95N. Die so entstandene Variante BDVM H112W R34/53A D95N ist wie BDVM H112W R34/53A ein Monomer, allerdings ist sie zur ssRNA-Bindung in der Lage und zeigt eine mit dem *wt* vergleichbare Verbreitungsrate des Virus.

Diese Arbeit verdeutlicht den Einfluss der Fähigkeit zur RNA-Bindung als auch des Oligomerisierungszustandes auf den Lebenszyklus des Virus. So unterstreichen die vorliegenden Daten in Kombination mit Resultaten aus anderen Veröffentlichungen, dass die Verbreitung des Virus über reife Virus-Partikel nur über einen hoch-geordneten homooligomeren Zustand von BDVM möglich ist. Vermutlich ist dafür die tetramere Form von BDVM der Ausgangspunkt. Dieser hoch-oligomere Zustand kann auch von den anderen Varianten in geringerem Ausmaß eingenommen werden, nicht jedoch von BDVM H112W R34/53A und BDVM H112W R34/53A D95N. Dass eine Verbreitung des Virus trotzdem auch für die monomere Form des Matrix-Proteins möglich ist, liegt an einem besonderen Infektionsweg von BDV. Dieser führt nur zu einer Infektion der Nachbarzellen über eine Zell-zu-Zell-Übertragung. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher noch unbekannt. Die vorliegenden Daten liefern aber Hinweise auf eine entscheidene Schlüsselrolle des RNA-bindenden monomeren Zustandes von BDVM bei diesem besonderen Infektionsweg.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse ergeben einen bisher unerreicht detaillierten Einblick in die Zusammenhänge zwischen der Funktion, den RNA- und den Lipid-Bindungseigenschaften eines viralen Matrix-Proteins. Diese Funktionen repräsentieren die unterschiedlichen Rollen von BDVM im viralen Lebenszyklus innerhalb der Wirtszelle. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse wird ein besseres Verständnis

der verschiedenen Übertragungswege von BDV möglich. Gleichzeitig betonen diese Ergebnisse auch die Unterschiede zu den nahen BDVM-Verwandten wie Ebola- und Marburg-Virus, welche nur über reife Viruspartikel andere Zellen infizieren können. Damit liefert diese Arbeit ein wichtiges Puzzlestück für das bessere Verständnis von viralen Infektionswegen und damit auch zu der Bekämpfung von Viruserkrankungen.

7 Referenzen

- Ackermann, A., Staeheli, P. & Schneider, U., 2007. Adaptation of Borna disease virus to new host species attributed to altered regulation of viral polymerase activity. *Journal of Virology*, 81(15), pp.7933–7940.
- Adams, P.D. *et al.*, 2002. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 58(Pt 11), pp.1948–1954.
- Banatao, D.R. *et al.*, 2006. An approach to crystallizing proteins by synthetic symmetrization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), pp.16230–16235.
- Belyi, V.A., Levine, A.J. & Skalka, A.M., 2010. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathogens*, 6(7), p.e1001030.
- Beniac, D.R. *et al.*, 2012. The organisation of Ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS one*, 7(1), p.e29608.
- Bharat, T.A.M. *et al.*, 2011. Cryo-Electron Tomography of Marburg Virus Particles and Their Morphogenesis within Infected Cells. *PLoS Biology*, 9(11), p.e1001196.
- Bharat, T.A.M. *et al.*, 2012. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), pp.4275–4280.
- Bode *et al.*, 1996. First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Molecular Psychiatry*, 1(3), pp.200–212.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Braz & Howard, 2009. Separation of protein oligomers by blue native gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 388(1), pp.170–172.
- Briese *et al.*, 1994. Genomic organization of Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp.4362–6.
- Carugo, O. & Argos, P., 1997. Protein-protein crystal-packing contacts. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 6(10), pp.2261–2263.
- Chase, G. *et al.*, 2007. Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *Journal of Virology*, 81(2), pp.743–9.

