

Aus der Abteilung für Virologie  
(komm. Direktor Prof. Dr. med. F. T. Hufert)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

**Klonierung der Genomsegmente des Oropouche-Virus  
und  
Charakterisierung der Interferon-antagonistischen Aktivität  
des S-Segment-kodierten NSs-Proteins**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Katharina Keisers geb. Brinks  
aus Göttingen  
Göttingen 2014

Die Dissertationsarbeit wurde im Zeitraum März 2006 bis August 2009 unter der Betreuung von Dr. rer. nat. Martin Spiegel erstellt.

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**I. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. F. T. Hufert

**II. Berichterstatter:** Prof. Dr. rer. nat. L. Walter

**III. Berichterstatter:** Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

**Tag der mündlichen Prüfung:** 04.02.2015

## Abkürzungen

### A

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein 1 (ATF-2/c-Jun dimer)</i>
AS	Aminosäure

### B

BDV	<i>Borna-disease virus</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BUNV	Bunyamwera-Virus

### C

CA	<i>constitutively active</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspase-aktivierende und -rekrutierende Domäne
CARV	Caraparu-Virus
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Zytomegalie-Virus

### D

dam/dcm	<i>deficient in adenine/cytosine methylation</i>
ds	<i>double stranded</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat

### E

EBOV	Ebola-Virus
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

### F

FADD	<i>Fas-associated Death Domain Protein</i>
FF	<i>firefly</i>
FKS	fetales Kälberserum

**G**

GAF	<i>gamma-activated factor</i>
GAS	<i>gamma-activated sequence</i>
GMAV	Guama-Virus
GROV	Guaroa-Virus

**H**

HHV-8	Humanes-Herpes-Virus 8
HSV	Herpes-simplex-Virus

**I**

IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor
IL	Interleukin
IPS1	<i>interferon-<math>\beta</math>-promotor-stimulator 1</i>
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>

**J**

JAK	Januskinasen
-----	--------------

**K**

Kb	Kilobasen
kD	Kilodalton

**L**

LB	Luria-Bertani
LUC	Luciferase

**M**

MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation associated gene 5</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene</i>

**N**

N	Nukleoprotein
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>

NS Nichtstruktur (-protein)  
NTR nicht translatierte Region

## O

ORF *open reading frame*  
OROV Oropouche-Virus

## P

PAMP *pathogen-associated molecular pattern*  
PBS *phosphate buffered saline*  
PCR *polymerase chain reaction*  
pDCs plasmazytoide dendritische Zellen  
PKR Proteinkinase R  
PM Punktmutation  
poly(I:C) poly (Inositol:Cytosin)  
PRD *positive regulatory domain*  
PRR *pattern recognition receptor*

## R

REN *Renilla*  
RIG-I *retinoic acid inducible gene 1*  
RIP-1 *Receptor-interacting protein 1*  
RNA *ribonucleic acid*  
RNAP II zelluläre RNA-Polymerase II  
RNP Ribonukleoprotein-(Komplex)  
RT Reverse Transkriptase  
RVFV Rift-Valley-Fever-Virus

## S

SOCS1 *suppressor of cytokine signaling 1*  
STAT *signal transducer and activator of transcription*  
ss *single-stranded*

## T

TAE Tris-Acetat-EDTA (-Puffer)  
TAK *TGF- $\beta$ -activated kinase*  
TANK *TRAF-family-members-associated NF $\kappa$ B activator*  
Taq *Thermus aquaticus*  
TBE Tris-Borat-EDTA  
TBK-1 *TANK-binding Kinase 1*

TBP	<i>tata-box-binding-protein</i>
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>tumor-necrosis-factor (TNF) –receptor-associated-factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase

## **U**

ÜNK	Über-Nacht-Kultur
U	unit

## **V**

VSV	Vesikuläres-Stomatitis-Virus
-----	------------------------------

## **W**

wt	Wildtyp
----	---------

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Interferonsystem.....</b>	<b>11</b>
1.1.1	Interferone und ihre molekularen Eigenschaften.....	11
1.1.2	Die Induktion des Typ-I-Interferons.....	12
1.1.2.1	Der intrazelluläre Signalweg.....	12
1.1.2.2	Der Toll-like-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionsweg.....	13
1.1.2.3	Die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors.....	15
1.1.3	Wirkungsweise der Typ-I-Interferone.....	15
1.1.4	Virale Interferon-Antagonisten .....	16
<b>1.2</b>	<b>Die Familie der Bunyaviren .....</b>	<b>18</b>
1.2.1	Aufbau der Bunyaviren.....	19
1.2.2	Nichtstrukturproteine der Bunyaviren .....	20
1.2.3	Replikationszyklus der Bunyaviren .....	21
1.2.4	Das Oropouche-Virus.....	21
<b>1.3</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Plasmide .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	26
2.2.2	Transformation von Bakterienzellen .....	27
2.2.3	Blau-Weiß-Screening mit X-Gal .....	28
2.2.4	Plasmid-DNA-Isolierungen .....	29
2.2.4.1	Minipräparation.....	29
2.2.4.2	Midipräparation.....	29
2.2.5	Restriktionsverdau von DNA.....	30
2.2.6	Dephosphorylierung von DNA .....	30
2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	31

2.2.7.1	TA-Klonierung.....	31
2.2.7.2	Sticky-end- und Blunt-end-Ligationen.....	33
2.2.8	Analytische Polymerasekettenreaktion (PCR), Colony PCR, Präparative PCR .....	34
2.2.9	Auftrennung von DNA im Agarosegel .....	36
2.2.10	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	37
2.2.11	Aufkonzentrierung von PCR-Produkten.....	37
2.2.12	Sequenzierung .....	38
2.2.13	Ortsspezifische Mutagenese .....	38
2.2.14	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen.....	40
2.2.15	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	40
2.2.16	Reverse Transkription von RNA in cDNA .....	41
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.3.1	Kultivierung adhärenter Zellen.....	42
2.3.2	Transfektion .....	43
2.3.3	Dual-Luciferase-Reporterassay .....	44
2.3.4	Das Minireplikon-System.....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung der ORFs der OROV-Genomsegmente zur Etablierung eines Minireplikon- und Reverse-Genetik-Systems.....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Herstellung der Expressionsvektoren .....	48
3.1.1.1	Klonierung der OROV-L-ORF-cDNA-Fragmente.....	48
3.1.1.2	Klonierung des L-ORF in den Expressionsvektor pl. 18 .....	54
3.1.1.3	Klonierung der OROV-M-ORF cDNA-Fragmente .....	57
3.1.1.4	Klonierung des M-ORF in den Expressionsvektor pl.18 .....	61
3.1.1.5	Klonierung der OROV-S-ORF-cDNA .....	62
3.1.1.6	Subklonierung des OROV-S-ORF in den Expressionsvektor pl.18 .....	64
3.1.2	Herstellung der Rescuevektoren.....	64
3.1.2.1	Der Rescuevektor pT7-riboSM2-OROV-cL.....	65

3.1.2.2	Der Rescuevektor pT7-riboSM2-cM .....	69
3.1.2.3	Der Rescuevektor pT7-riboSM2-cS.....	71
3.1.3	<i>Herstellung der Vektoren für OROV-Smut.....</i>	73
3.1.3.1	Der Rescuevektor pT7-riboSM2-OROV-cSmut .....	73
3.1.3.2	Subklonierung des Smut-ORF in den Expressionsvektor pl.18.....	78
3.1.3.3	Herstellung des Minigenom-Plasmids pT7riboSM2-cMpro-cRL.....	79
3.1.3.4	Herstellung des Minigenom-Plasmids pT7riboSM2-vMpro-vRL .....	79
<b>3.2</b>	<b><i>Einfluss des OROV-NSs auf die IFN-Induktion.....</i></b>	<b>86</b>
3.2.1	<i>Interferon-Expression nach OROV-Infektion .....</i>	86
3.2.2	<i>Charakterisierung der IFN-antagonistischen Aktivität von OROV-NSs .....</i>	87
3.2.2.1	Klonierung der OROV-NSs-cDNA in pcDNA3.1 .....	87
3.2.2.2	Umklonierung der OROV-NSs-cDNA aus pcDNA3.1-OROV-NSs in den eukaryontischen Expressionsvektor pl.18.....	92
3.2.2.3	Wirkung des OROV-NSs auf die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors.....	94
3.2.2.4	Einfluss des OROV-NSs auf die Transkriptionsfaktoren, die an der Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors beteiligt sind .....	100
3.2.2.5	Wirkung des OROV-NSs auf den Transkriptionsfaktor AP1 in humanen 293-Zellen .....	106
3.2.2.6	Wirkung des OROV-NSs auf den SV40-Promotor zur Expression der Renilla- Luciferase-Aktivität in 293- und VeroE6-Zellen.....	108
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>111</b>
4.1	<b><i>Klonierung der OROV-ORFs und Herstellung der Rescue- und Expressionsplasmide für das Minireplikon- und Reverse-Genetik-System.....</i></b>	<b>111</b>
4.2	<b><i>Etablierung des OROV-Minireplikon-Systems .....</i></b>	<b>114</b>
4.3	<b><i>Die Interferon-antagonistische Wirkung des OROV-NSs.....</i></b>	<b>116</b>
4.3.1	<i>Die Hemmung der IFN-Induktion durch OROV.....</i>	116
4.3.2	<i>Die antagonistische Wirkung des OROV-NSs auf die Aktivierung des IFN-<math>\beta</math>-Promotors .....</i>	117
4.3.3	<i>Die antagonistische Wirkung des OROV-NSs auf IRF3-, NF<math>\kappa</math>B- und AP1-responsive Promotoren .....</i>	118
4.3.4	<i>Einfluss des OROV-NSs auf die Translokation von IRF3 in den Zellkern .....</i>	119

4.3.5	<i>Die hemmende Wirkung des OROV-NSs auf den konstitutiv aktiven SV40-Promotor.</i>	121
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>130</b>
<b>7.1</b>	<b><i>OROV-L-ORF</i> .....</b>	<b>131</b>
<b>7.2</b>	<b><i>OROV-M-ORF</i> .....</b>	<b>136</b>
<b>7.3</b>	<b><i>OROV-S-ORF</i> .....</b>	<b>139</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Interferonsystem

M. Hoskins, G. M. Findlay und F. MacCallum (Hoskins 1935; Findlay und MacCallum 1937) fanden heraus, dass Versuchstiere, die simultan mit pantropen und neurotropen Gelbfiebertviren infiziert worden waren, vor einer Erkrankung durch das pantrope Virus geschützt waren. Die Ursache dieses als Interferenz bezeichneten Phänomens entdeckten Alick Isaacs und Jean Lindenmann (Isaacs und Lindenmann 1957) zwei Jahrzehnte später. In bebrüteten Hühnereiern wiesen sie ein säureresistentes Protein nach, das für den Abwehrmechanismus verantwortlich ist, und nannten es nach dem Interferenzphänomen „Interferon“ (IFN). Die Induktion des Interferons wird nach einer Virusinfektion durch virale Nukleinsäuren ausgelöst. Viele Viren haben deshalb Strategien entwickelt, die Aktivierung des IFN-Systems zu unterlaufen. Hierzu zählen die Unterdrückung der IFN-Synthese, die Ausschaltung des IFN-Signalweges oder die Blockierung der Aktivierung von antiviralen Effektorproteinen (Haller und Weber 2009).

### 1.1.1 Interferone und ihre molekularen Eigenschaften

Die Interferone werden in drei Gruppen eingeteilt, das Typ-I-, das Typ-II- sowie das Typ-III-Interferon (Theofilopoulos et al. 2005). Neben ihrer antiviralen Aktivität haben die Interferone zahlreiche immunregulatorische Funktionen und beeinflussen sowohl das spezifische als auch das unspezifische Immunsystem (Theofilopoulos et al. 2005). In der Zellphysiologie spielen Interferone eine zentrale Rolle, indem sie Einfluss auf das Zellwachstum und die Apoptose der Zellen ausüben (Mondini et al. 2010). Interferone wirken tumorhemmend, da sie die Zellteilung unterdrücken (Kalvakolanu et al. 2010).

Die antiviral wirkenden Typ-I-Interferone werden als Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) und Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) bezeichnet. Es gibt mehrere Subtypen des IFN- $\alpha$ , während vom IFN- $\beta$  nur ein Subtyp existiert. Im Menschen werden die Interferone auf Chromosom 9 codiert. Sie bestehen aus 166 Aminosäuren (AS) und haben ein Molekulargewicht von 20 kD (Diaz et al. 1994; Pestka 2000). Beide Interferonsubtypen hemmen die Virusreplikation und können von allen virusinfizierten Zellen synthetisiert werden, wobei mit Ausnahme der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) zunächst IFN- $\beta$  und nachgeschaltet IFN- $\alpha$  gebildet wird (Jefferies und Fitzgerald 2005). Die IFN-Induktion erfolgt durch virale Nukleinsäuren wie z. B. Doppelstrang-RNA (dsRNA) (Brennan und Bowie 2010), kann jedoch auch mithilfe von synthetischen Substanzen wie Polyinositolcytidinsäure (poly(I:C)) induziert werden (Colby und Morgan 1971). Die Interferone werden von der infizierten Zelle sezerniert und binden parakrin und autokrin an Typ-I-Interferonrezeptoren, die sich auf allen Zelltypen befinden, um die Produktion antiviral aktiver Proteine einzuleiten. Typ-I-Interferone spielen in der wirtseigenen Virusabwehr

eine wichtige Rolle, da sie bereits antiviral wirken, bevor das adaptive Immunsystem dazu in der Lage ist (Modrow et al., 2003).

Interferon- $\gamma$  ist ein säurelabiles Typ-II-Interferon, das keinerlei Homologie zu IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  aufweist. Es wird in durch Antigenkontakt stimulierten T-Helferzellen, in aktivierten Makrophagen und in natürlichen Killerzellen gebildet. Seine antivirale Wirkung wird über Typ-II-Rezeptoren vermittelt und liegt im Wesentlichen in der Stimulation des adaptiven Immunsystems (Billiau und Matthys 2009).

Daneben existiert eine weitere Gruppe, die Typ-III-Interferone IFN- $\lambda$ 1 (= IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (= IL-28A) und IFN- $\lambda$ 3 (= IL-28B) (Kotenko et al. 2003; Sheppard et al. 2003; Ank et al. 2006). Die Typ-III-Interferone weisen ebenfalls eine antivirale Wirkung auf und werden direkt durch eine Infektion induziert (Kotenko et al. 2003; Sheppard et al. 2003; Ank et al. 2006). Es besteht keine Sequenzhomologie zu den anderen Interferonen. Auch binden sie an einen eigenständigen Rezeptorkomplex (Vilcek 2003). Die strukturellen und genetischen Unterschiede des Typ-III-Interferons führten zur Definition einer neuen Interferon-Familie.

### 1.1.2 Die Induktion des Typ-I-Interferons

Eine Infektion der Zelle durch Viren oder andere mikrobielle Erreger kann durch besondere intra- und extrazelluläre Rezeptoren erkannt werden. Diese Rezeptoren, auch *pattern recognition receptors (PRRs)* genannt, sind in der Lage, fremde Strukturen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* zu detektieren. Dazu zählen vor allem Zwischenprodukte des viralen Replikationszyklus wie Doppelstrang-RNA (dsRNA) und Einzelstrang-RNA (ssRNA) sowie ungecappte 5'-Triphosphat-RNA.

Die Induktion des Typ-I-Interferons (IFN- $\alpha/\beta$ ) wird durch zwei Signalwege gesteuert. Diese führen zu einer Aktivierung der für die Gen-Expression erforderlichen Transkriptionsfaktoren IRF3 (*interferon regulatory factor*), NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) und AP-1 (*activator protein 1*) und im Falle von IRF3 und NF $\kappa$ B zu deren Translokation in den Zellkern. Dort binden sie an die PRDs (*positive regulatory domains*) des IFN-Promotors und initiieren gemeinschaftlich die Expression der IFN-Gene und dadurch die angeborene antivirale Immunantwort. Der intrazelluläre Signalweg

#### 1.1.2.1 Der intrazelluläre Signalweg

Die meisten Zelltypen besitzen diesen Signalweg, der bei den intrazellulären Sensoren RIG-I (Yoneyama et al. 2004) und MDA5 (Andrejeva et al. 2004) beginnt. RIG-I und MDA5 sind Helikasen, die virale Komponenten wie dsRNA und 5'-Triphosphat-RNA im Zytoplasma von zell-eigenen Nukleinsäuren unterscheiden können.

RIG-I und MDA5 werden ubiquitär exprimiert und besitzen eine N-terminale Caspase-rekrutierende Domäne (*CARD-like regions*) sowie eine C-terminale DExD/H box Helikase-Domäne (Andrejeva et al. 2004; Yoneyama et al. 2004), an die die virale RNA binden kann.

Die Bindung der RNA führt zu einer Konformationsänderung der CARD-Domäne, was dazu führt, dass sie zur Weiterleitung des Signals mit der *CARD-like* Domäne des Proteins IPS1 (*interferon- $\beta$ -promotor-stimulator1*), auch MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) genannt, interagieren können (Kawai et al. 2005; Seth et al. 2005).

IPS1/MAVS befindet sich auf der äußeren Membran der Mitochondrien, die somit eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunantwort spielen (Seth et al. 2005). Außerdem ist IPS1/MAVS in der Lage, mit dem *Fas-associated Death Domain Protein* (FADD) und dem *Receptor-interacting protein 1* (RIP-1) in einer Region außerhalb der CARD-Domäne zu interagieren, was zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führt (Kawai et al. 2005).

IPS1/MAVS aktiviert TRAF3-vermittelt (Oganesyan et al. 2006) die I $\kappa$ B-Kinasen IKK $\epsilon$  und TANK-binding Kinase 1 (TBK1). IKK $\epsilon$  und TBK1 phosphorylieren den Transkriptionsfaktor IRF3. Dies bewirkt eine Homodimerisierung und anschließende Translokation des TFs IRF3 in den Zellkern. Dort rekrutiert IRF3 den Transkriptionscoaktivator p300/CBP (*CREB-binding protein*), was zur Initiation der IFN- $\beta$ -mRNA Synthese führt (Hiscott et al. 1999; Suhara et al. 2002).

Das so synthetisierte „*First-wave*“-Interferon triggert u. a. die Expression des TFs IRF7, der in den meisten Zellen unter normalen Bedingungen nur in sehr geringer Konzentration vorhanden ist (Sato et al. 2000). IRF7 ist der Hauptaktivator der IFN-Expression (Honda et al. 2005). IRF7 wird auf gleichem Wege wie IRF3 aktiviert (Iwamura et al. 2001; Smith et al. 2001; tenOever et al. 2004) und ist verantwortlich für die Synthese der verschiedenen IFN- $\alpha$ -Subtypen als „*Second-wave*“-Interferon und die daraus resultierende, sich selbst verstärkende IFN- $\alpha$ -Synthese (Marie et al. 1998; Sato et al. 1998).