- Chen, V.B. *et al.*, 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 1), pp.12–21.
- Chruszcz, M. *et al.*, 2008. Analysis of solvent content and oligomeric states in protein crystals--does symmetry matter? *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 17(4), pp.623–632.
- Ciancanelli, M.J. & Basler, C.F., 2006. Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *Journal of Virology*, 80(24), pp.12070–12078.
- Clemente *et al.*, 2009. Borna disease virus requires cholesterol in both cellular membrane and viral envelope for efficient cell entry. *Journal of Virology*, 83(6), pp.2655–2662.
- Clemente & de la Torre, 2007. Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein. *Journal of Virology*, 81(11), pp.5968–5977.
- Cubitt, Oldstone, Valcarcel, J., *et al.*, 1994. RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Research*, 34(1), pp.69–79.
- Cubitt, Oldstone & de la Torre, J C, 1994. Sequence and genome organization of Borna disease virus. *Journal of Virology*, 68(3), pp.1382–96.
- Daito, T. *et al.*, 2011. A novel borna disease virus vector system that stably expresses foreign proteins from an intercistronic noncoding region. *Journal of virology*, 85(23), pp.12170–12178.
- Dautel *et al.*, in preparation.
- Degiorgis, M.P. *et al.*, 2000. Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), pp.3087–91.
- Dessen *et al.*, 2000. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *The EMBO Journal*, 19(16), pp.4228–36.
- Dürwald *et al.*, 2007. Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Reviews in Medical Virology*, 17(3), pp.181–203.
- Emsley, P. & Cowtan, K., 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 60(Pt 12 Pt 1), pp.2126–2132.
- Fabozzi, G. *et al.*, 2011. Ebolavirus proteins suppress the effects of small interfering RNA by direct interaction with the mammalian RNA interference pathway. *Journal of Virology*, 85(6), pp.2512–2523.

- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F., 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13), pp.2606–2617.
- Garoff, H., Hewson, R. & Opstelten, D.J., 1998. Virus maturation by budding. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(4), pp.1171–1190.
- Gaudier, M., Gaudin, Y. & Knossow, M., 2002. Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein. *The EMBO Journal*, 21(12), pp.2886–2892.
- Ge, P. *et al.*, 2010. Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), pp.689–693.
- Gomis-Rüth, F.X. *et al.*, 2003. The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. *Structure (London, England: 1993)*, 11(4), pp.423–33.
- Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B & de la Torre, J C, 1998. Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *Journal of Virology*, 72(1), pp.783–788.
- Graham, S.C. *et al.*, 2008. Rhabdovirus matrix protein structures reveal a novel mode of self-association. *PLoS Pathogens*, 4(12), p.e1000251.
- Hagiwara, Matoba, Y. & Asakawa, M., 2009. Borna disease virus in Raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 71(8), pp.1009–1015.
- Harcourt, B.H. *et al.*, 2000. Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology*, 271(2), pp.334–349.
- Harty, R.N., 2009. No exit: targeting the budding process to inhibit filovirus replication. *Antiviral Research*, 81(3), pp.189–197.
- Heinrich, B.S. *et al.*, 2012. Structural properties of the C-terminus of vesicular stomatitis virus N protein dictate N-RNA complex assembly, encapsidation and RNA synthesis. *Journal of Virology*, 86(16), pp.8720–9.
- Herzog & Rott, 1980. Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Medical Microbiology and Immunology*, 168(3), pp.153–158.
- Hilbe *et al.*, 2006. Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), pp.675–677.
- Hoenen, T. *et al.*, 2010. Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription. *Journal of Virology*, 84(14), pp.7053–7063.
- Hoenen, T. *et al.*, 2005. VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *Journal of Virology*, 79(3), pp.1898–905.
- Honkavuori *et al.*, 2008. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12), pp.1883–1886.