### **1.1.2.2 Der Toll-like-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionsweg**

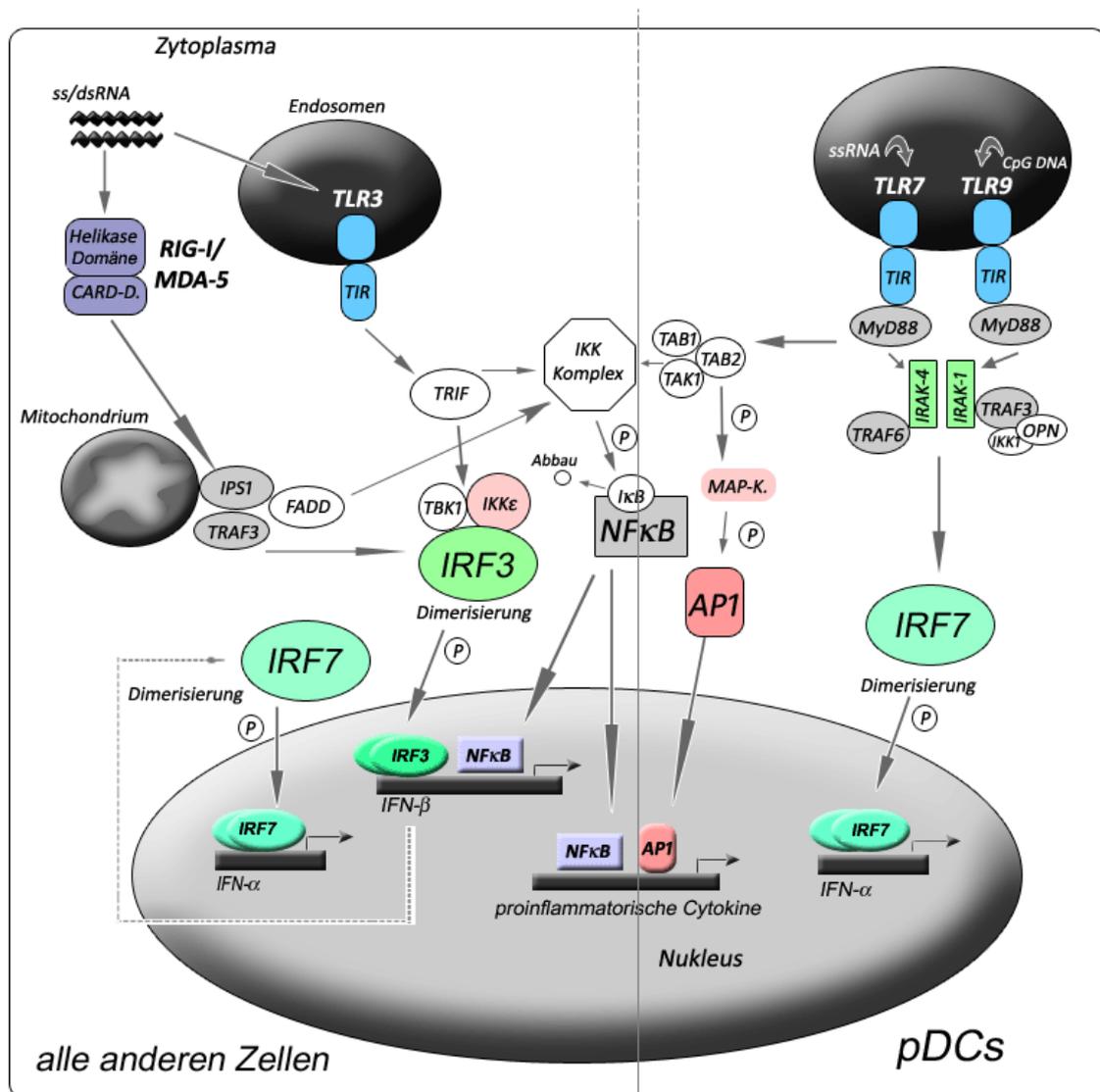
Der zweite Signalweg führt über Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die Membran-gebunden an der Zelloberfläche (TLRs 1, 2, 4, 5, 6) und in den Endosomen (TLRs 3, 7, 8, 9) vorkommen.

Für die Induktion der Typ-I-Interferone sind im Wesentlichen die TLRs 3, 7, 8 und 9 von Bedeutung. Sie detektieren virale Nukleinsäuren, wobei TLR3 dsRNA (Alexopoulou et al. 2001; Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004), TLR7 und 8 ssRNA (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004) und TLR9 unmethylierte CpG-haltige DNA (Iwasaki und Medzhitov 2004) erkennt.

Alle TLRs besitzen eine homologe intrazelluläre *Toll/IL-1-receptor*-(TIR)-Domäne, die durch eine Konformitätsänderung Adaptermoleküle rekrutiert, die das Signal weiterleiten. Dabei unterscheidet man einen MyD88- (*Myeloid differentiation primary response gene*)-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg.

TLR3 benutzt MyD88-unabhängig das Adapterprotein TRIF (Deng et al. 2000). Dies führt zur Aktivierung zweier Kinasen (Akira et al. 2006), die den TF IRF3 phosphorylieren. IRF3 bildet Dimere und transloziert in den Zellkern, was dann zu einer Induktion des IFN- $\beta$  führt.

Die Stimulation des TLR7 (ssRNA) und des TLR9 (CpG-DNA) führt in pDCs zur Aktivierung des nur in diesen Zellen konstitutiv exprimierten TFs IRF7. Nach Dimerisierung und Translokation in den Zellkern induziert IRF7 alle IFN- $\alpha$  Subtypen (Iwasaki und Medzhitov 2004), sodass in pDCs eine vorgeschaltete IFN- $\beta$ -Expression für die Etablierung eines antiviralen Zustandes nicht benötigt wird.



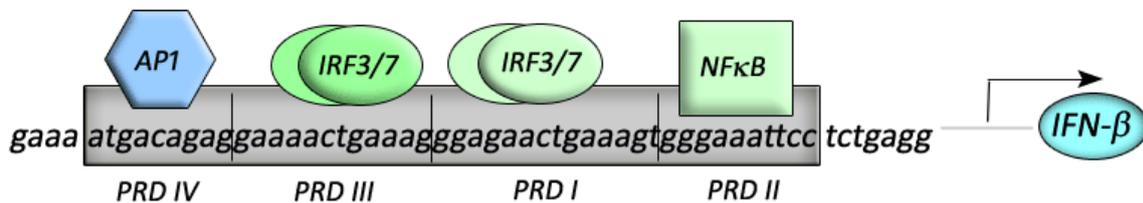
**Abbildung 1: Die Induktion des Typ-I-Interferons; verändert nach Goodbourn et al. (2000)**

Zum einen detektieren intrazelluläre Sensoren, die Helikasen RIG-I und MDA5, zum anderen die membrangebundenen TLRs Nebenprodukte viraler Replikation in infizierten Zellen. Das führt zu einer Aktivierung der TFs AP1, NF $\kappa$ B sowie IRF3 bzw. IRF7, die eine Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors initiieren und damit die Syntese von IFN- $\alpha/\beta$  induzieren.

### 1.1.2.3 Die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors

Die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors wird initiiert durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die vier PRDs (*positive regulatory domains*) des Promotors. NF $\kappa$ B bindet an die PRD II, AP-1 an die PRD IV, und die Mitglieder der IRF-Familie binden an die PRD I und III. Die Anlagerung des Cofaktors HMG I führt zur Bildung eines multifaktoriellen Komplexes, dem Enhanceasom. Domänen des Enhanceasoms treten in Kontakt mit basalen Transkriptionsfaktoren, was eine Anlagerung der RNA-Polymerase möglich macht und die Transkription des IFN- $\beta$  induziert (Jefferies und Fitzgerald 2005).

Mit Ausnahme des IRF3 ist keiner der TFs durch die alleinige Bindung an den IFN- $\beta$ -Promotor in der Lage, diesen zu aktivieren (Lin et al. 2000).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des IFN- $\beta$ -Promotors**

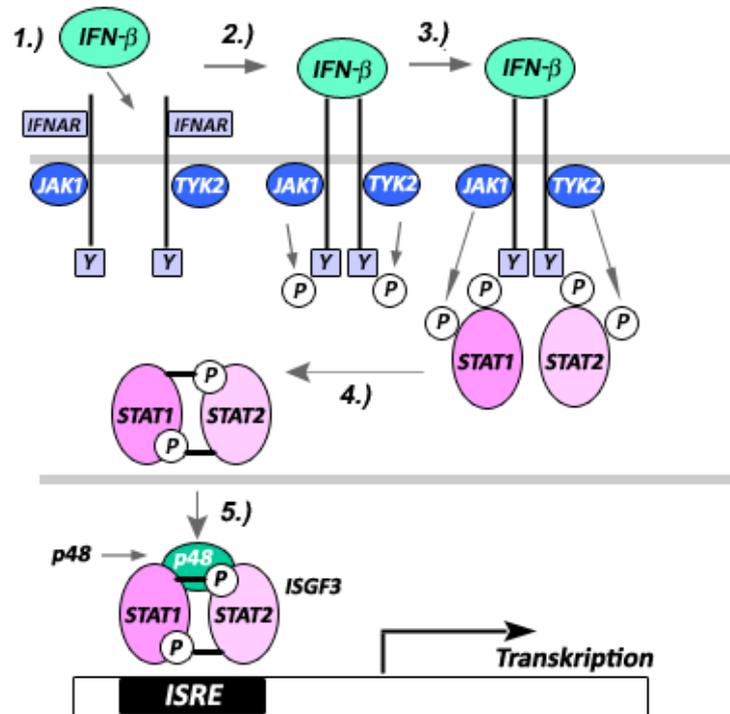
Durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF $\kappa$ B, IRF3 und IRF7 an die PRDs des Promotors wird die IFN- $\beta$ -Synthese induziert.

### 1.1.3 Wirkungsweise der Typ-I-Interferone

Die autokrine und parakrine Bindung des Interferons an den für Typ-I-Interferone spezifischen IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR) löst eine Signalkaskade, den JAK (*Januskinasen*)/STAT (*signal transducer and activator of transkription*)-Signalweg, in der Zelle aus.

Die Bindung führt zunächst zu einer Konformationsänderung und zur anschließenden Dimerisierung des Rezeptors, was zur Aktivierung der rezeptorassoziierten Januskinasen JAK1 und TYK2 führt. Die STAT-Proteine STAT1 und STAT2, latent vorhandene zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die im Zytoplasma in kleinen Mengen vorliegen, können nun an die aktivierte Domäne des Rezeptors binden und durch die rezeptorassoziierten Kinasen phosphoryliert werden. Im Falle der Aktivierung des Signalwegs über das Typ-I-Interferon führt dies zu einer Heterodimerisierung von STAT1 und STAT2 (Darnell 1997; Uddin und Platanias 2004).

Das STAT1/STAT2-Heterodimer assoziiert nach Translokation in den Zellkern mit dem DNA-bindenden Protein p48 (IRF-9) zu dem heterotrimeren Komplex ISGF3. Dieser Komplex bindet nun an *IFN-stimulated regulatory elements* (ISRE) genannte Elemente, die einen Bestandteil der Promotoren der sogenannten Interferon-stimulierten Gene (ISG) darstellen. Hierdurch wird die Expression dieser Gene stimuliert, was letzten Endes zur Etablierung eines antiviralen Zustands in der Zelle führt (Stark et al. 1998).



**Abbildung 3: Aktivierung des Typ-I-Interferon-Rezeptors nach Bindung von IFN-β; verändert nach Goodbourn et al. (2000)**

1.) Anlagerung des IFN-β an den Typ-I-Rezeptor IFNAR; 2.) Dimerisierung des Rezeptors, Phosphorylierung von Tyrosinen mithilfe der Tyrosinkinasen JAK1 und TYK2; 3.) Anlagerung der Proteine STAT1 und STAT2, Phosphorylierung durch JAK1 und TYK2; 4.) Heterodimerisierung der STAT-Proteine; 5.) Assoziation mit dem DNA-bindenden Protein p48 und Anlagerung an den Promotor zur Einleitung der Transkription.

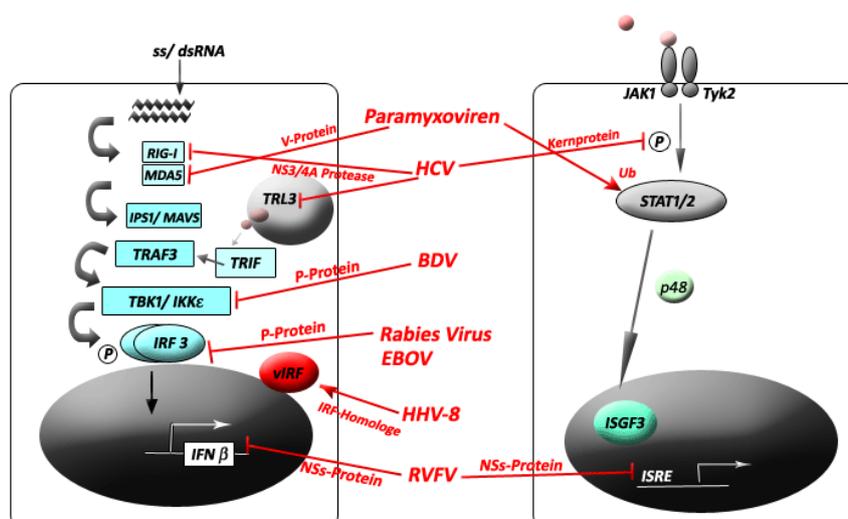
Typ-I-Interferone bewirken die Transkription von über 300 ISGs, deren exakte Funktion zum großen Teil noch unbekannt ist. Zu den Interferon-induzierten antiviralen Proteinen zählen unter anderem die 2',5'-Oligoadenylsynthetase (Silverman 1994), die Proteinkinase R (PKR) (Williams 1999) und die Mx-Proteine (Isaacs und Lindenmann 1957; Haller und Kochs 2002).

### 1.1.4 Virale Interferon-Antagonisten

Um eine Infektion zu manifestieren, eine Übertragung auf den nächsten Wirt zu garantieren oder um langfristig im Wirt zu persistieren, haben Viren vielfältige Strategien entwickelt, der antiviralen Antwort des Immunsystems zu entgehen (Versteeg und Garcia-Sastre 2010).

In vielen Fällen sind es virale Nichtstrukturproteine, die eine Funktion als Interferon-Antagonisten besitzen und nicht essenziell für die Virusreplikation sind. Paramyxoviren beispielsweise besitzen ein V-Protein, das an die dsRNA-detektierende Helikase MDA5 bindet und damit die Aktivierung der IFN-Synthese verhindert (Andrejeva et al. 2004). Außerdem löst es die Ubiquitinierung und den nachfolgenden Abbau des STAT1-Proteins aus (Didcock et al. 1999; Palosaari et al. 2003; Precious et al. 2005; Ulane et al. 2005). Das Kernprotein des

HCV induziert SOCS3, was zu einer Hemmung der Phosphorylierung der STAT-Proteine durch die Januskinasen führt (Yokota et al. 2004). Die NS3/4A-Protease des HCV hingegen blockiert die RIG-I-vermittelte Signalübertragung und ist gleichfalls in der Lage, die Signalübertragung durch TLR3 zu unterbrechen, indem sie das Adapterprotein TRIF spaltet (Breiman et al. 2005; Foy et al. 2005; Li et al. 2005). Das Vaccinia-Virus besitzt ein IFN-bindendes Protein, welches mit dem zellulären IFN-Rezeptor um die Bindung des IFN konkurriert (Symons et al. 1995; Alcami et al. 2000). Es unterbricht den Kreislauf des positiven Feedbacks der autokrinen IFN-Sekretion und verhindert damit den Aufbau eines antiviralen Status. Bei vielen Negativstrang-RNA-Viren ist das Phosphoprotein P, eine essenzielle Komponente des viralen Polymerase-Komplexes, ein Virulenzfaktor. Das P-Protein des Rabies-Virus beispielsweise hemmt die TBK1-vermittelte IRF3-Phosphorylierung (Brzozka et al. 2005). Das Ebola-Virus (EBOV)-P-Protein behindert ebenfalls die IRF3-Aktivierung (Basler et al. 2003). Das P-Protein des Borna-Virus (BDV) bindet direkt an TBK1 und vermindert so deren Aktivität (Unterstab et al. 2005). Das Humane-Herpes-Virus 8 (HHV8), welches die Ursache für das HIV-assoziierte Kaposi-Syndrom ist, codiert für virale IRF-Homologe, die dominant negative Wirkung besitzen (Li et al. 1998; Zimring et al. 1998; Burysek et al. 1999; Burysek et al. 1999; Lubyova und Pitha 2000; Lubyova et al. 2004). Das Phlebovirus Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV) aus der Familie der Bunyaviren besitzt ein NSs-Protein (non-structural protein des S-Segments: NSs), das einen Virulenzfaktor darstellt (Bouloy et al. 2001). Das RVFV-NSs blockiert die IFN-Synthese, indem es zum einen das basale zelluläre Transkriptions-System hemmt (Billecocq et al. 2004; Le May et al. 2004) und zum anderen direkt die Induktion der IFN- $\beta$  Synthese blockiert (LeMay et al., 2008). Angriffsziel ist dabei das p44-Protein, eine Komponente des zellulären Transkriptionsfaktors IIH (TFIIH), der einen essenziellen Cofaktor der zellulären RNA-Polymerase II (RNAP II) darstellt (Le May et al. 2004), bzw. SAP30, ein zelluläres Protein, das eine Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors verhindern kann (Le May et al. 2008).



**Abbildung 4: Die IFN-antagonistischen Aktivitäten verschiedener Virusspezies; verändert nach Modrow et al. (2003)**

## 1.2 Die Familie der Bunyaviren

Die Familie der *Bunyaviridae* umfasst mehr als 350 Virusspezies, die unterschiedliche Organismen infizieren können. Der Name Bunyavirus leitet sich von dem Dorf Bunyamwera in Uganda ab, in dem erstmals das Bunyamwera-Virus isoliert worden ist (Smithburn et al. 1946). Die meisten Bunyaviren werden durch Arthropoden übertragen (Elliott 1997).

Die Bunyaviren werden in fünf Genera eingeteilt, abhängig von Wirtsspezifität und molekularen Eigenschaften (Elliott 1997). Zudem werden sie aufgrund unterschiedlicher serologischer Eigenschaften innerhalb der Genera zu einzelnen Serogruppen zusammengefasst, die im Wesentlichen auf den antigenen Eigenschaften der Glykoproteine basieren (Kinney und Calisher 1981).

Tabelle 1: Charakteristische Vertreter der Bunyaviren

<b>Genus</b>	<b>Serogruppe</b>	<b>Mensch</b>	<b>Tier</b>	<b>Pflanze</b>
Orthobunyavirus	<i>Californiaviren</i>  <i>Simbuviren</i> <i>Bunyamweraviren</i>	California-Enzephalitis-Virus  La-Crosse-Virus  Oropouche-Virus	   Akabane-Virus  Bunyamwera-Virus	
Phlebovirus	<i>Phlebotomus-fiebeviren</i>   <i>Uukuniemiviren</i>	Sandfliegen-Fieber-Virus  Rift-Valley-Fieber-Virus	   Rift-Valley-Fieber-Virus  Uukuniemi-Virus der Vögel	
Nairovirus	<i>CCHF*-Viren</i>  <i>Nairobi-Sheep-Disease-Viren</i>	CCHF*-Virus	CCHF*-Virus  Nairobi-Sheep-Disease-Virus	
Hantavirus	<i>Hantaanviren</i>	Hantaan-Virus  Seoul-Virus  Dobrava-Virus  Puumala-Virus  Four-Corners-Virus  Sin-Nombre-Virus		
Tospovirus				Tomato-Spotted-Wilt-Virus

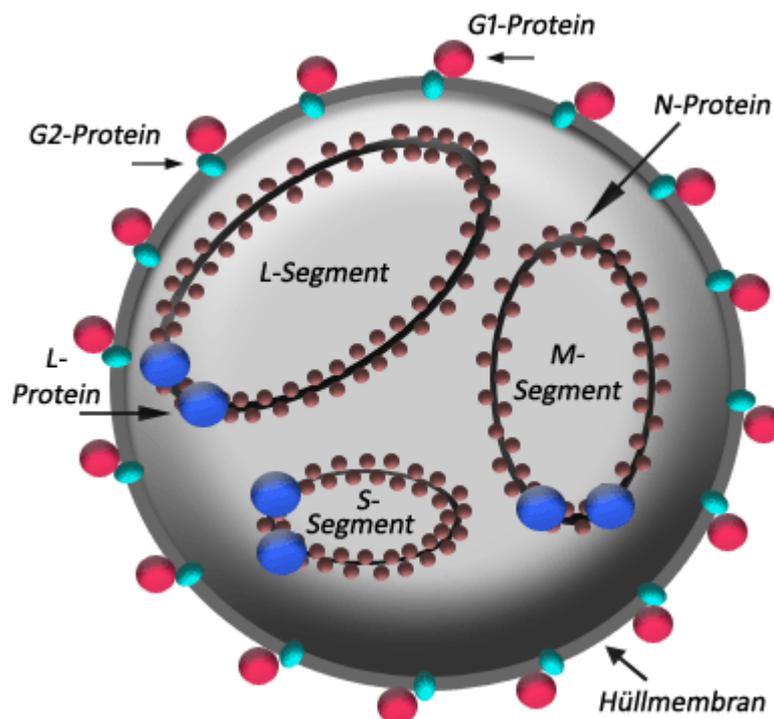
\*CCHF: Crimean-Congo-hemorrhagic fever (Krim-Kongo-Fieber)

Eine Infektion mit Bunyaviren verläuft oft asymptomatisch oder geht mit leichtem Fieber einher. Schwere Krankheitsverläufe hingegen verursachen meist Enzephalitis, Fieber, hämor-

rhagische und schwere respiratorische Erkrankungen (Bowen et al. 1995; 2000). Das durch Mücken übertragende La-Crosse-Virus (LACV) beispielsweise, das vorwiegend im mittleren Westen der USA vorkommt, verursacht vor allem bei Kindern und Jugendlichen Enzephalitis mit epileptischen Anfällen in 50 Prozent der Fälle (Calisher 1994). Eine Infektion mit dem Nairovirus *Crimean-Congo-hemorrhagic fever* (CCHF) verursacht in Afrika, Asien und Osteuropa hämorrhagisches Fieber mit einer Letalität von 20 Prozent (Ergonul 2006). Das human-pathogene Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV) der Gattung Phleboviren wird durch Mücken übertragen und befällt in erster Linie Rinder und Schafe in Afrika, es kann aber auch Menschen infizieren. RVFV geht mit hohem Fieber und Hepatitis einher, in 1 Prozent der Fälle entsteht ein hämorrhagisches Fieber (Pepin et al. 2010).

### 1.2.1 Aufbau der Bunyaviren

Die behüllten Viruspartikel sind pleomorph, zumeist haben sie jedoch eine sphärische Form und einen Durchmesser von 100 bis 120 nm. Zwei Glykoproteine, G1 (55–125 kD) und G2 (30–70 kD) sind in die Hüllmembran eingelagert und ragen 10 nm aus der Virusoberfläche hervor. Die G-Proteine entstehen durch proteolytische Spaltung aus einem Vorläufermolekül. Bunyaviren besitzen drei Genomsegmente, die aus einzelsträngiger RNA negativer Polarität bestehen, die mit Nukleoproteinen und der viralen Polymerase assoziiert sind (Modrow et al. 2003).



**Abbildung 5: Der Aufbau eines Bunyaviruspartikels**

An den 3'- und 5'-Enden der Genomsegmente befinden sich komplementäre Abschnitte von etwa acht bis elf Nukleotiden, die Doppelstrangregionen ausbilden können. Dadurch liegen die RNA-Segmente in einer quasizirkulären, Pfannenstiel-ähnlichen Form vor (Hewlett et al. 1977). Diese konservierten Genenden enthalten Regionen für die Initiation der Transkription und Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (Elliott 1997).

Das L-Segment codiert für das L-Protein, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die die Transkription der viralen mRNA und der Genomreplikation katalysiert. Das M-Segment codiert für das G-Vorläuferprotein, aus dem durch proteolytische Spaltung das G1-, das G2-Hüllprotein und Virustyp-abhängig ein NSm-Protein (*non-structural protein* des M-Segments-) entstehen. Das S-Segment codiert für das Nukleoprotein (N-Protein), das zusammen mit der genomischen RNA Ribonukleoproteinkomplexe bildet, die der Polymerase als Matrize dienen (Kolakofsky und Hacker 1991). Zusätzlich zum Nukleoprotein-Gen findet sich auf dem S-Segment bei den Gattungen Orthobunyavirus, Phlebovirus und Tospovirus ein Gen für ein Nichtstrukturprotein.

### 1.2.2 Nichtstrukturproteine der Bunyaviren

Der Leserahmen des NSs der Orthobunyaviren liegt in einem um ein Nukleotid verschobenen Leserahmen innerhalb der Gensequenz des N-Proteins und wird unter Verwendung eines anderen Startcodons initiiert (Elliott 1997). Deswegen sind beide Proteine nicht homolog. Bei der Transkription des N-Gens entsteht eine mRNA, die Informationen über das N- und das NSs-Protein besitzt. Aufgrund der unterschiedlichen Leseraster werden bei der Proteinbiosynthese das N- und das NSs-Protein gebildet.

Für die NSs-Proteine des RVFV, des Bunyamwera-Virus und einiger weiterer Bunyaviren ist eine IFN-antagonistische Wirkung nachgewiesen, die es den Viren ermöglicht, der IFN- $\beta$ - und IFN- $\alpha$ -vermittelten angeborenen Immunantwort zu entgehen.

Durch die Herstellung eines rekombinanten Bunyamwera-Virus mit inaktiviertem NSs (BUNdelNSs) in einem Reverse-Genetik-System konnte gezeigt werden, dass in BUNdelNSs-infizierten Zellen, nicht aber in Wildtyp-BUNV-(wtBUNV-)infizierten Zellen Interferon gebildet wurde (Weber et al. 2002). Durch dieses Verfahren wurde für BUNV-NSs der Nachweis für die Hemmung der IFN-Induktion erbracht. Es zeigte sich in BUNdelNSs-infizierten Mäusen ein 1000-fach niedrigerer Titer als in wtBUNV-infizierten. Das bedeutet, dass das BUNV-NSs einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt und sich große Unterschiede bezüglich der Pathogenität zwischen Wildtyp-Viren und NSs-defizienten Viren zeigen (Weber et al. 2002).

Aufgrund der Unterschiede der Nichtstrukturproteine in Größe, AS-Sequenz und Codierungsstrategie ist davon auszugehen, dass sich die Nichtstrukturproteine unabhängig voneinander entwickelt haben und dass ihre ähnliche Wirkung auf den gleichen Selektionsdruck, nämlich das IFN-System der Säugetiere, zurückzuführen ist (Weber et al. 2002).

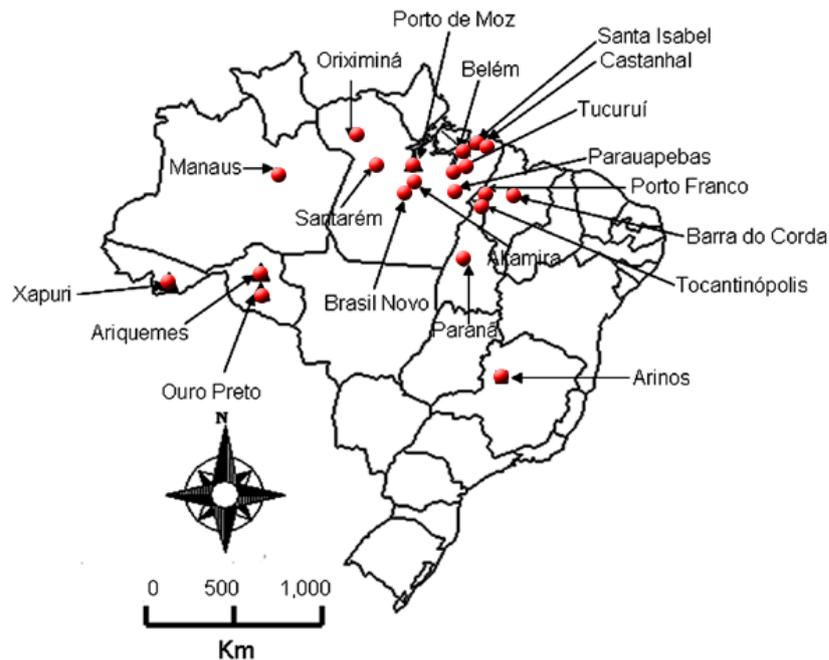
### 1.2.3 Replikationszyklus der Bunyaviren

Der Replikationszyklus der Bunyaviren ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das Virus wird G-Protein-vermittelt an einen zellulären Rezeptor absorbiert und dann nach Bindung an der Oberfläche durch die Endosomen in das Zytoplasma aufgenommen. Hier erfolgt die Transkription der Segmente mithilfe der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die mit den Nukleocapsiden assoziiert ist. Die Segmente genomischer RNA besitzen nicht translatierte Regionen (NTRs) am 3'- und 5'-Ende, die als Promotoren der viralen Polymerase für die Replikation der Segmente und der Transkription der ORF (*open-reading-frames*) dienen.

Die viralen Transkripte besitzen wie zelluläre mRNAs am 5'-Ende eine Cap-Gruppe und einige nicht viruscodierte Nukleotide, was darauf zurückzuführen ist, dass Bunyaviren ähnlich wie Orthomyxoviren einen Mechanismus des Cap-Stehlens entwickelt haben (Elliott 1997). Im Gegensatz zu Orthomyxoviren findet das Cap-Stehlen sowie die gesamte virale Transkription und Replikation aber vollständig im Zytoplasma statt. Mithilfe des L-Proteins spaltet das Virus das 5'-Ende einer zellulären mRNA ab und verknüpft die gecappten Oligonukleotide mit den viralen Transkripten. Die 3'-Enden sind nicht polyadenyliert. Es wird vermutet, dass ein frühzeitiges Anlagern von Ribosomen erfolgt, um die Ausbildung von dsRNA bei der Transkription zu verhindern. Die Translation der mRNA in Protein beginnt also noch während der Transkription. Das G-Protein wird im endoplasmatischen Retikulum prozessiert, sodass die reifen G1- und G2-Proteine sowie ggf. das NSm-Protein entstehen. Durch die Interaktion neu synthetisierter N-Proteine mit viraler RNA wird die Aktivität der viralen Polymerase dahingehend modifiziert, dass ein Wechsel von Transkription zu Replikation der viralen Genomsegmente erfolgt. Dadurch kann die Synthese eines ungecappten RNA-Gegenstranges erfolgen. Diese Antigenome komplexieren wiederum mit N-Proteinen und dienen als Matrize für die Bildung neuer Genomsegmente. Die neugebildeten Genomsegmente werden in Form von RNPs, an die das L-Protein assoziiert ist, an der Zellmembran in aussprossende Viruspartikel verpackt und von der infizierten Zelle freigesetzt. Die fortgesetzte Virusreplikation ist für die Zelle toxisch und führt schließlich zur Zell-Lyse (Schmaljohn und Nichol 2007).

### 1.2.4 Das Oropouche-Virus

Das Oropouche-Virus (OROV) gehört dem Genus Orthobunyaviren (Serogruppe: Simbuviren) der Familie der Bunyaviren an. OROV wird hauptsächlich durch die Stechmücke *Culicoides paraensis* übertragen und löst ein Dengue-ähnliches, akutes Fieber aus (Pinheiro et al. 1981). Die Fiebererkrankungen, die durch das OROV verursacht wurden, erwiesen sich in den letzten 40 Jahren als ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem für die Bevölkerung der tropischen und subtropischen Gegenden Zentral- und Südamerikas (Watts et al. 1997; Livonesi et al. 2006).



**Abbildung 6: OROV-Ausbrüche zwischen 2003 und 2004 in Brasilien nach Azevedo et al. (2007)**

Die klinischen Symptome der Infektion mit OROV umfassen abrupt einsetzendes hohes Fieber, Schüttelfrost, schweren Kopfschmerz, Schwindel, Muskelschmerzen, Gelenkschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Der Rückgang der Symptome beginnt bei der Hälfte der Patienten zwei bis 10 Tage nach Ausbruch des Fiebers. Allerdings wurden auch aseptische Meningitiden im Verlauf einer Infektion mit OROV beschrieben. Alle Altersstufen und Geschlechter sind von der Infektion gleichermaßen betroffen (Pinheiro et al. 1981). Zurzeit gibt es weder eine OROV-spezifische antivirale Therapie noch eine Impfung. Neuere Studien haben gezeigt, dass eine Resistenz gegenüber der antiviralen Wirkung des Nukleosid-Analogons Ribavirin besteht (Livonesi et al. 2006).

In einer Studie (Livonesi et al. 2007), die die Wirkung von IFN- $\beta$  auf die Replikation von Orthobunyaviren untersucht hat, zeigte sich, dass nach der Behandlung infizierter VeroE6-Zellen mit IFN- $\alpha$  2a die Virus-Replikation im Falle des Caraparu-Virus (CARV), des Guama-Virus (GMAV), des Guaroa-Virus (GROV) und des Tacaiuma-Virus (TCMV) signifikant inhibiert wurde. Bei OROV hingegen zeigte sich keine Hemmung der Replikation. Ebenso hatte eine therapeutische Gabe von IFN- $\alpha$  2a nach OROV-Infektion von Mäusen keinen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit der OROV-infizierten Tiere. Dagegen führte eine prophylaktische Gabe des Interferons dazu, dass alle Tiere die OROV-Infektion überlebten, während alle Tiere der Placebogruppe verstarben. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Vermutung ableiten, dass sich die OROV-Replikation durch IFN-induzierte antiviral aktive Proteine hemmen lässt, OROV jedoch in der Lage ist, mit dem IFN-System zu interferieren. Eine Interferonsystem-antagonistische Wirkung wurde bereits für verschiedene Vertreter der *Bunyaviridae* beschrieben, so z.B. für CARV (Brinton et al. 1993), RVFV (Bouloy et al. 2001) und BUNV (Weber et al. 2002; Leonard et al. 2006). Für RVFV und BUNV wurde gezeigt, dass das S-Segment-codierte Nichtstrukturprotein (NSs) in der Lage ist, die Produktion von IFN $\alpha/\beta$  zu unterdrü-

cken, indem es die Transkription der IFN-Gene hemmt (Le May et al. 2004; Leonard et al. 2006; Le May et al. 2008). Für OROV wurde bisher nicht untersucht, ob OROV-NSs oder ein anderes virales Genprodukt eine IFN-antagonistische Funktion hat

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die drei viralen Genomsegmente des OROV zu klonieren, sodass sie als cDNA zur Verfügung stehen. Diese kann dann als Ausgangspunkt verschiedener Untersuchungen dienen: Zum einen soll im Rahmen dieser Arbeit ein Minireplikon-System zum Studium der viralen Transkription und Replikation etabliert werden. Zum anderen soll mithilfe der cDNA für NSs eine mögliche IFN-antagonistische Funktion dieses Proteins untersucht werden. Hierbei soll ermittelt werden, inwieweit OROV-NSs im virusfreien Kontext nach transienter Expression in der Lage ist, die Aktivierung des humanen IFN- $\beta$ -Promotors durch natürliche und synthetische PAMPs zu unterdrücken.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Verwendete Plasmide

- a. **pUC 19:** Der pUC 19 ist ein prokaryontischer Klonierungsvektor und hat eine Größe von 2686 bp. Der pUC 19 enthält eine MCS, die die Sequenzen für 13 singuläre Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme enthält, sowie eine Region, die für eine Ampicillinresistenz kodiert, die der selektiven Vermehrung von transformierten *E. coli* dient.