- Horie, M. *et al.*, 2010. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*, 463(7277), pp.84–87.
- Hornig *et al.*, 2012. Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Molecular psychiatry*, 17(5), pp.486–493.
- Huang, X. *et al.*, 2001. Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology*, 287(2), pp.405–416.
- Iben, B., 2006. Borna-Disease-Virus (BDV)-Erkrankungen. *Großtierpraxis*, 7(04), pp.138–146.
- Jacobsen *et al.*, 2010. Borna Disease in an Adult Alpaca Stallion (*Lama pacos*). *Journal of Comparative Pathology*, 143(2-3), pp.203–8.
- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 2), pp.125–132.
- Kalinowska-Tłuścik, J. *et al.*, 2010. A triclinic crystal form of Escherichia coli 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase and reassessment of the quaternary structure. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(Pt 3), pp.237–241.
- Kinnunen, P.M. *et al.*, 2011. Intracerebral Borna disease virus infection of bank voles leading to peripheral spread and reverse transcription of viral RNA. *PloS One*, 6(8), p.e23622.
- Kliche, S. *et al.*, 1994. Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *Journal of Virology*, 68(11), pp.6918–23.
- Knipe, Howley & Griffin, 2006. *Fields Virology* 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins.
- Kobayashi *et al.*, 2001. Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Virology*, 75(7), pp.3404–3412.
- Kobayashi *et al.*, 2011. No evidence for natural selection on endogenous borna-like nucleoprotein elements after the divergence of Old World and New World monkeys. *PloS One*, 6(9), p.e24403.
- Kobayashi *et al.*, 1998. Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology*, 243(1), pp.188–97.
- Kobayashi *et al.*, 2000. Translation initiation of a bicistronic mRNA of Borna disease virus: a 16-kDa phosphoprotein is initiated at an internal start codon. *Virology*, 277(2), pp.296–305.
- Kraus *et al.*, 2002. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein of Borna disease virus. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 58(Pt 8), pp.1371–1373.
- Kraus, 2002. Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit.

- Kraus *et al.*, 2005a. Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Letters*, 579(12), pp.2686–92.
- Kraus *et al.*, 2005b. Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS Letters*, 579(12), pp.2686–2692.
- Kraus *et al.*, 2001. Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *Journal of Virology*, 75(24), pp.12098–104.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lenard, J., 1996. Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in a family? *Virology*, 216(2), pp.289–298.
- Leslie, A.G.W., 2006. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 62(Pt 1), pp.48–57.
- Lieber, D., 2006. Nukleinsäure-Bindungseigenschaften des Matrixproteins des Virus der Bornaschen Krankheit.
- Liljeroos, L. *et al.*, 2011. Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), pp.18085–18090.
- Lowry, O.H. *et al.*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), pp.265–275.
- Ludwig, Bode, L. & Gosztonyi, G., 1988. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Progress in Medical Virology. Fortschritte Der Medizinischen Virusforschung. Progrès En Virologie Médicale*, 35, pp.107–151.
- Luger, K. *et al.*, 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251–260.
- Magee, J. & Warwicker, J., 2005. Simulation of non-specific protein–mRNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 33(21), pp.6694–6699.
- Maget-Dana, R., 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1462(1-2), pp.109–140.
- McCoy, A.J. *et al.*, 2005. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 61(Pt 4), pp.458–464.
- McDonnell, J.M. *et al.*, 1998. Solution structure and dynamics of the bioactive retroviral M domain from Rous sarcoma virus. *Journal of Molecular Biology*, 279(4), pp.921–928.