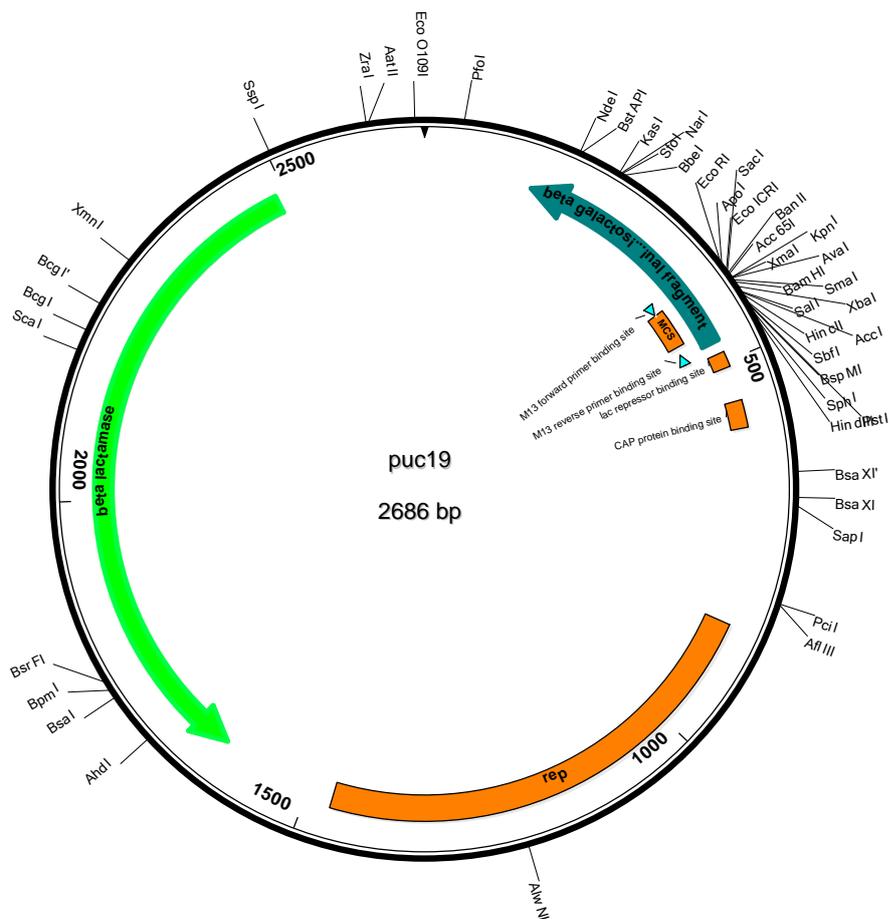
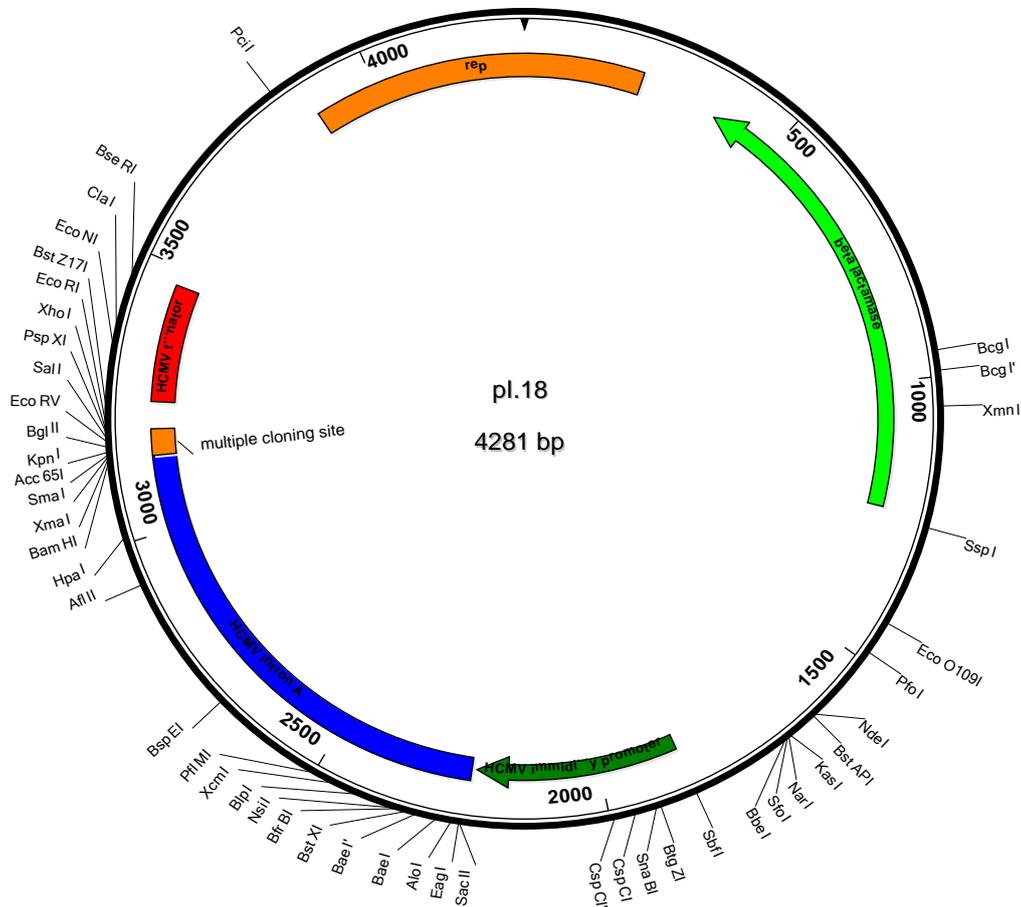


Abbildung 7: Schematische Darstellung des prokaryontischen Klonierungsvektors pUC 19

- b. **pUC 19-mut:** Bei dem pUC19-mut wurde mithilfe eines Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Pfo und EcoO109 eine BsmBI-(Esp 3I)-Schnittstelle entfernt, damit der Vektor beim Verdau mit diesem Enzym nicht an unerwünschter Stelle geschnitten wird.
- c. **pl.18:** Das Plasmid pl. 18 ist ein eukaryontischer Expressionsvektor mit einer Größe von 4281 bp. Er beinhaltet den konstitutiv aktiven hCMV-Promotor, das hCMV-Intron A, ge-

folgt von einer MCS, die die Sequenzen für 17 singuläre Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme zur Insertion von cDNA enthält, sowie ein hCMV-polyA-Signal.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des eukaryontischen Expressionsvektors pl.18**

- d. **p125-Luc:** Der Vektor beinhaltet die Firefly-Luciferase-Reporter-cDNA unter der Kontrolle eines IFN- $\beta$ -Promotors (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Takashi Fujita, (Institute of Virus Research, Kyoto University Japan). Der Vektor kodiert außerdem für eine Ampicillinresistenz zur selektiven Vermehrung von transformierten E. coli.
- e. **p55A2-Luc:** Der Vektor beinhaltet die Firefly-Luciferase-Reporter-cDNA unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors, der drei Kopien der PRD II des IFN- $\beta$ -Promotors enthält (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Takashi Fujita, Institute of Virus Research, Kyoto University Japan). Der Vektor kodiert außerdem für eine Ampicillinresistenz zur selektiven Vermehrung von transformierten E. coli.
- f. **p55C1B-Luc:** Der Vektor beinhaltet die Firefly-Luciferase-Reporter-cDNA unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors, der drei Kopien der PRD III des IFN- $\beta$ -Promotors enthält (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Takashi Fujita, Institute of Virus Research, Kyoto University Japan).

search, Kyoto University Japan [Yoneyama et al., 1998]). Der Vektor kodiert außerdem für eine Ampicillinresistenz zur selektiven Vermehrung von transformierten E. coli.

- g. **pAP1-Luc**: Der Vektor beinhaltet die Firefly-Luciferase-Reporter-cDNA unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors der mehrere Kopien des AP-1-Enhancer-Elements enthält, das der PRDIV des IFN- $\beta$ -Promotors entspricht (Stratagene, La Jolla, USA). Der Vektor kodiert außerdem für eine Ampicillinresistenz zur selektiven Vermehrung von transformierten E. coli.
- h. **pRLSV40**: Der Vektor beinhaltet die Renilla-Luciferase-cDNA unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40early-Promotors (Promega, Mannheim, Deutschland). Der Vektor kodiert außerdem für eine Ampicillinresistenz zur selektiven Vermehrung von transformierten E. coli.
- i. **pT7riboSM2**: Dieser Vektor beinhaltet einen T7-Promotor zur T7-Polymerase-getriebenen Transkription von cDNA, die über zwei *Esp31*-Schnittstellen in den Vektor eingefügt wird. Des Weiteren besitzt der Vektor einen T7-Terminator zur Terminierung des Transkripts. Eine vorgeschaltete Hepatitis- $\Delta$ -Ribozym-Sequenz dient der autokatalytischen Prozessierung des Transkripts, sodass das Transkript exakt die Länge der in den Vektor eingefügten cDNA besitzt.



**Abbildung 9: Transkriptionskassette des Vektors pT7riboSM2. T7pro: T7-Promotor; T7 term: T7-Terminator;  $\delta$ : Hepatitis- $\Delta$ -Ribozym**

j. **pcDNA3.1/V5-His-TOPO**: s. Kapitel 2.2.7.1.

k. **pCRII**: s. Kapitel 2.2.7.1.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

*Methodenprinzip:*

„Kompetenz“ ist die Fähigkeit von Bakterienzellen, exogene DNA aufzunehmen und damit Voraussetzung für die Transformierbarkeit von Bakterien. Das Darmbakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) besitzt keine natürliche Kompetenz und muss daher „künstlich kompetent“ gemacht werden. *E. coli*-Bakterien können z.B. mittels Behandlung mit Rubidiumchlorid, Manganchlorid oder Calciumchlorid durch im Detail noch nicht bekannte Mechanismen bei niedriger Temperatur in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. So

behandelte Zellen können zur Transformation von DNA verwendet werden. Werden sie nicht sofort benötigt, können sie bei -80 °C gelagert werden.

*Material:*

Z-Competent *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set (Zymo Research, Irvine, USA).

*Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

## 2.2.2 Transformation von Bakterienzellen

*Methodenprinzip:*

Bei der Transformation von Bakterien handelt es sich um ein Verfahren, bei dem kompetente Bakterien Plasmid-DNA aufnehmen. Die Bakterienzellen müssen vor der Transformation vorbereitet, also kompetent gemacht werden (künstliche Kompetenz). Dieses geschieht mithilfe einer Kombination verschiedener Reize, wie Hitze, Kälte und Salz.

*Materialien:*

Verwendete Bakterienstämme:

**TOP 10** (Invitrogen, Leek, Niederlande)

**Genotyp:** (F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*)

**XL 1 blue** (Stratagene)

**Genotyp:** (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ* $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)])

**INV $\alpha$ F'** (Invitrogen)

**Genotyp:** (F' *endA1 recA1 hsdR17* (rk-, mk+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169  $\lambda$ -)

SOC-Medium

Zur Herstellung des SOC-Mediums werden 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 0,5 g NaCl verwendet. Es wird mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Danach werden 10 ml steril-filtriertes 1 M MgCl<sub>2</sub>, 10 ml steril-filtriertes MgSO<sub>4</sub> und 10 ml steril-filtrierte 2-M-Glucose hinzugefügt.

LB-Medium/LB-Amp-Medium

Zur Herstellung von 500 ml LB-Medium werden 5 g BactoTrypton, 2,5 g Hefeextrakt und 2,5 g NaCl mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Dem fertigen Ansatz werden zur Herstellung von LB-Amp-Medium unmittelbar vor Gebrauch noch Ampicillin auf eine Endkonzentration von 100  $\mu$ l Ampicillin/ml hinzugefügt.

### LB-Amp-Platten:

Zur Herstellung von 20 LB-Amp-Platten werden 7,5 g Agar und 500 µl Ampicillin und 500 ml LB-Medium benötigt. Der Agar wird im Medium durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Der Ansatz wird nun unter Rühren auf ca. 50 °C abgekühlt. Dann kann das Ampicillin hinzugefügt werden. Je Platte werden jetzt 25 ml LB-Amp-Medium ausgegossen. Die Platten lässt man erkalten.

### *Durchführung:*

Die Bakterien werden zu diesem Zweck zunächst auf Eis aufgetaut und mit etwa 2 µl des Ligationsansatzes bzw. mit der Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubation auf Eis von 30 Minuten wird ein Heat-Schock durchgeführt, indem die Bakterien 30 Sekunden einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt werden. Anschließend werden 250 µl SOC-Medium beigegeben und eine Stunde bei 37 °C und 300 UPM inkubiert. Die Bakterien werden nun auf vorgewärmten LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C angezüchtet.

## 2.2.3 *Blau-Weiß-Screening mit X-Gal*

### *Methodenprinzip:*

X-Gal wird durch das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Letzteres oxidiert unter Einwirkung des Sauerstoffes der Luft zu dem tiefblau erscheinenden Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo.

Viele Vektoren, die zu Klonierungsarbeiten verwendet werden, enthalten die aminoternale codierende Sequenz der  $\beta$ -Galaktosidase mit einer eingefügten Multiple-Cloning-Site (MCS), in die Fremd-DNA eingebracht werden kann. Wird das unveränderte Plasmid in Bakterien eingebracht, die den carboxyterminalen Teil der  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, entsteht durch Transkomplementation enzymatisch aktive  $\beta$ -Galaktosidase. Wird in die MCS Fremd-DNA eingebracht, entsteht ein Fusionsprotein, sodass im Regelfall keine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase mehr durch Transkomplementation entstehen kann. Wenn das geschieht, kann das X-Gal nicht mehr enzymatisch hydrolysiert werden. Die Bakterienkolonien erscheinen weiß. Alle Bakterien, die Plasmide ohne eingefügte Fremd-DNA enthalten, erscheinen blau, da die  $\beta$ -Galaktosidase gebildet wird, die das X-Gal hydrolysiert, sodass der blaue Farbstoff entstehen kann.

### *Materialien:*

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid [X-Gal]) in Dimethylformamid gelöst, Konzentration 20 mg/ml

#### *Durchführung:*

Es werden 40 µl X-Gal auf einer vorgewärmten LB-Amp-Platte ausplattiert. Dieses lässt man einige Minuten in die Platte einziehen. Direkt im Anschluss werden die transformierten Bakterien darauf ausgestrichen. Die Bakterien werden nun über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

## **2.2.4 Plasmid-DNA-Isolierungen**

### **2.2.4.1 Minipräparation**

#### *Methodenprinzip:*

Nach einer alkalischen Lyse der Bakterien, die zur Denaturierung der bakteriellen Proteine und der DNA (Plasmid- und chromosomale DNA) führt, erfolgt ein Renaturierungsschritt, indem die Plasmid-DNA renaturiert wird und in Lösung geht, während die chromosomale DNA im Sediment verbleibt. Die Plasmid-DNA wird anschließend über Bindung unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran (hydrophobe Wechselwirkungen) und anschließendes Waschen weiter gereinigt und abschließend mithilfe von ddH<sub>2</sub>O unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

#### *Materialien:*

- E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen)

#### *Durchführung:*

Die Aufreinigung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers.

### **2.2.4.2 Midipräparation**

#### *Methodenprinzip:*

Zunächst erfolgt eine alkalische Lyse und damit die Denaturierung und Renaturierung analog der unter 2.2.4 beschriebenen Minipräparation. Zu unterscheiden ist hier das angewandte Reinigungsprinzip. Die Bindung der DNA (Polyanion) erfolgt unter Niedrigsalzbedingungen an positiv geladene Gruppen einer Anionentauschersäule durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen DNA und Säule. Die Elution findet unter Hochsalzbedingungen statt. Anschließend wird das Salz entfernt, indem die DNA durch Hinzufügen von Isopropanol gefällt wird. Isopropanol entzieht der DNA das Hydratwasser, sodass diese ausfällt. Es folgt ein Waschschriff mit 70 Prozent EtOH zur Entfernung zurückgebliebener Salze. Isopropanol wird durch Ethanol ersetzt, das flüchtiger und somit leichter aus der Flüssigkeit zu entfernen ist. Das Lösen der DNA erfolgt in ddH<sub>2</sub>O.

#### *Materialien:*

- Nucleo Bond Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel, Düren)

### *Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

## **2.2.5 Restriktionsverdau von DNA**

### *Methodenprinzip:*

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche DNA innerhalb einer Sequenz schneiden, indem sie eine spezifische Basensequenz, meist palindromische Sequenzen von 4 bis 8 bp, erkennen. Sie dienen den Bakterienstämmen zur Abwehr von Fremd-Virus-DNA (Bakteriophagen). Zum Schutz der eigenen DNA sind die betroffenen Sequenzen des Bakteriums methyliert und damit vor dem Verdau durch die Nukleasen geschützt. Man unterscheidet drei Typen von Restriktionsendonukleasen, wobei der Typ II für molekularbiologische Methoden von primärer Bedeutung ist. Er schneidet die DNA innerhalb oder nahe der Erkennungssequenz, benötigt kein ATP und besitzt keine Methyltransferase-Aktivität. Die Schnitte der Restriktionsenzyme können versetzt (engl.: *sticky ends*, deut.: *klebrige Enden*, z.B. *EcoRI*) oder gerade sein (engl.: *blunt ends*, deut.: *stumpfe* oder *glatte Enden*, z.B. *AluI*). Im Falle von *Esp3I* und *SapI* z. B. handelt es sich um sogenannte Subtyp-IIS-Restriktionsendonukleasen, die in einem definierten Abstand von der Erkennungssequenz spalten, d. h., Erkennungssequenz und Schnittstelle sind nicht identisch.

### *Materialien:*

Die Restriktionsenzyme und die dazu passenden Reaktionspuffer werden von den Firmen Roche, Mannheim, Fermentas, St. Leon-Rot, und New England Biolabs, Frankfurt am Main bezogen.

### *Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben der Hersteller.

## **2.2.6 Dephosphorylierung von DNA**

### *Methodenprinzip:*

Zur Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden wird eine hitzelabile Phosphatase verwendet, die sich im Gegensatz zu der häufig verwendeten alkalischen Phosphatase durch Erhitzen auf eine Temperatur von 65 °C inaktivieren lässt. Die Dephosphorylierung ist eine notwendige Methode, um bei Klonierungen eine Religation des linearisierten Vektors als dominante Nebenreaktion zu verhindern.

### *Materialien:*

- gelgereinigtes Plasmid
- Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)

- 10 x Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer
- ddH<sub>2</sub>O

*Durchführung:*

Es werden ca. 200 ng gelgereinigtes Plasmid verwendet sowie 1 µl Antarctic Phosphatase und 1 µl 10x Puffer und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Der Ansatz wird 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei 65 °C für 15 Minuten wird dann das Enzym inaktiviert.

## 2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

*Methodenprinzip:*

Die Ligation ist ein Verfahren in der Molekularbiologie, bei dem das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure mithilfe eines Enzyms (T4-DNA-Ligase bzw. Topoisomerase) verbunden werden. Die Ligation wird bei Klonierungen angewendet. Es werden linearisierte Plasmide benutzt, in die „fremde“ DNA eingebracht wird. Die ebenfalls lineare fremde DNA wird zusammen mit dem Plasmid und einer Ligase inkubiert. Die Ligase katalysiert die oben erwähnte Reaktion zwischen den 3'- und 5'-Enden der DNA, und man erhält als (ein) Produkt das (ringförmige) Plasmid, in das die fremde DNA eingefügt ist.

### 2.2.7.1 TA-Klonierung

Der Einsatz der Taq-Polymerase in der PCR führt zu Reaktionsprodukten, die an ihrem 3'-Ende ein überhängendes Desoxyadenosin (dA) besitzen. Derartige PCR-Produkte können direkt kloniert werden, wenn linearisierte Vektoren mit einem überhängenden Desoxythymidin (dT) benutzt werden („TA“-Klonierung).

Anschließend werden chemisch kompetente XL1 blue, *E.coli*, INVαF oder TOP10-Bakterienzellen mit den Ligationsprodukten transformiert.

*Materialien:*

**pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen):**

Topoisomerasen katalysieren die Überführung von DNA-Topoisomeren ineinander, wobei sie während der Reaktion kovalent am 5'-Phosphatende gebunden werden. Der Ringschluss findet dann durch nukleophilen Angriff des 3-OH-Endes statt. Der Topoisomerase-Vektor besteht aus einem Vektor-Topoisomerase-Komplex mit einem Thymidinüberhang am 3'-Ende zur Klonierung von Taq-amplifizierten PCR-Produkten.