- Mihindukulasuriya, K.A. *et al.*, 2009. Nyamanini and midway viruses define a novel taxon of RNA viruses in the order Mononegavirales. *Journal of Virology*, 83(10), pp.5109–5116.
- Money, V.A. *et al.*, 2009. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), pp.4441–4446.
- Morales, J.A. *et al.*, 1988. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Medical Microbiology and Immunology*, 177(2), pp.51–68.
- Murray *et al.*, 2005. Retroviral matrix domains share electrostatic homology: models for membrane binding function throughout the viral life cycle. *Structure (London, England: 1993)*, 13(10), pp.1521–1531.
- Murshudov, G.N. *et al.*, 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 4), pp.355–367.
- Nesterenko, M.V., Tilley, M. & Upton, S.J., 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 28(3), pp.239–242.
- Neumann *et al.*, 2009. Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), pp.3710–3715.
- Neumann, G. *et al.*, 2005. Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *Journal of Virology*, 79(16), pp.10300–10307.
- Nguyen *et al.*, 2005. An all-atom model of the pore-like structure of hexameric VP40 from Ebola: structural insights into the monomer-hexamer transition. *Journal of Structural Biology*, 151(1), pp.30–40.
- Novotny, R., 2011. Funktionelle Charakterisierung des Matrix Proteins des Borna Disease Virus.
- Nunes *et al.*, 2008. RNA from Borna disease virus in patients with schizophrenia, schizoaffective patients, and in their biological relatives. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 22(4), pp.314–320.
- Okamoto *et al.*, 2003. Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Archives of Virology*, 148(8), pp.1557–1568.
- Panchal, R.G. *et al.*, 2003. In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), pp.15936–15941.
- Patch, J.R. *et al.*, 2008. The YPLGVG sequence of the Nipah virus matrix protein is required for budding. *Virology journal*, 5, p.137.

- Pauli, G. & Ludwig, H., 1985. Increase of virus yields and releases of Borna disease virus from persistently infected cells. *Virus Research*, 2(1), pp.29–33.
- Perez *et al.*, 2003. A reverse genetics system for Borna disease virus. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 11), pp.3099–3104.
- Perez *et al.*, 2007. Generation and characterization of a recombinant vesicular stomatitis virus expressing the glycoprotein of Borna disease virus. *Journal of Virology*, 81(11), pp.5527–5536.
- Perez & de la Torre, 2005. Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 7), pp.1891–5.
- Planz, O., Bilzer, T. & Stitz, L., 1995. Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *Journal of Virology*, 69(2), pp.896–903.
- Plevka, P., Tars, K. & Liljas, L., 2008. Crystal packing of a bacteriophage MS2 coat protein mutant corresponds to octahedral particles. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 17(10), pp.1731–1739.
- Poenisch, M. *et al.*, 2009. Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *Journal of Virology*, 83(9), pp.4297–4307.
- Poenisch, M. *et al.*, 2004. The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 7), pp.1895–8.
- Pringle, 1991. The order Mononegavirales. *Archives of Virology*, 117(1), pp.137–140.
- Puorger, M.E. *et al.*, 2010. Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Veterinary Pathology*, 47(2), pp.236–244.
- Reuter, M. *et al.*, 2009. Poly-l-lysines and poly-l-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophysical Chemistry*, 144(1-2), pp.27–37.
- Rinder *et al.*, 2009. Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *Journal of Virology*, 83(11), pp.5401–5407.
- Rodríguez, L. *et al.*, 2004. Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 3), pp.709–719.
- Rudolph, M.G. *et al.*, 2003. Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Structure (London, England: 1993)*, 11(10), pp.1219–1226.

- Ruigrok, R.W. *et al.*, 2000. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *Journal of Molecular Biology*, 300(1), pp.103–112.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp.5463–5467.
- Sauder *et al.*, 2001. Learning deficits in mice with persistent Borna disease virus infection of the CNS associated with elevated chemokine expression. *Behavioural Brain Research*, 120(2), pp.189–201.
- Sauder & Staeheli, 2003. Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *Journal of Virology*, 77(23), pp.12886–12890.
- Schädler, R., Diringer, H. & Ludwig, H., 1985. Isolation and characterization of a 14500 molecular weight protein from brains and tissue cultures persistently infected with borna disease virus. *The Journal of General Virology*, 66 (Pt 11), pp.2479–84.
- Schneemann, A. *et al.*, 1994. Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *Journal of Virology*, 68(10), pp.6514–22.
- Schneider, Schneemann, A. & Lipkin, W I, 1994. RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *Journal of Virology*, 68(8), pp.5007–12.
- Schwemmle *et al.*, 1998. Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15), pp.9007–12.
- Schwemmle *et al.*, 1999. Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet*, 354(9194), pp.1973–1974.
- Scianimanico, S. *et al.*, 2000. Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *The EMBO Journal*, 19(24), pp.6732–41.
- Sha, B. & Luo, M, 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nature Structural Biology*, 4(3), pp.239–244.
- Shankar, V. *et al.*, 1992. Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *Journal of Virology*, 66(2), pp.992–998.
- Shoya, Y. *et al.*, 1998. Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein. *Journal of Virology*, 72(12), pp.9755–62.
- von Sind, 1767. *Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt: Welcher einen gründlichen Unterricht von den gewöhnlichsten Krankheiten der*

Pferde im Feld und auf der Reise, Wie auch einen auserlesenen Vorrath der nützlichsten und durch die Erfahrung bewährtesten Heilungsmitteln eröffnet,

- Srb *et al.*, 2011. Oligomerization of a retroviral matrix protein is facilitated by backbone flexibility on nanosecond time scale. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 115(11), pp.2634–2644.
- Staehele *et al.*, 2000. Epidemiology of Borna disease virus. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 9), pp.2123–35.
- Staehele, Rinder, M. & Kaspers, B., 2010. Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *Journal of Virology*, 84(13), pp.6269–6275.
- Taniyama *et al.*, 2001. Equine Borna disease in Japan. *The Veterinary Record*, 148(15), pp.480–2.
- Thakur, Sarma, S. & Sharma, B., 2009. Role of Borna disease virus in neuropsychiatric illnesses: are we inching closer? *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), pp.191–201.
- Timmins, Ruigrok, R.W.H. & Weissenhorn, W., 2004. Structural studies on the Ebola virus matrix protein VP40 indicate that matrix proteins of enveloped RNA viruses are analogues but not homologues. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), pp.179–86.
- Tomonaga, K *et al.*, 2000. Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), pp.12788–93.
- Tomonaga, Kobayashi & Ikuta, K., 2002. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 4(4), pp.491–500.
- de la Torre, 2002. Bornavirus and the brain. *The Journal of Infectious Diseases*, 186 Suppl 2, pp.S241–7.
- de la Torre, 2006. Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease virus. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(10), pp.777–83.
- Vagin & Teplyakov, 2010. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 1), pp.22–25.
- Vlach *et al.*, 2009. Nonmyristoylated matrix protein from the Mason-Pfizer monkey virus forms oligomers. *Journal of Molecular Biology*, 390(5), pp.967–980.
- Walther, 1899. Gehirn-Rückenmarksentzündung bei Pferden und Schafen in der Amtshauptmannschaft Borna. *Mitteilungen aus den Berichten der Bezirkstierärzte auf das Jahr 1896. Ber. Veterinärwesen Königr. Sachsen.*, 44, p.80.
- Walther, 1896. Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde in der Amtshauptmannschaft Borna. *Mitteilungen aus den Berichten der*

- Bezirkstierärzte auf das Jahr 1896. Ber. Veterinärwesen Königr. Sachsen.*, 41, pp.123–124.
- Warburg & Christian, 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, (310), pp.384 – 421.
- Wehner, T. *et al.*, 1997. Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 10), pp.2459–66.
- Weiner, M.P. *et al.*, 1994. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151(1-2), pp.119–123.
- Wetlaufer, 1962. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Advan. Prot.Chem.*, 17, pp.303–90.
- Wittig, I., Braun, H.-P. & Schägger, H., 2006. Blue native PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), pp.418–428.
- Yamayoshi, S. & Kawaoka, Y., 2007. Mapping of a region of Ebola virus VP40 that is important in the production of virus-like particles. *The Journal of Infectious Diseases*, 196 Suppl 2, pp.S291–295.
- Yasuda & Hunter, 2000. Role of matrix protein in the type D retrovirus replication cycle: importance of the arginine residue at position 55. *Virology*, 268(2), pp.533–538.