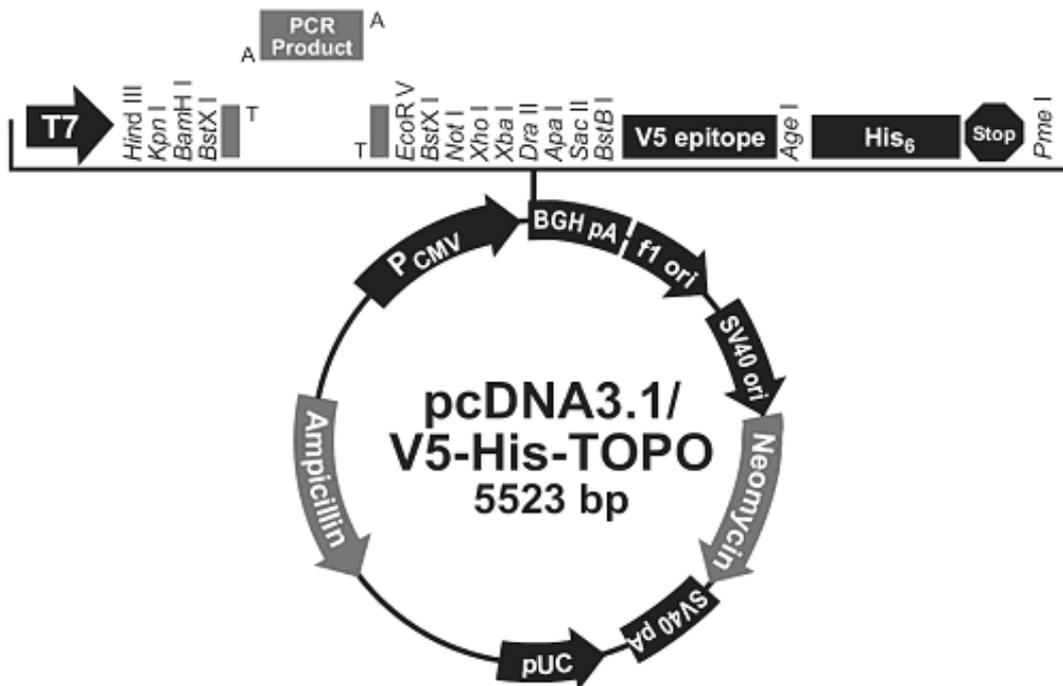
- Salt Solution (Reaktionspuffer)
- pcDNA3.1/V5-HisTOPO
- kompetente Bakterien: One Shot TOP10

*Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

*Vektorbeschreibung:*

Die folgende schematische Darstellung zeigt den TOPO-Vektor pCR 3.1/V5-HIS. Der Vektor ist 5523 bp groß. Er enthält u. a. die Sequenz für den T7-Primer (863-882) und für den BGH\_rev-Primer (4180-4197). Er codiert für eine Ampicillin- (7956-845) und Neomycinresistenz (5295-6089).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pcDNA3.1, Invitrogen**

#### **TA-Dual Promoter Cloning Kit (Invitrogen)**

- 10x Ligation Buffer
- 25 ng/μl pCR2.1-Vector mit T-Überhängen
- ddH<sup>2</sup>O
- T4 DNA-Ligase (4.0 Weiss Units/μl)
- 10–100 ng DNA-Template (mit überhängendem Desoxyadenosin) :
- SOC-Medium: siehe Transformation kompetenter Bakterien
- LB-Amp-Agarplatten: siehe Transformation kompetenter Bakterien
- X-Gal: (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid [X-Gal])
- Konzentration: mg/ml mit Dimethylformamid gelöst.

*Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

### Vektorbeschreibung:

Die folgende schematische Darstellung zeigt den TA-Vektor pCRII, der bei Verwendung linearisiert vorliegt. Der Vektor ist 3971 bp groß. Die Sequenz für die Bindung des M13 Reverse-Primers befindet sich an der Position 205 bis 221, die Bindungssequenz für den M13 Forward-Primer an Position 431 bis 446. Der Vektor besitzt Sequenzen, die für eine Kanamycin- (1317 bis 2111 Basen) und eine Ampicillinresistenz (2129 bis 2989) codieren. Die Abbildung zeigt weiterhin die Multiple Cloning Site (MCS), in die das PCR-Produkt ligiert wird.

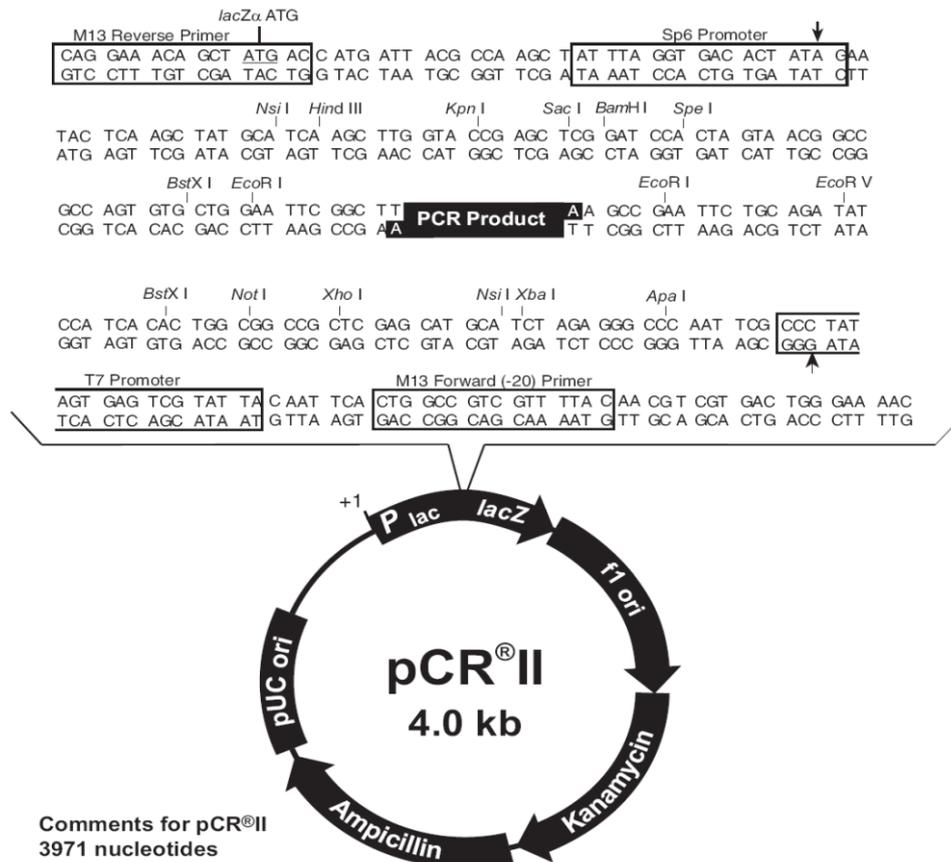


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pCRII, Invitrogen

### 2.2.7.2 Sticky-end- und Blunt-end-Ligationen

Während die aus *E. coli* isolierte Ligase auf beiden DNA-Strängen versetzt liegende, offene Phosphodiester-Bindungen spezifisch ligiert (Sticky-end-Ligation), führt die T4-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 noch zusätzlich die Verknüpfung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten ohne überhängende Einzelstrangbereiche aus, die sogenannte Blunt-end-Ligation. Daher ermöglicht die DNA-Ligase aus Phagen (T4 oder T7) eine uneingeschränkte Kombination von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Herkunft zur Herstellung von rekombinanter DNA.

Die nach dem Verdau linearisierten und gelgereinigten Plasmide werden in der Ligationsreaktion mit dem gewünschten Insert und der T4-Ligase inkubiert. Über den phosphorylierten Rest am 5'-Ende und die OH-Gruppe am 3'-Ende wird die Ringstruktur hergestellt. Der ver-

bleibende Strangbruch wird vom Bakterium geschlossen. Somit liegt wieder ein ringförmiges Plasmid vor, welches das gewünschte Insert enthält.

*Materialien:*

Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas):

- 5x Rapid Ligation Buffer
- Nukleasefreies H<sub>2</sub>O
- T4-Ligase (5U)

*Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

## 2.2.8 Analytische Polymerasekettenreaktion (PCR), Colony PCR, Präparative PCR

*Methodenprinzip:*

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction = PCR) ermöglicht die selektive *in-vitro*-Amplifikation einer speziellen Region aus der DNA, die als Template (doppelsträngige DNA-Matrize) dient. Zunächst wird durch Erhitzung des PCR-Ansatzes auf über 95 °C eine Denaturierung (Trennung des Doppelstranges in zwei Einzelstränge) erreicht. Nach raschem Abkühlen binden jetzt die im Reaktionsmix vorhandenen Oligonukleotide (Primer), die der Sequenz an den 3'-Enden komplementär sind, an die Stelle des DNA-Stückes, das amplifiziert werden soll. Ein hoher Überschuss des Primers im Vergleich zur Template-DNA garantiert eine dauerhafte Bindung. Durch eine thermostabile Polymerase, z.B. *Taq*-Polymerase (eine DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*) werden die DNA-Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang bei einer Temperatur von 68 bzw. 72 °C komplettiert, sodass nun zwei Doppelstränge vorhanden sind. Die dafür benötigten Nukleotide werden dem Reaktionsmix im Ansatz beigegeben. Derartige Reaktionszyklen werden mehrfach (ca. 35x) wiederholt und ergeben eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA.

*Materialien:*

pro Ansatz einer analytischen sowie einer Colony-PCR

Gesamtvolumen: 50 µl

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 1 µl Forward-Primer (10 µM)
- 1 µl Reverse-Primer (10 µM)
- 1 µl dNTP Mix (10mM)
- 0,5 µl *Taq*-Polymerase (Eppendorf)
- 1 µl Template (cDNA oder Klon von Bakterienkultur)
- 40,5 µl ddH<sub>2</sub>O

pro Ansatz einer präparativen PCR

Gesamtvolumen: 50 µl

- 5 µl 10x Accu Prime Pfx Reaction Mix (Invitrogen)
- 1,5 µl Forward-Primer (10 µM)
- 1,5 µl Reverse-Primer (10 µM)
- 1 µl DNA (entspricht 1-10 ng DNA)
- 0,5 µl Accu Prime Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)
- 40,5 µl ddH<sub>2</sub>O

#### *Durchführung:*

Als DNA-replizierendes Enzym wird bei der Durchführung einer analytischen oder einer Colony-PCR die Taq-Polymerase von Eppendorf verwendet.

Bei der Colony-PCR wird statt isolierter DNA als Template eine Bakterienkolonie, die die Plasmid-DNA enthält, in den PCR-Ansatz gegeben. Die analytische PCR wird im Anschluss an eine Klonierung durchgeführt, um festzustellen, ob und in welcher Orientierung die transformierten Bakterien das Insert enthielten.

Die Amplifikationsreaktion bestand aus 35 Zyklen mit je einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 30 Sekunden, einem Renaturierungsschritt bei für mindestens 1 Minute und einem Polymerisierungsschritt bei 68 °C. Die Polymerisierungszeit ist dabei abhängig von der Größe des zu erwartenden Produktes (je 1000 bp werden 60 Sekunden veranschlagt). Im letzten Zyklus wird der Polymerisierungsschritt auf 10 Minuten verlängert. Im Anschluss wird der Ansatz auf 12 °C heruntergekühlt.

Für die Durchführung einer PCR mit anschließender Gelaufreinigung des PCR-Produktes wird die mit niedriger Fehlerrate arbeitende Pfx-Polymerase (DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermococcus species*) verwendet. Die Amplifikationsreaktion wird als „Touchdown“-PCR durchgeführt. Die ersten 10 Zyklen verlaufen mit einer Denaturierung bei 95 °C/15 Sekunden, einer Renaturierung, beginnend bei 56 °C und in jedem Zyklus um ½ Grad abnehmend, für jeweils 30 Sekunden und einer Polymerisierung bei 68 °C unter Berücksichtigung der Größe des zu amplifizierenden DNA-Stückes (je 1000 bp 60 Sekunden). Die restlichen 25 Zyklen verlaufen analog, jedoch mit einer nun konstanten Annealingtemperatur von 51 °C im Renaturierungsschritt.

Bei der Touchdown-PCR wird die Spezifität der Primer-Bindung durch zyklusweise Absenkung der Annealing-Temperatur erniedrigt. Wenn die Annealing-Temperatur am Schmelzpunkt des Primers gewählt wird, binden die Primer nicht oder nur mit geringer Effizienz, aber sehr spezifisch an die DNA.

Damit wird zu Beginn der PCR eine Fehlpaarung des Primers verhindert, sodass lediglich die korrekte Zielsequenz mit allerdings geringer Effizienz amplifiziert wird. Wird nun die Annealing-Temperatur schrittweise gesenkt, erreicht man durch die erleichterte Bindung der

Primer eine höhere Effizienz der Reaktion. Dadurch wird erreicht, dass zunächst zwar weniger cDNA mit allerdings korrekter Zielsequenz erzeugt wird, um dann mithilfe dieser fehlerfreien cDNA als Matrize in größeren Mengen an cDNA unter weniger stringenten Bedingungen zu erzeugen.

Durch diese Methode erreicht man eine hohe Fehlerfreiheit bei gleichzeitiger effizienter Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes.

## 2.2.9 Auftrennung von DNA im Agarosegel

### *Methodenprinzip:*

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ein analytisches Verfahren, bei dem DNA als negativ geladene Teilchen durch Agarose im elektrischen Gleichstromfeld wandern. Durch die unterschiedliche Nettoladung bewegen sich die einzelnen Fragmente unterschiedlich schnell durch das Trägermaterial und werden entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt in kurzwelligem UV-Licht mithilfe von Ethidiumbromid. Da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, entsteht eine Absorptionsverschiebung, und die DNA leuchtet orange unter UV-Licht.

Für präparative Agarosegele, die der Isolierung von DNA-Fragmenten dienen, wird bei jedem Gellauf frischer Puffer verwendet. Es werden bei der Gelherstellung größere Taschen erzeugt, die ein Volumen von mehr als 60 µl fassen (50 µl PCR-Ansatz und 10 µl 6x Ladepuffer). Unter langwelligem UV-Licht wird zügig – die DNA wird sonst durch das UV-Licht geschädigt – mit einem Skalpell die DNA-Bande aus dem Gel geschnitten. Aus diesem Gelstück wird nun die DNA isoliert.

### *Materialien:*

- 1 g/100 ml TAE Agarose (Invitrogen) für Gelelektrophorese
- 1x TAE-Puffer
- Ethidiumbromid (10 mg/mL) als DNA-Interkalator
- 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas)
- 100 bp oder 1 kb-DNA-Marker (Fermentas)
- TAE, 50x:
  - 1,19 M Tris (145,37 g)
  - 0,6 M Essigsäure/(60,05 g)
  - 30 mM EDTA (11,16 g)
  - auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

### *Durchführung:*

Zunächst wird das Elektrophoresegel angefertigt, indem 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt wird, bis sich die Agarose komplett gelöst hat. In diese Lösung wer-

den 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Das noch flüssige Gel wird in eine Gelwanne gegossen, und ein passender Kamm, der die Taschen für die Proben formt, wird eingelegt.

Nach ca. einer halben Stunde ist das Gel erstarrt und kann mit den Proben befüllt werden. Zu diesem Zweck wird es in eine mit TAE-Puffer gefüllte Wanne gelegt. Es werden 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl 6x-DNA Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche gegeben. Um später die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können, werden zum Vergleich 5 µl eines DNA-Markers aufgetragen. Die DNA wird jetzt in einem elektrischen Feld bei einer konstanten Spannung von 40 bis 80 V aufgetrennt, indem sie im Gel mit einer Geschwindigkeit, die von der Größe des DNA-Fragmentes abhängig ist, zum Pluspol des elektrischen Feldes wandert.

### ***2.2.10 Aufreinigung von PCR-Produkten***

#### *Methodenprinzip:*

Die Agarosegelreinigung von DNA ist eine Technik zur Isolation von spezifischen Fragmenten aus komplexen Reaktionsgemischen. Dabei wird das Gelstück mit der entsprechenden Bande ausgeschnitten und in einem Bindepuffer gelöst. Diese Lösung wird dann durch eine Säule zentrifugiert. Die DNA bindet dort an einer Silikamembran. Die gereinigte DNA wird in mehreren Waschschritten mithilfe von Niedrigsalzpuffern oder deionisiertem Wasser von der Säule eluiert.

#### *Materialien:*

- E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen)
- 100 % Ethanol
- Sterile 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf, Hamburg))
- Steriles ddH<sub>2</sub>O

#### *Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

### ***2.2.11 Aufkonzentrierung von PCR-Produkten***

#### *Methodenprinzip:*

Die Aufkonzentrierung und gleichzeitige Reinigung von DNA wird mit dem DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Irvine, USA) durchgeführt. Die Reinigung bzw. Aufkonzentrierung erfolgt nach demselben Prinzip wie bei DNA-Minipräparationen. Die Probe wird zunächst mit Bindepuffer versetzt. Anschließend wird sie über eine spezielle Säule, die sehr kleine (~6µl) Endvolumina und damit eine hohe DNA-Konzentration ermöglicht, zentrifugiert und mit ddH<sub>2</sub>O eluiert. Dieses Prinzip wird insbesondere bei der Vorbereitung von DNA aus Minipräparationen zur Sequenzierung verwendet, um die benötigte DNA-Konzentration zu erreichen.

*Materialien:*

- DNA Clean & Concentrator-5 Kit Kit (Zymo Research)

*Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers.

### 2.2.12 Sequenzierung

*Methodenprinzip:*

Dem Cycle Sequencing liegt ein ähnlicher Mechanismus zugrunde wie der PCR, da auch hier mit einer thermostabilen DNA-Polymerase gearbeitet wird. Weitere Reaktionskomponenten sind: Reaktionspuffer, Primer, Nukleotide und die zu sequenzierende DNA.

Außer den in einer PCR verwendeten dNTPs sind jedoch zusätzlich Dideoxy-Nukleotide (ddNTPs) enthalten. Diese bewirken, dass nach ihrem Einbau die Strangsynthese abgebrochen wird. Da der Zufall entscheidet, wann ein ddNTPs statt eines dNTPs eingebaut wird, entstehen unterschiedliche Fragmente, die jeweils mit der Primersequenz beginnen und mit dem ddNTP enden. An die ddNTPs sind zusätzlich je nach Base verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gebunden, die bei der automatischen Sequenzgelelektrophorese durch Anregung mit Laserlicht detektiert werden können.

*Durchführung:*

Es werden je Probe zwei Ansätze mit je 0,6 µg Plasmid-DNA hergestellt. Dem einen Ansatz einer Probe wird der M13\_rev- Primer und dem anderen Ansatz der M13\_for-Primer hinzugefügt (je 10 pmol). Dieser Primer kann für alle DNA-Fragmente, die sequenziert werden sollen verwendet werden, da ihre Bindungsstellen die MCS im pCR II-Vektor, in die die DNA kloniert wurde, flankieren (s. Abbildung 11). In kurzen Fragmenten, die aufgrund ihrer Länge in beiden Richtungen vollständig sequenziert werden, können so Mutationen von Sequenzierfehlern differenziert werden, indem die Reverse- und die Forward-Sequenzierungsergebnisse miteinander verglichen werden.

Alle durchzuführenden Sequenzierungen werden von der Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

### 2.2.13 Ortsspezifische Mutagenese

*Methodenprinzip:*

Bei diesem Verfahren handelt es sich um die gezielte Einfügung von Punktmutationen in eine Sequenz *in vitro*. Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl von Methoden für die ortsspezifische Mutagenese entwickelt. Die angewandte Methode wird als „Primer-Extension-Mutagenese“ bezeichnet. Als Matrize dient doppelsträngige Plasmid-DNA, die mithilfe von Oligonukleotidprimern und in diesem Fall unter Verwendung der Pfx-Polymerase repliziert wird. Die Oligonukleotide sind komplementär zueinander und enthalten die Mutation in der Mitte ihrer

Sequenz. Die Oligonukleotidprimer hybridisieren an der gewünschten Region, in die die Mutation eingefügt werden soll. Mithilfe der Polymerase werden die DNA-Stränge kopiert, indem der Ansatz mehreren Temperaturzyklen (Denaturierung, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese) ausgesetzt wird. Es entstehen mutierte Plasmide mit Einzelstrangbrüchen am 5'-Ende jedes Primers. Die Plasmid-DNA, die als Matrize diente, wird im Anschluss durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* zerstört. Da *DpnI* nur methylierte und hemimethylierte DNA verdaut, wird die aus *E.coli*-Zellen isolierte Plasmid-DNA, die an bestimmten Sequenzen methyliert ist, erkannt und verdaut.

Die *in vitro* komplett neu synthetisierte DNA mit der Mutation bleibt hingegen intakt. Die mutierte DNA wird dann in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert, die am 5'-Ende entstandenen Einzelstrangbrüche werden *in vivo* von den Bakterien repariert.

#### *Material:*

Methode nach *Stratagene QuikChange Site-Directed Mutagenesis*

##### 1.) Einbringen der Mutation

- 5 µl 10x Reaktionspuffer (*Pfx*-PCR-Reaktionspuffer mit dNTPs)
- 5–50 ng Plasmid-DNA
- 125 ng Forward-Primer
- 125 ng Reverse-Primer
- 1 µl (2,5 U) *Pfx* DNA-Polymerase
- x µl ddH<sub>2</sub>O (auf ein Ansatz-Gesamtvolumen von 50 µl)

##### 2.) Verdau mit *DpnI* (Fermentas)

- 1 µl (10 U) *DpnI* pro Ansatz

##### 3.) Transformation in XL1-blue

- Kompetente XL1-blue-Bakterien
- 500 µl SOC-Medium

#### *Durchführung:*

Für die Herstellung der mutierten Plasmid-DNA werden 4 Ansätze mit 5, 10, 20 bzw. 50 ng Plasmid-DNA als Template hergestellt und je 125 ng Forward- und Reverse-Primer mit der Mutation eingesetzt. Die Ansätze werden mit 1 µl *Pfx* DNA-Polymerase und 5 µl des 10x *Pfx*-PCR-Reaktionspuffer mit dNTPs versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Zum Einbringen der Punktmutation werden die Ansätze 12 Zyklen inkubiert mit je 30 Sekunden bei 95 °C zur Denaturierung der DNA, 60 Sekunden bei 55 °C zur Anlagerung der Primer und bei 68 °C 240 Sekunden (1 min/kb der Plasmidlänge) zur Synthese der neuen mutierten DNA. Danach werden die Ansätze zum Abkühlen der Reaktion bis auf 8 °C für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wird 1 µl (10 U) des Restriktionsenzym *DpnI* zu der

Amplifikationsreaktion gegeben, um die methylierte Template-Plasmid-DNA zu entfernen. Die Ansätze werden eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann werden 2,5 µl *DpnI*-behandelte Amplifikationsreaktion (Plasmid-DNA mit Mutation) in 50µl kompetente XL1-blue-Bakterien transformiert (vgl. Kap. 2.2.1). Die transformierten Bakterien werden dann auf vorgewärmten LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C für mindestens 16 Stunden inkubiert.

### **2.2.14 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen**

#### *Methodenprinzip:*

Hierbei werden Lösungsbedingungen geschaffen, bei denen das Material in verschiedenen Phasen aufgetrennt und gemäß seinen chemischen Eigenschaften voneinander isoliert wird. Die Lyse der Zellen erfolgt in Anwesenheit von Guanidiniumisothiocyanat, einem RNase-Hemmer. Mit der Zugabe von Chloroform und der anschließenden Zentrifugation wird nun eine Trennung in drei Phasen erreicht. Gemäß ihrer Polarität lösen sich die kleinen DNA-Fragmente (unpolar) im sauren Phenol, die größeren in der Interphase, und die RNA verbleibt in der oberen wässrigen Phase, da sie polarer ist und sich besser in Wasser löst. Dieses Prinzip wird als Single-Step-Methode bezeichnet. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wird nur die wässrige Phase weiter verwendet. Hierfür erfolgt die Fällung der RNA mit Isopropanol, gefolgt von zwei Waschschrritten mit 75 Prozent Ethanol. Abschließend wird die RNA in RNase-freiem Wasser gelöst.

#### *Material:*

- PqGold TriFast, (PqLab, Erlangen)
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol 75 %
- Polypropylen-Zentrifugenröhrchen

#### *Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.15 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

#### *Methodenprinzip:*

Mit einem Spektralphotometer können mittels Lichtabsorption DNA- und RNA-Konzentrationen gemessen werden. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass Lichtquanten bestimmter Energie stoffspezifisch absorbiert werden. Die Basen der Nukleinsäuren (RNA, DNA) in einer Probe haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, die aromatischen Reste der Proteine bei 280 nm. Der 260 nm/280 nm Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen.

#### *Material:*

NanoDrop ND1000 Spektrophotometer (Peqlab)

Der Vorteil des NanoDrop von Peqlab gegenüber herkömmlichen UV/VIS-Spektrometern ist, dass hier mit sehr viel kleineren Volumina gemessen werden kann, was eine Verdünnung der Probe und eine anschließende Hochrechnung der Konzentrationen entbehrlich macht. Außerdem sind für die Durchführung keine Quarzglasküvetten mehr erforderlich.

#### *Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.16 Reverse Transkription von RNA in cDNA**

#### *Methodenprinzip:*

Die Transkription der RNA in cDNA erfolgt durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase. „Revers“ beschreibt dabei die spezielle Eigenschaft des Enzyms, den eigentlichen Transkriptionprozess von der DNA zur RNA umzukehren. Es wird hierbei Einzelstrang-RNA in Doppelstrang-DNA umgeschrieben. Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität wird zunächst ein RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert. Danach wird der RNA-Anteil abgebaut (spezieller RNase-Anteil des Enzyms) und die DNA durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität zum Doppelstrang vervollständigt. Da im mikrobiologischen Verfahren die RNA als Matrize dient und immer wieder neu abgelesen werden muss, ist diese RNase-Aktivität in den eingesetzten rekombinant veränderten Enzymen nicht mehr vorhanden. Die Reverse Transkriptase wurde zunächst in Retroviren entdeckt, sie kommt allerdings auch in einigen DNA-Viren und der eukaryontischen Telomerase vor.

Die in der Molekularbiologie eingesetzten Reversen Transkriptasen stammen u. a. vom murinen Leukämievirus (Mo-MLV), welche modifiziert und rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Diese modifizierte Variante zeichnet sich durch eine hohe Thermostabilität aus, weist keine RNase-Aktivität auf und erzeugt sscDNA anstelle von dscDNA. Als Primer für die Reaktion werden randomisierte Primer verwendet, die aus sechs zufällig ausgewählten Nucleotiden bestehen. Da sich daraus eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten ergeben, kann gewährleistet werden, dass die im Reaktionsansatz enthaltene RNA komplett in cDNA umgeschrieben wird.

#### *Materialien:*

- RNA
- Pd (N)6 Random Hexamer 5' Phosphate Primer (Amersham Biosciences, Freiburg)
- ddH<sub>2</sub>O
- dNTP-Mix (Fermentas)
- Reverse Transkriptase (Superscript III, 200 units/μl (Invitrogen))

*Durchführung:*

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Kultivierung adhärenter Zellen**

*Methodenprinzip:*

Zur Kultivierung von Zellen werden spezielle Nährmedien verwendet, in denen sämtliche Nährstoffe enthalten sein müssen. Da einige Komponenten nicht bekannt sind, muss den chemisch hergestellten Medien noch fetales Kälberserum beigegeben werden, um die Nährlösung mit den unbekanntem Faktoren zu vervollständigen. Um eine Verunreinigung während der Passage zu vermeiden, können dem Nährmedium noch Antibiotika bzw. Antimykotika zugesetzt werden.

Im Brutschrank muss ein ideales Wachstumsklima geschaffen werden. Dies erfolgt zum einen durch eine Temperatur von 37 °C im Brutschrank und die Einstellung eines pH-Wertes im Medium auf den zellphysiologischen Wert von 7,2. Dieser pH-Wert wird erreicht durch ein Bicarbonatpuffersystem: Die  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Medium wird mithilfe des  $\text{CO}_2$ , das der Atmosphäre des Brutschrankes hinzugefügt wird, konstant gehalten.

Die Zellen werden in Zellkulturflaschen mit hydrophilisierter Oberfläche, die die Adhäsion von Zellen an die Kunststoffoberfläche verbessert, mit Medium ausgesät und wachsen am Boden der Zellkulturflaschen zu einem konfluenten Zellrasen. Sobald der Zellrasen konfluent ist, müssen die Zellen passagiert werden, damit es nicht zum Überwachsen bzw. Absterben der Zellkultur kommt.

*Materialien:*

#### **Verwendete Zelllinien:**

293 und 293T

Es handelt sich um humane embryonale, epitheliale Nierenzellen. Diese sind mit dem E1A-Gen des Adenovirus transformiert und besitzen ein intaktes IFN-System. 293T sind zusätzlich noch mit dem großen T-Antigen des Simian-Virus 40 (SV40) transformiert.

Vero E6

Es handelt sich um Nierenzellen/Fibroblasten der „Grünen Meerkatze“ (*Cercopithecus aethiops*). Sie besitzen infolge einer Chromosomendeletion keine IFN- $\alpha/\beta$ -Gene mehr, sind aber noch sensitiv für das Typ-I-Interferon.

### **Medien:**

*Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) wird mit 10 Prozent fetalem Kälberserum und 526,6 mg/l Glutamin versetzt (Glutamin ist nicht stabil und wird daher unmittelbar vor Gebrauch zugegeben), zur Vorbeugung bakterieller Kontaminationen werden 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugegeben.

PBS (Phosphate Buffered Saline) ohne Calcium und Magnesium

Trypsin/EDTA-Lösung: 0,0259 g/l Trypsin 1:250/0,02 Prozent EDTA

(zum Lösen der adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflasche)

75 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Greiner)

### *Durchführung:*

Die 293T- und die Vero-Zellen werden in eine 75cm<sup>2</sup>/175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche DMEM mit 10 Prozent FKS bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub> gehalten. Bei Konfluenz des Zellrasens müssen die Zellen 1/10 oder 1/20 geteilt werden und ggf. in eine neue Flasche weiterpassagiert werden. Die Durchführung der Zellpassage erfolgt unter einer Sterilwerkbank. Zunächst wird das alte Medium von den Zellen abgezogen und verworfen. Die Zellen werden dann mit 5/10 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Das PBS wird abgezogen und verworfen. Zum Ablösen des Zellrasens werden nun 2/4 ml 0,25%ige Trypsin/0,02% EDTA in die Zellkulturflasche gegeben. Es folgt eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 5 Minuten, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Dann wird das Trypsin inaktiviert, indem 3/6 ml des FKS-haltigen Mediums in die Flasche gegeben wird. Dies geschieht durch die im FKS enthaltenen Trypsininhibitoren. Die Zellen können nun experimentell eingesetzt oder weiterpassagiert werden. Letzteres erfolgt, indem die 5/10 ml mit einer Pipette aufgenommen werden und 0,5/1 ml (1/10) in die Flasche zurück oder in neue Flaschen überführt werden. Der Rest wird verworfen. Die Flaschen werden nun mit 11,5/29,5 ml frischem Medium aufgefüllt, leicht geschwenkt und in den Brutschrank gebracht.

## **2.3.2 Transfektion**

### *Methodenprinzip:*

Als Transfektionsmethode dient die Lipofektion.

Bei dieser Methode wird DNA mithilfe von Liposomen, welche mit der Zellwand sehr leicht fusionieren, in die Zelle gebracht. Zur Komplexierung der DNA dienen kationische Polymere und neutrale Lipide, die mit der Zellmembran fusionieren können und die DNA so in die Zelle einbringen.

*Materialien:*

Transfektionsreagenzien:

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

FuGene HD Transfection Reagent (Roche)

FuGene 6 (Roche)

6-, 12-Well-Platten (Greiner)

OptiMEM (Invitrogen)

*Durchführung:*

Die Transfektion wird unter der Sterilwerkbank durchgeführt. 24 Stunden vor der Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen in der gewünschten Zelldichte in Zellkulturplatten mit sechs bzw. zwölf Kavitäten ausgesät.

Transfektion mit FuGene HD (Roche):

Es wird ein Transfektionsmix aus 1 µg Plasmid-DNA, 100 µl FKS-freiem Medium/Kavität (OptiMEM) und 6 µl FuGene HD/Kavität angesetzt. Der Transfektionsmix wird zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 100 µl des Transfektionsmix je Kavität auf die Zellen gegeben. Abschließend werden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 Stunden inkubiert.

Transfektion mit FuGene 6 (Roche):

Zunächst werden 3 µl FuGene 6 in 50 µl OptiMEM/Kavität vorverdünnt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA. Der Transfektionsmix wird dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 50 µl des Transfektionsmix je Kavität auf die Zellen gegeben. Abschließend werden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 0,6,12,24, 48 Stunden inkubiert.

Transfektion mit Lipofectamine (Invitrogen):

Zunächst werden 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl Lipofectamine in je 50 µl OptiMEM/Kavität vorverdünnt. Anschließend wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die vorverdünnte DNA und das vorverdünnte Transfektionsreagenz vereinigt und 100 µl des Transfektionsmix je Kavität auf die Zellen gegeben. Abschließend werden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 Stunden inkubiert.

### **2.3.3 Dual-Luciferase-Reporterassay**

*Methodenprinzip:*

Dieses Verfahren dient der Bestimmung von Promotoraktivitäten. Mithilfe von Reporterplasmiden wird unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors die Firefly(FF)-Luciferase exprimiert. Gemessen wird die durch den Substratumsatz dieses Enzyms erzeugte

Lichtmenge. Da die Expressionsstärke der Luciferase der Kontrolle der vorangeschalteten Promotoren unterliegt, ist die Aktivität der Luciferase und somit auch die erzeugte Lichtmenge proportional zum Aktivitätsgrad der Promotoren. Die Lichtmenge wird mithilfe eines Luminometers detektiert. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, werden zusätzlich Plasmide eingesetzt, die unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40-Promotors das Renilla-Luciferase-Gen enthalten.

*Material:*

Dual-Luciferase-Reporterassay (Promega, Mannheim)

Lumitrac-Mikroplatten (Greiner, Frickenhausen)

Luminometer: Fluostar Optima (BMG Labtech, Offenburg)

*Durchführung:*

Zunächst werden die Zellen lysiert, indem das Medium abgesaugt wird und 100 µl 1x passiver Lysepuffer (Promega) pro Kavität auf die Zellen gegeben werden. Der Ansatz wird für 15 Minuten inkubiert. Dann werden 20 µl des Zelllysats in die Kavitäten der Messplatte gegeben. Zur Messung der FF-Luciferase-Aktivität werden 100 µl FF-Luciferase-Substrat auf das Lysat gegeben. Im zweiten Messschritt werden 100 µl Substratlösung, die das Substrat der Renilla-Luciferase sowie einen Quencher enthält, der die Lumineszenzsignale der FF-Luciferase unterdrückt, zur Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität in die Kavitäten der Messplatte gegeben.

### **2.3.4 Das Minireplikon-System**

Um die replikative und transkriptionelle Aktivität einer viralen Polymerase im virusfreien Kontext zu untersuchen, wurden für verschiedene Viren sogenannte Minireplikon-Systeme entwickelt. Auch für einige Bunyaviren (z.B. RVFV, LACV und BUNV) wurden solche Systeme bereits etabliert.

Im Minireplikon-System wird die zu untersuchende virale Polymerase transient exprimiert. Als Matrize für die virale Polymerase dient ein sogenanntes Minigenom, das alle nicht codierenden Sequenzen, die für die Transkription und Replikation benötigt werden, enthält, aber anstelle eines viralen Gens für ein Reporter gen codiert. Als Reporter wird z.B. die Renilla-Luciferase verwendet, deren Aktivität gut quantifizierbar ist.

Im Falle der Minireplikon-Systeme für Bunyavirus-Polymerasen muss neben der Polymerase selbst auch das virale Nukleoprotein exprimiert werden, da die virale Polymerase nur Ribonukleoproteinkomplexe transkribiert bzw. repliziert. Die Expression der viralen Polymerase und des viralen Nukleoproteins sowie des Minigenoms erfolgt unabhängig von der zellulären RNA-Polymerase II. Im Falle des La-Crosse-Virus-Minireplikon-Systems (Blakqori et al. 2003) wird hierfür die T7-RNA-Polymerase verwendet.

Das Minigenom selbst besteht aus der Sequenz eines Reportergens (z.B. Renilla-Luciferase), welches in genomischer Orientierung in den Vektor kloniert wurde. Die Reportergensequenz wird flankiert von den regulatorischen 5'- und 3'-Enden des Virus, die von der viralen Polymerase erkannt werden können. Das Reportergenprodukt hat Eigenschaften, die es erlauben, dass es quantitativ gemessen werden kann; es stellt damit ein Mass für die Transkription und Replikation dar.

Die T7-Polymerase initiiert also zum einen initial die Expression der viralen Proteine, aber auch die Umschreibung des Minigenoms (Plasmid-DNA) in (-)RNA. Im Falle der etablierten Minireplikon-Systeme der Bunyaviren assoziiert das Nukleoprotein mit dieser -RNA, was eine Anlagerung der viralen Polymerase möglich macht. Diese Einheit aus -RNA, Nukleoproteinen und viraler Polymerase wird auch als Ribonukleoprotein-Komplex (RNP-Komplex) bezeichnet. Mithilfe der viralen Polymerase kann nun eine mRNA zur Expression des Reportergens oder eine antigenomische RNA synthetisiert werden. Durch die Messbarkeit des Reporterproteins oder dessen Substratumsatzes können auf diesem Wege Aussagen über die Replikation und Transkription des Virus getroffen werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung der ORFs der OROV-Genomsegmente zur Etablierung eines Minireplikon- und Reverse-Genetik-Systems

Um die Funktionalität der viralen Proteine und die interferonantagonistische Wirkung des NSs-Proteins näher zu untersuchen, soll für OROV zunächst ein Ribonukleoprotein-(RNP-) Rekonstitutionssystem (Minireplikon-System) und danach ein Reverse-Genetik-System etabliert werden, welches die Herstellung von rekombinantem OROV, ausgehend von cDNA, erlaubt. Wie in Kapitel 2.3.4 erläutert, werden für das Minireplikon- bzw. Reverse-Genetik-System sowohl Rescue- als auch Helferplasmide (Expressionsvektoren) benötigt, die für OROV bisher nicht vorlagen.