8 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Leipzig, den

Philipp Dautel

9 Lebenslauf

geboren am 26.12.1982 in Stuttgart-Bad Cannstatt

verheiratet, zwei Kinder

Werdegang

seit Feb 2012	Institut Dr. Appelt GmbH & Co. KG, Mitarbeiter im Bereich Rückstands- und Pestizidanalytik
Okt 2010 – Sep 2011	Fernstudium „Gewerblicher Rechtsschutz“ an der Fernuniversität Hagen
Sep 2010 – Mrz 2011	Elternzeit
Jun 2010 – Aug 2010	Forschungsaufenthalt am Universitätsklinikum Freiburg, Arbeitsgruppe Prof. Schwemmler „Zellbasierte Charakterisierung verschiedener Mutanten des Matrixproteins der Bornaschen Krankheit“
Feb 2009 – Feb 2011	Studentischer Sprecher des Graduiertenkollegs 1026 „Conformational transitions in macromolecular interactions“
seit Apr 2008	Promotion am Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle, Arbeitsgruppe Prof. Stubbs Thema: „Borna disease virus matrix protein: an RNA – membrane adaptor?“ Stipendiat im DFG Graduiertenkolleg 1026 „Conformational transitions in macromolecular interactions“
Okt 2007 – Mrz 2008	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig, Arbeitsgruppe Prof. Arnhold „Rolle der Myeloperoxidase bei der Phagozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch Makrophagen“
Okt 2005 – Sep 2007	Hauptstudium im Fach Biochemie an der Universität Leipzig, Abschluss Diplom-Biochemiker
Jul 2006 – Sep 2006	Projektarbeit am Institute for Pharmacology, Kopenhagen, Dänemark, Arbeitsgruppe Prof. Schwartz „Transferring a metal ion binding site from the chemokine receptor CXCR3 in the chemokine receptors XCR1 and CCR7“
Okt 2003 – Sep 2005	Grundstudium im Fach Biochemie an der Universität Bayreuth

Ersatzdienst / Wehrdienst

Aug 2002 – Jun 2003 Zivildienst in der Jugendherberge Pfahlberg (Hallwangen)

Schulbildung

Sep 1993 – Jun 2002 Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Gerlingen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen, Präsentationen und Poster

Publikationen:

Neumann, P. Lieber, D. Meyer, S. **Dautel, P.** Kerth, A. Kraus, I. Garten, W. & Stubbs, M. T. (2009).

Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3710-3715.

Flemmig, J. Lessig, J. Reibetanz, U. **Dautel, P.** & Arnhold, J. (2008).

Non-vital polymorphonuclear leukocytes express myeloperoxidase on their surface. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 21(4), 287-96.

Präsentationen:

12th „Heart of Europe bio-Crystallography Meeting“, Třešť, Tschechische Republik, 24. – 26. September, 2009

„Influence of RNA binding on the structure of the Borna disease virus matrix protein“

Poster:

2nd International Meeting "Conformational Transitions in macromolecular interactions", Halle, 03 – 05. März 2011

“Influence of RNA binding on the structure and functionality of Borna disease virus matrix protein”

4ter Posterpreis

42nd crystallographic course, Erice, Italien, 03. – 13. Juni 2010

“Influence of RNA binding on the structure of Borna disease virus matrix protein”

17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, Hannover, 09. – 12. März 2009

„Borna disease virus matrix protein – an RNA membrane adaptor?“

7. Research Festival for Life Science, Leipzig, 12. Dezember 2008

„Influence of RNA binding on the structure of the Borna disease virus matrix protein”