Die viralen Proteine, die zur Bildung des RNP-Komplexes benötigt werden, werden mithilfe von Helferplasmiden (OROV-S-/Smut-/L cDNA in pl.18 Expressionsvektor) unter der Kontrolle des CMV-Promotors durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II exprimiert. Hierbei handelt es sich zum einen um das Nukleoprotein, dessen codierende Sequenz sich auf dem S-Segment befindet, und zum anderen um die virale Polymerase (L-Protein), deren codierende Sequenz sich auf dem L-Segment befindet.

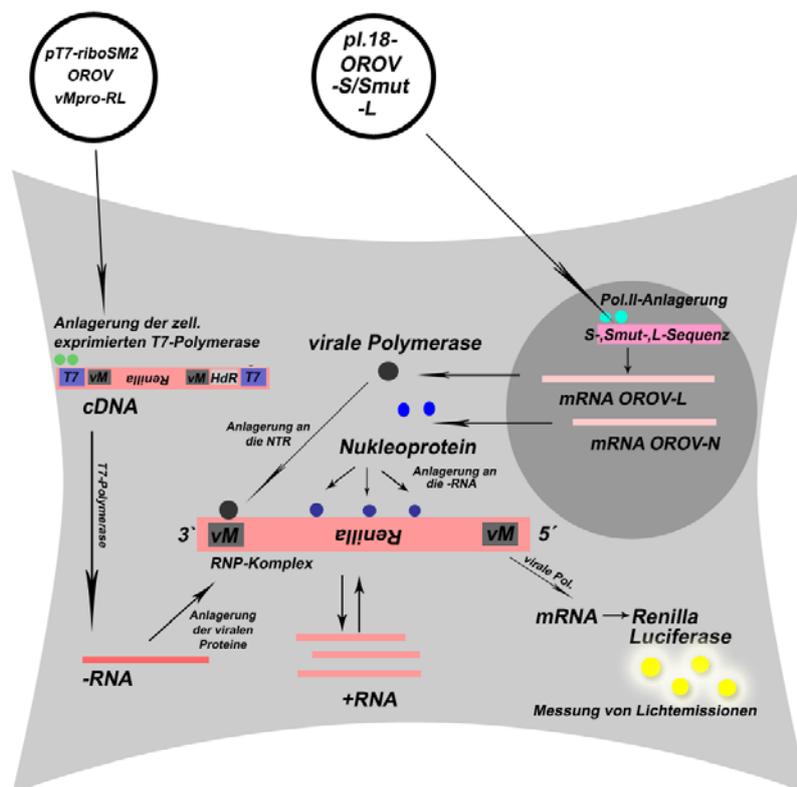


Abbildung 12: Das Minireplikon-Systems des OROV.

Falls der S-Wildtyp ORF (*open-reading-frame*) im Helferplasmid verwendet wird, kommt es auch zur Synthese von NSs. Mithilfe des Rescuevektors pT7-riboSM2-OROV-vMpro-vRL wird ein sogenanntes Minigenom in die Zelle eingebracht. Das Minigenom beinhaltet die cDNA des Renilla-Luciferase-Gens, flankiert von nicht codierenden Enden des OROV-M-Segments, welche für die Anlagerung der viralen Polymerase benötigt werden. Da die verwendete Zelllinie BSR-T7 konstant T7-Polymerase exprimiert, kann sie die cDNA des Minigenoms in RNA umschreiben. Diese RNA dient als Matrize für die virale Polymerase, die über die regulatorischen Sequenzen des M-Segments die Minigenom-vRNA in mRNA umschreibt, welche dann translatiert werden kann. Damit man nach der T7-Polymerase-getriebenen Transkription der cDNA des Minigenoms eine (-)RNA erhält, die von der viralen Polymerase in eine mRNA umgeschrieben wird, ist es notwendig, dass die cDNA des Minigenoms in genomischer Orientierung im pT7-ribo-SM2-Vektor vorliegt. Die Aktivität der Renilla-Luciferase kann in einem Lumineszenz-Verfahren quantitativ gemessen werden und ist damit ein Maß für die Menge der gebildeten Renilla-mRNA und insofern auch indirekt für die Aktivität der viralen Polymerase.

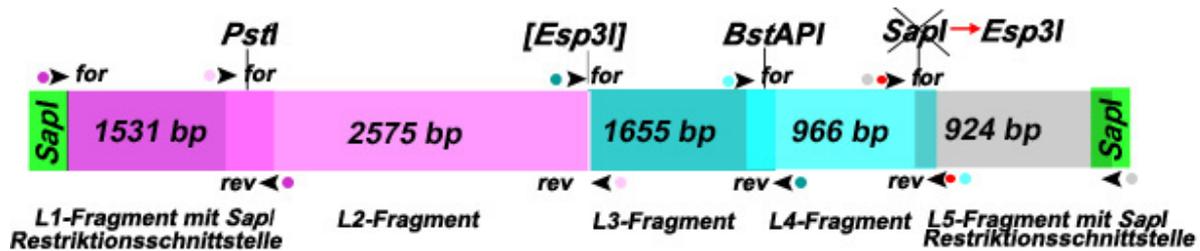
### 3.1.1 Herstellung der Expressionsvektoren

#### 3.1.1.1 Klonierung der OROV-L-ORF-cDNA-Fragmente

Da die cDNA des L-open-reading-frames (L-ORF), d. h. die Sequenz des L-Segments ohne die nicht codierenden Regionen am 3'- und 5'-Ende (NTR) mit 5888 bp zu groß ist, um sie mittels PCR an einem Stück fehlerfrei zu amplifizieren, wurden sie mithilfe spezifischer Primer in fünf Segmenten (L1–L5) hergestellt.

Die Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass sich die einzelnen Fragmente in ihrer Sequenz am Anfang und am Ende um einige Basenpaare überlappen, wobei der überlappende Bereich jeweils eine singuläre Schnittstelle für ein Restriktionsenzym enthält. Diese werden für die Ligation der Fragmente zum vollständigen L-ORF benötigt. Zur Verknüpfung des L2- und des L3-Fragmentes wurde an die jeweiligen Primer eine *Esp31*-Schnittstelle angefügt, die bei der Ligation der Fragmente unter Rekonstituierung der authentischen Sequenz wieder entfernt wird, da es sich bei *Esp31* um ein sogenanntes TypII-S-Restriktionsenzym handelt, das außerhalb seiner DNA-Erkennungssequenz schneidet.

Des Weiteren wurde die *SapI*-Restriktionsschnittstelle im L4-Fragment durch eine stumme Punktmutation zerstört und stattdessen eine *BsmBI*-Schnittstelle erzeugt. Dies war notwendig, da der vollständige L-ORF im Verlauf der Klonierungen über *SapI*-Schnittstellen in den Rescue-Vektor pT7-riboSM2 ligiert wurde. Diese *SapI*-Schnittstellen wurden dem L1- und dem L5-Fragment angefügt. Eine zusätzliche *SapI*-Schnittstelle im L4-Fragment hätte einen Verdau innerhalb des L-ORF und somit dessen Zerstörung zur Folge.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der cDNA der OROV-L-ORF-Fragmente.**

Die einzelnen Fragmente wurden als L1- bis L5-Fragment bezeichnet. Die Pfeile geben die Regionen an, an die die Primer binden und die Richtung, in die amplifiziert wurde. Die Primer zur Amplifikation des L4-Fragmentes enthalten eine Punktmutation, mit deren Hilfe aus einer SapI-Schnittstelle eine Esp3I-Schnittstelle (Esp3I entspricht BsmBI) hergestellt worden ist. Damit wurde verhindert, dass das Restriktionsenzym SapI während der Klonierung des L-ORF in den Rescuevektor pT7-riboSM2 den L-ORF zerschneidet. An das 5'-Ende des L1- und an das 3'-Ende des L5-Fragmentes wurde zu diesem Zweck jeweils die Sequenz einer SapI-Schnittstelle angefügt.

Für die Amplifikation des OROV-L-ORF wurden folgende Primer verwendet:

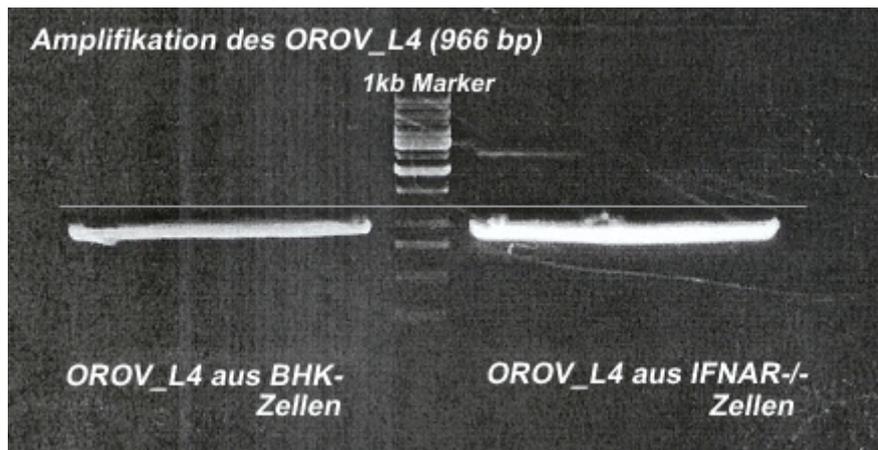
OROV-L1_for_sapi	GACAGAGCTCTTCAATGTCACAACCTGTTGCTCAACCA
OROV-L1_rev	TCATTGATGCATTGCCAGTATTTAGT
OROV-L2_for	AGATAAGATTGGAAACTACCTA
OROV-L2_rev_new_Esp3I	GACAGACGTCTCTATTCCGCACATCTCTACTGG
OROV-L3_for_new_Esp3I	GACAGACGTCTCGGAATACTAGAAAAGTGATTTATCAACAATTG
OROV-L3_rev	ATCAATTTGTCATCTTCCCCAGTG
OROV-L4_for	TGCCATACAAAGTTTTTCACATCAA
OROV-L4_rev	CCATACCACCAGAAGGGATTG
OROV-L4_format2	GGGGCACTGACAGGTAACCTTGATAAAT
OROV-L4_revmut	TGAAAATGTGCTCGTCTCGTGATGG
OROV-L5_for	TTCAAAATGGGTTCTGTATGCC
OROV-L5_format	GCCATCACGAGACGAGCACATTTT
OROV-L5_rev_sapi	GACAGAGCTCTTCTTAGAAGTCAAATTTGGATTTGCCA

Bei der Konstruktion der OROV-L1\_for- und OROV-L5\_rev-Primer wurden die Sequenzen für SapI-Schnittstellen für die Ligation des L-Segments in den pT7-riboSM2 am 5'-Ende und am 3'-Ende des L-ORF angehängt. Für die Herstellung der Primer wurde auf Sequenzen aus GenBank zurückgegriffen (NC\_005775 OROV M-Segment).

Zu Beginn der Klonierungsarbeiten wurde zunächst die Gesamt-RNA aus OROV-infizierten BHK- und IFNAR<sup>-/-</sup>-Zellen isoliert (vgl. Kap. 2.2.14).

Mithilfe der Superscript-III-Reversen-Transkriptase (RT, Invitrogen) und Random-Hexamer-Primern (GE Life Science) erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA unter folgenden Bedingungen: 5 Minuten Inkubation bei 25 °C zur Anlagerung der Primer, 60 Minuten bei 50 °C zur reversen Transkription und 15 Minuten bei 70 °C zur Inaktivierung der RT.

Die so erhaltene cDNA wurde zur Amplifikation der OROV-L1-L5 Fragmente mithilfe der Pfx-Polymerase (Invitrogen) und der L1-L5-spezifischen Primer verwendet (vgl. Kap. 2.2.8).



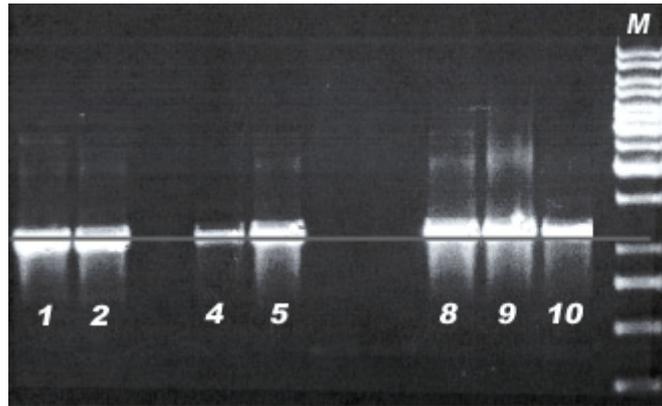
**Abbildung 14: Präparative Gelelektrophorese nach Amplifikation der OROV-L4 cDNA.**

*Links: PCR-Amplifikat, ausgehend von cDNA, die durch Umschreiben von RNA aus OROV-infizierten BHK-Zellen gewonnen wurde. Rechts: PCR-Amplifikat, ausgehend von cDNA, die durch Umschreiben von RNA aus OROV-infizierten IFNAR<sup>-/-</sup>-Zellen erhalten wurde. In beiden Ansätzen wurde das PCR-Produkt der erwarteten Größe (966 bp) erhalten.*

Bei der Amplifikation mit Pfx-Polymerase entstehen PCR-Fragmente mit glatten Enden. Daher wurde im Anschluss an die Amplifikation das PCR-Produkt noch 15 Minuten mit 1 U Taq-Polymerase inkubiert, um das Anhängen des A-Nukleotids zu erreichen, was für die anschließende TA-Klonierung (vgl. Kap. 2.2.7.1) notwendig war. Danach wurde eine präparative Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt, die DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe eines Gelextraktionskits (Zymoclean) gereinigt (vgl. Kap. 2.2.10).

Die so gewonnenen OROV-L1- bis -L5-Fragmente wurden dann in den T-Vektor pCRII (Invitrogen) eingefügt. Die Ligation erfolgte jeweils mit 60 ng PCR-Produkt, 1 µl 10x Puffer, 2 µl pCRII-Vektor und 1 µl T4-DNA Ligase bei 14 °C für 4 bis 18 Stunden je nach Fragmentgröße (vgl. Kap. 2.2.7.1).

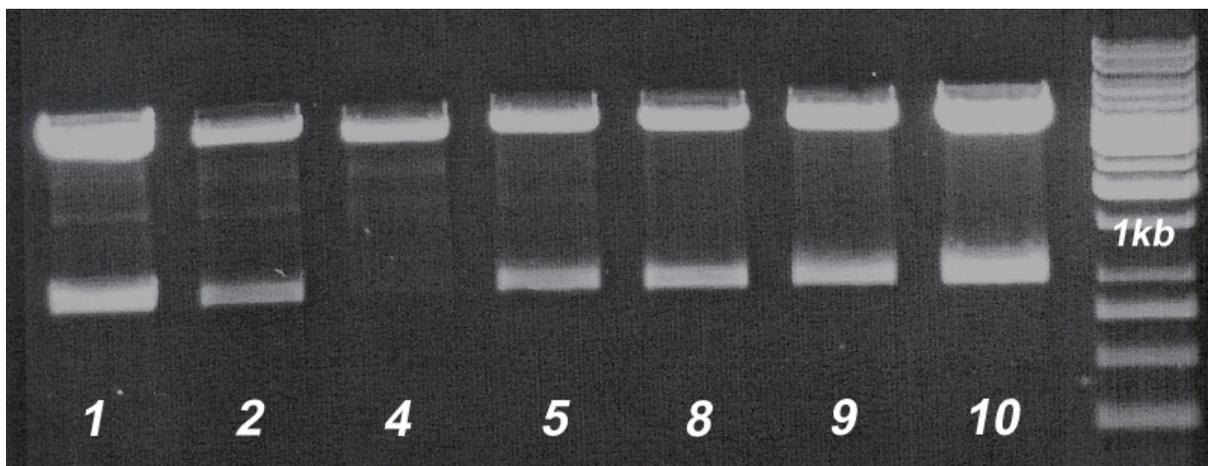
2 µl des Ansatzes wurden dann in kompetente INFaF<sup>-</sup>-Bakterien transformiert (vgl. Kap. 2.2.2). Die Bakteriensuspensionen wurden auf LB-Amp-Platten ausgestrichen, die zur Durchführung eines Blau-Weiß-Screenings mit 40 ml X-Gal präpariert waren. Dann wurden die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle, ob das Insert in den Konstrukten enthalten ist und in welcher Orientierung es im pCRII-Vektor vorliegt, wurden nun zwei Colony-PCR-Ansätze (vgl. Kap. 2.2.8) durchgeführt. Es wurde das Primerpaar M13\_for/M13\_rev (s. Abbildung 11) eingesetzt, um zu überprüfen, ob ein Insert im Vektor enthalten ist. Ob das Insert in *sense*-Orientierung vorlag, wurde mit den Primern M13\_for und dem spezifischen Forward-Primer des jeweiligen L-Fragmentes überprüft. Zur Überprüfung der *antisense*-Orientierung der L-Fragmente im Vektor wurden die Primer M13\_for und der spezifische Reverse-Primer verwendet. Parallel dazu wurden die Klone zum Zweck einer Minipräparation (vgl. Kap. 2.2.4) in LB-Amp-Flüssigmedium über Nacht angezchtet.



**Abbildung 15: Ligation von OROV-L4 in pCRII-Vektor**

Analytische Agarosegel-Elektrophorese nach Colony-PCR zur Überprüfung der Ligation von OROV-L4 in pCRII unter Verwendung der Primer M13\_for und M13\_rev. Aus den Klonen 1, 2, 4, 5, 8, 9 und 10 lässt sich das L4-Fragment amplifizieren. Im Gelbild zeigte sich bei diesen Klonen eine Bande bei 966 bp. M = 1 kb Marker.

Aus den Bakteriensuspensionen der ÜNKs, bei denen in der Colony-PCR ein ein DNA-Fragment der erwarteten Größe amplifiziert worden war, wurden nun Minipräparationen durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.4). Die isolierte Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle des Ligationserfolges mit Restriktionsenzymen verdaut. Dafür wurden für den Verdau der einzelnen L-Fragmente unterschiedliche Restriktionsenzyme eingesetzt. In Abbildung 16 ist exemplarisch das Ergebnis eines solchen Restriktionsverdau für das Plasmid pCRII-OROV-L4 dargestellt.