Leipzig, den

Philipp Dautel

10 Danksagung

An dieser Stelle ist es Zeit Dank zu sagen an all diejenigen, die, direkt oder indirekt, bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit mitgewirkt haben. Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei:

- Prof. Milton T. Stubbs, der mir überhaupt erst die Möglichkeit gegeben hat, diese interessante und sehr lehrreiche Arbeit anzufertigen. Des Weiteren möchte ich ihm für die vielen Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen danken. Vor allem möchte ich mich für das Vertrauen, das er meiner eigenständigen Arbeitsweise entgegen gebracht hat bedanken.
- AG Stubbs: Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe für das freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsumfeld während meiner Dissertation danken. Ganz besonderer Dank gilt dabei:
 - Dr. Piotr Neumann, der die harte Arbeit hatte, mich in die Kristallographie einzuführen
 - Dr. Anita Hoffmann, der die undankbare Arbeit zukam, mich einzulernen
 - Christoph Parthier: für die Hilfestellung bei allen Fragen rund um Kristalle und deren Datensätze
 - Petr Kolenke: für die Hilfe an den für diese Arbeit genutzten Datensätzen und die Diskussionsbereitschaft für das Paper
 - der 9 Uhr Kaffee-Runde: Annett Weidner, Uwe Fandrich, Michael Schöpfel, Christian Ursel – es war mir stets ein Vergnügen
- Prof. Martin Schwemmler dafür, dass ich einen sehr lehrreichen Forschungsaufenthalt in seiner Arbeitsgruppe absolvieren durfte! Darüber hinaus möchte ich mich auch bei seiner gesamten Arbeitsgruppe, die mir gegenüber stets freundschaftlich und hilfsbereit war bedanken. Im Besonderen möchte ich dabei nennen:
 - Dr. Arnold Martin: für die unermüdliche Hilfe bei allen Fragen rund um das Leben des Bornavirus in der Zelle, sei es methodisch oder theoretisch und für die gute Zeit in Freiburg und Borna!

- Renata Novotny: für die unermüdliche Arbeit an meinen offenen Aufgaben und dafür, dass alle unsere Wünsche im Bezug auf das Projekt so schnell realisiert wurden
- dem Graduiertenkolleg 1026 „Conformational transitions in macromolecular interactions“ für die finanzielle Unterstützung, die unproblematischen Kooperationsmöglichkeiten, die sehr hilfreichen Diskussionen und das sehr angenehme Umfeld. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Martina Richter: Danke für Deine Hilfestellung, die Beantwortung meiner unzähligen Fragen, die Bifis, die Kekse und alles Weitere!
- PD Dr. Hauke Lilie: für die fruchtbaren Diskussionen und dafür, dass die UZ genau das geliefert hat was ich brauchte
- Dr. Uwe Kühn (AG Wahle): dafür, dass ich die Experimente zur radioaktiven Markierung machen durfte, für die Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft
- Dr. Andreas Kerth und Tina Brehmer (AG Blume): dafür, dass ich die Messungen an den Monoschichten machen durfte und für die Hilfestellung, die mir dabei zuteil wurde
- all denjenigen, die sich freundlicherweise bereit erklärt haben, diese Arbeit Korrektur zu lesen
- meiner Familie: allen voran meiner Frau Franziska, die mich während der gesamten Zeit meiner Promotion unterstützt und motiviert hat! 1000 Dank dafür, Du bist die Beste! Ein großer Dank geht natürlich auch an unsere zwei Jungs Emanuel und Jeremias, niemand hat mich besser auf andere Gedanken gebracht!
- meinen Eltern: für all die Unterstützung, sei es persönlich, emotional oder finanziell, während meiner gesamten bisherigen Laufbahn! Danke!
- meinen Schwiegereltern: ebenfalls für die Unterstützung, gleich welcher Art, seit ich Eure Tochter an meiner Seite weiß!