**Abbildung 16: Ligation von OROV-L4 in pCRII-Vektor**

Bandenmuster des Plasmids pCR-II-ORO-V-L4 nach Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

Nach der Ligation des OROV-L4-Fragmentes in den Vektor pCRII wurde ein Kontrollverdau mit BamHI und XhoI durchgeführt, da diese Restriktionsenzyme in der MCS von pCR II schneiden. Das L4-Fragment enthält hingegen keine Schnittstelle für BamHI und XhoI, sodass sich das vollständige Fragment mithilfe dieser Restriktionsenzyme aus dem Vektor schneiden

lässt. Daher wurden zwei Banden erwartet, die zum einen der Größe des Vektors pCR II und zum anderen der Größe des OROV-L4-Fragmentes (966 bp) entsprechen. War das Insert nicht enthalten, so wurde nur eine Bande in der Größe des linearisierten Vektors erwartet. Der Klon 4 enthält das L4-Fragment nicht, obwohl im Gelbild der Agarosegel-Elektrophorese nach Colony-PCR ein positives Signal festzustellen war. Die Klone 1, 2, 5, 8, 9 und 10 dagegen enthalten das Insert.

In den Fällen, in denen die Restriktionsmuster mit den Erwartungen übereinstimmten, war von einer erfolgreichen Klonierung auszugehen. Die entsprechenden Proben aus der Minipräparation wurden zur Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab in Göttingen (s. Kap. 2.2.12).

#### **Sequenzierungsergebnisse OROV-L1-Fragment in pCRII:**

Wie die Sequenzierungsergebnisse zeigten, entspricht keiner der sechs Klone der Referenzsequenz OROV-L NC\_005776. Es zeigten sich 40 Punktmutationen bei allen Klonen, und zwar jeweils an den gleichen Positionen. Bei der Mehrzahl der Mutationen handelt es sich um stumme Punktmutationen, 11 Punktmutationen führen aber zu einem Austausch innerhalb der Aminosäuresequenz. Da sich die Punktmutationen bei allen Klonen an den gleichen Positionen befinden und jeweils derselbe Basenaustausch stattgefunden hat, wurde davon ausgegangen, dass diese Mutationen bezüglich der Referenzsequenz nicht auf Fehler während der reversen Transkription der RNA bzw. auf Amplifikationsfehler in der PCR zurückzuführen sind. Der Sequenz wurde mithilfe spezifischer Primer die Sequenz für eine 5' terminale *Sapl*-Schnittstelle angefügt, was für die Ligation des gesamten L-ORF in den pT7-riboSM2-cLpro-Vektor notwendig ist. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des L-ORF wurde der L1-Fragment Klon 10 verwendet.

#### **Sequenzierungsergebnisse OROV-L2-Fragment in pCRII:**

Das OROV-L2-Fragment konnte aufgrund der Größe von 2575 bp zunächst nur unvollständig sequenziert werden, da eine Sequenzierreaktion lediglich ca. 1000 bp erfassen kann. Zwar wurde die cDNA des L2-Fragments mithilfe zweier Reaktionen in beiden Richtungen sequenziert, allerdings blieben im mittleren Teil des Fragments ca. 1175 bp unsequenziert. Dieser Bereich wurde mithilfe L2-spezifischer Primer sequenziert (vgl. Kap. 3.1.1.2). Die sequenzierten Anteile des Fragmentes entsprachen auch im Falle des OROV-L2-Fragments (2575 bp) nicht der des Referenzstammes NC\_005776. Es zeigten sich 14 Abweichungen in Form von Punktmutationen, die sich allerdings in allen Sequenzen an der gleichen Position befanden. Dies führt in der Aminosäuresequenz zum Austausch einer Aminosäure an drei Positionen. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des L-ORF wurde der L2-Fragment Klon 6 verwendet.

### **Sequenzierungsergebnisse OROV-L3-Fragment in pCRII:**

Die Klone wiesen insgesamt 15 Punktmutationen auf, die sich bei allen Klonen an den gleichen Stellen befanden. Ein Klon wies zwei Deletionen auf. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des L-ORF wurde der L3-Fragment-Klon 13 verwendet.

### **Sequenzierungsergebnisse OROV-L4mut-Fragment in pCRII:**

Die Sequenzierungsergebnisse zeigen, dass auch im Falle des OROV-L4mut-Fragments die Sequenz von keinem der drei Klone der Referenzsequenz NC\_005776 entsprach. Es zeigten sich in diesem Fall 15 Punktmutationen in allen Sequenzen an den gleichen Positionen, davon aber nur eine mit der Konsequenz eines Austausches in der Aminosäuresequenz. Des Weiteren enthielten die Sequenzen in fünf Fällen Deletionen, die sich jedoch als Sequenzierfehler herausstellten, da sie in der Gegenreaktion mit dem entsprechenden Forward- bzw. Reverse-Primer nicht mehr aufgetreten waren. Als Besonderheit in den Sequenzen zeigte sich die Mutation, die mithilfe des Reverse-Primers in der Absicht gesetzt wurde, die eine *SapI*-Schnittstelle an dieser Stelle zu zerstören und stattdessen eine *BsmBI*-Schnittstelle herzustellen. Es handelt sich hierbei um eine Punktmutation, bei der ein Adenosin gegen ein Cytosin getauscht wurde. Die Entfernung der Schnittstelle im L4-Fragment war notwendig, da der OROV-L-ORF mithilfe von *SapI*-Schnittstellen am 5'- und am 3'-Ende in den Vektor pT7riboSM2-clpro kloniert wurde und der L-ORF ansonsten im L4-Fragment auseinandergeschnitten worden wäre. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des L-ORF wurde der L4-Fragment-Klon 4 verwendet.

### **Sequenzierungsergebnisse OROV-L5-Fragment in pCRII:**

Wie die Sequenzierungsergebnisse zeigten, hatten die Sequenzen der sieben Klone 20 Abweichungen von der Referenzsequenz NC\_005776 in Form von Punktmutationen. In zwei Fällen hatten die Punktmutationen den Austausch einer Aminosäure im Protein zur Folge. Zwei Klone wiesen zusätzliche Punktmutationen auf, welche jedoch als stille Mutationen keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben sollten. Da die Sequenzen des L4- und L5-Fragments überlappend amplifiziert worden sind und in dem überlappenden Abschnitt, wie auch im L4-Fragment, die natürliche *SapI*-Schnittstelle vorhanden ist, musste diese auch im L5-Fragment entfernt werden. Diese wurde mithilfe des OROV-L5\_formut-Primers durch eine gesetzte Punktmutation entfernt (s. Sequenzierungsergebnisse OROV-L4-Fragment) und in eine *BsmBI*-Schnittstelle umgewandelt. Mithilfe des spezifischen L5-Reverse-Primers wurde 3'-terminal noch die Sequenz einer *SapI*-Schnittstelle angefügt, die für die Ligation des gesamten L-ORF in den Vektor pT7-riboSM2-clpro notwendig ist. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des L-ORF wurde der L5-Fragment-Klon 8 verwendet. Die anhand der Sequenzierungsergebnisse ausgewählten Plasmide wurden erneut in  $\text{INF}\alpha\text{F}'$ -kompetente Bakterien transformiert (vgl. Kap. 2.2.1), und diese wurden in 50 ml LB-Amp-Medium vermehrt (ÜNK). Aus den Bakteriensuspensionen wurde mithilfe von Midipräpara-

tionen (vgl. Kap. 2.2.4.2) die Plasmid-DNA isoliert, deren Konzentration im UV/VIS-Spektrometer (Nanodrop) bestimmt wurde (vgl. Kap. 2.2.15). Es folgte eine erneute Colony-PCR und ein Restriktionsverdau zur Überprüfung der Anwesenheit und der Orientierung des Inserts (OROV-L1-L5) im jeweiligen Plasmid.

### **3.1.1.2 Klonierung des L-ORF in den Expressionsvektor pl. 18**

Nachdem die Einzelfragmente des OROV-L-ORF amplifiziert und jeweils erfolgreich in den T-Vektor pCRII kloniert worden waren, erfolgte die Klonierung des vollständigen L-ORF in den eukaryontischen Expressionsvektor pl. 18. Dabei wurden die Fragmente L1 bis L5 mithilfe singulärer Restriktionsschnittstellen zum vollständigen OROV-L-ORF zusammengefügt (vgl. Kap. 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7).

Zunächst wurden das L2- und das L3-Fragment in den Vektor pUC19mut umkloniert. In einem weiteren Schritt wurde nun eine *Pst*I-Schnittstelle im pUC19mut-OROV-L3 Vektor mithilfe eines *Pst*I-Verdau und anschließender Blunt-end-Ligation mittels T7-Polymerase (vgl. Kap. 2.2.7.1) entfernt. Dies war notwendig, da das L1-Fragment über einen *Pst*I-Verdau in den pUC19mut-OROV-L2/L3 eingefügt wurde und der Vektor ansonsten an einer weiteren Stelle unerwünscht geschnitten worden wäre. Über einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Esp*3I wurde dann das L3-Fragment aus dem pUC19mut-OROV-L3-Vektor geschnitten. Das Plasmid pUC19mut-OROV-L2 wurde an der *Esp*3I-Schnittstelle im L2-Fragment und einer weiteren nachfolgenden *Esp*3I-Schnittstelle geschnitten, sodass ein kleines DNA-Fragment, das auch die *Pst*I-Schnittstelle mitbeinhaltete, herausgeschnitten wurde. Das L3-Fragment wurde nun in den pUC19mut-OROV-L2 ligiert, und damit wurde das L2- und L3-Fragment über die *Esp*3I-Schnittstellen unter gleichzeitiger Entfernung dieser Schnittstellen zusammengefügt. Nun wurde das L1-Fragment aus pCRII-OROV-L1 mithilfe eines *Hind*III/*Pst*I-Verdau herausgeschnitten und in den *Hind*III/*Pst*I-geschnittenen pUC19mut-OROV-L2/L3 ligiert. Parallel dazu wurde das L5-Fragment mittels *Esp*3I und *Xho*I aus dem pCRII-OROV-L5 geschnitten und in den pCRII-OROV-L4-Vektor ligiert. Die L4- und L5-Fragmente wurden dabei über eine *Esp*3I-Schnittstelle zusammengefügt. Nun wurde mithilfe eines *Bam*HI und *Xho*I-Verdau zum einen das L4/L5-Fragment aus dem Plasmid pCRII-OROV-L4/L5 geschnitten, zum anderen eine modifizierte Variante des pl.18-Expressionsvektors (pl.18mod) linearisiert. Bei dieser Modifikation war zuvor eine *Bst*AP1-Schnittstelle entfernt worden. Dies war notwendig, da das L3-Fragment mit dem L4-Fragment über eine solche Schnittstelle zusammengefügt wurde. Das L4/L5-Fragment wurde dann in pl.18mod ligiert. Das erhaltene Plasmid pl.18mod-OROV-L4/L5 wurde nun mit *Bam*HI und *Bst*AP1 linearisiert. Das L1/L2/L3-Fragment wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Bst*AP1 aus dem Plasmid pUC19mut-L1/L2/L3 geschnitten und in den *Bam*HI/*Bst*AP1-geschnittenen pl.18mod-OROV-L4/L5 ligiert. Dabei wurden das L1/L2/L3- und das L4/L5-Fragment über die *Bst*AP1-Schnittstelle zusammengefügt. Damit war der vollständige OROV-L-ORF rekonstituiert und

lag nun in exprimierbarer Form im Expressionsvektor pI.18mod-OROV-L-ORF vor. In Abbildung 17 ist der Ablauf der Klonierung noch einmal schematisch dargestellt:

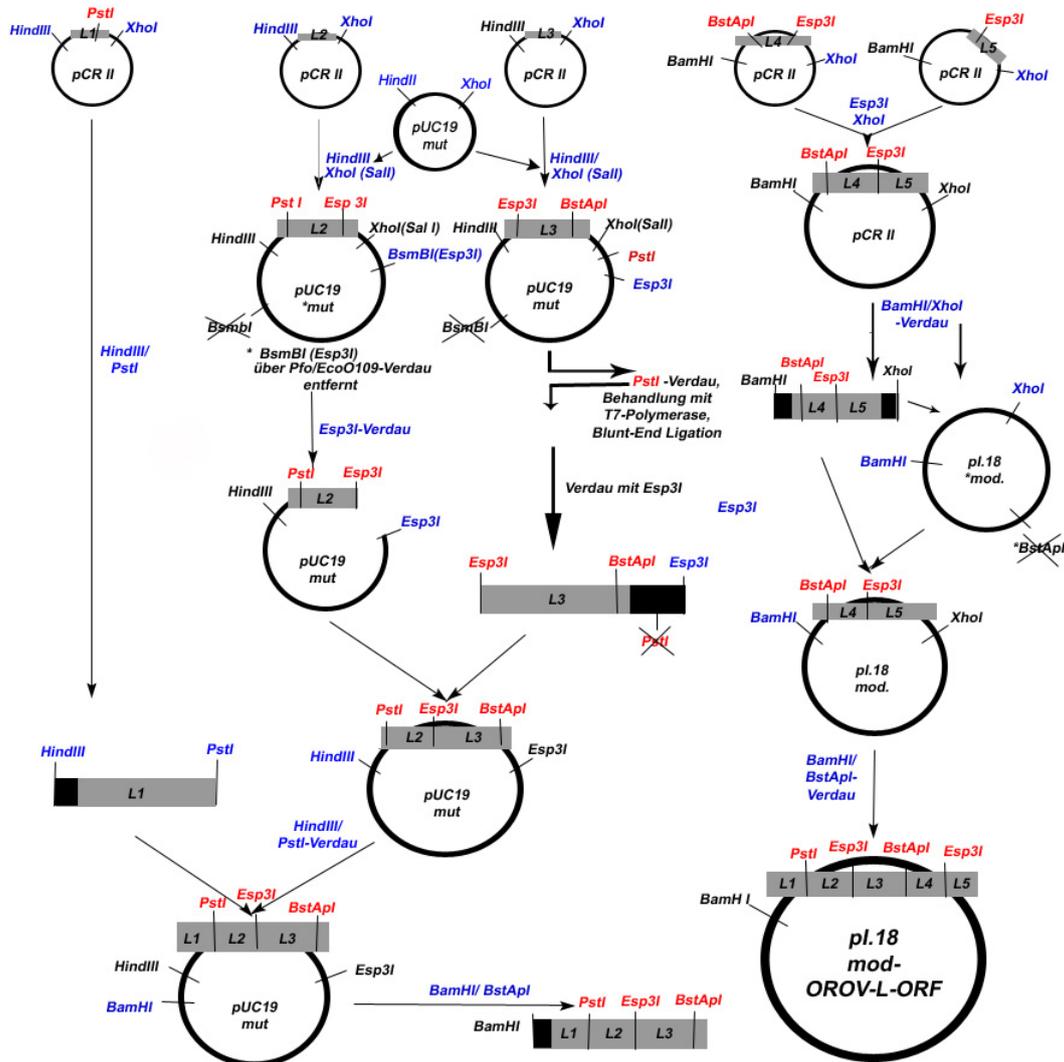


Abbildung 17: Die Klonierung des Expressionsvektors pI.18-OROV-L-ORF

Im Folgenden wurden zur Überprüfung der Übergänge der L-Fragmente mithilfe spezifischer Primer weitere Sequenzierungen vorgenommen. Auch die Anteile des L-Segments, die noch nicht vollständig sequenziert waren, wurden dabei erfasst. Dabei wurden alle Bereiche des L-Segments mindestens zweimal sequenziert. Es wurden folgende Primer verwendet:

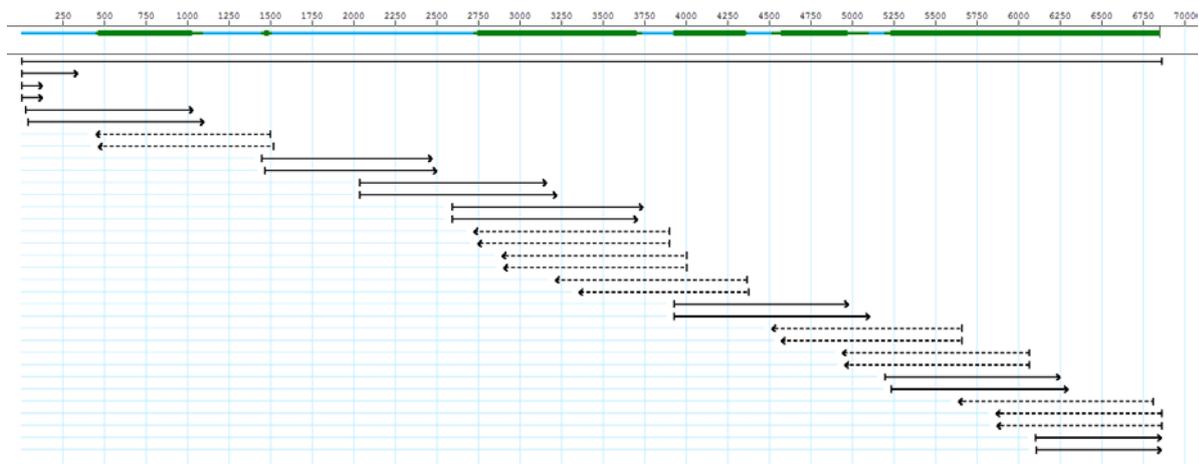
pI.18_for	TCCATGGGTCTTTTCTGCGAG
pI.18_rev	CAGGCGTGACACGTTTATTG
OROV-L1_for_sapi	GACAGAGCTCTTCAATGTCACAACCTGTTGCTCAACCA
OROV-L1_rev	TCATTGATGCATTGCCAGTATTTAGT
OROV-L2_rev	ATTCCGCACATCTCTACTGG
OROV-L_PWfor1	AGCAGTTTCCAGCCATGTAAGAGA
OROV-L_PWrev1	TTCGTTTGTCTTGTCCTCATCTGC
OROV-L_PWfor2	CATGCATTAAGATTGGTGATTTTG
OROV-L_PWrev2	TCCAGTGATTTAGAGCGATAGATA

```

OROV-L3_for      GAATACTAGAAAGTGATTTATCAACAATTG
OROV-L3_rev     ATCAATTTGTCATCTTCCCCAGTG
OROV-L4_formut2 GGGGCACTGACAGGTAACCTTGATAAAT
OROV-L4_revmut  TGAAAATGTGCTCGTCTCGTGATGG
OROV-L5_formut  GCCATCACGAGACGAGCACATTTT
OROV-L5_rev_sapi GACAGAGCTTTCCTTAGAAGTCAAATTTGGATTTGCCA

```

Zur Herstellung der Primer mit Ausnahme von pl.18\_for und pl.18\_rev wurde auf die OROV-L-Sequenz NC\_005776 aus GenBank zurückgegriffen. Der vollständig sequenzierte OROV-L-ORF im Vergleich zur GenBank Referenzsequenz NC\_005776 ist im Anhang unter 7.1 aufgeführt.



**Abbildung 18: Die Sequenzierungen der vollständigen cDNA des OROV L-ORF**

Die hellblau markierten Abschnitte der Sequenz wurden mehrfach in gleicher Richtung sequenziert; die grün markierten Abschnitte wurden mehr als zweimal und in beiden Richtungen sequenziert.

Die Sequenzierung ergab, dass bezüglich der Rekonstitution des OROV-L-ORF keine Fehler beim Zusammenfügen der L-Fragmente aufgetreten waren. Im Vergleich zu der in GenBank verfügbaren OROV-L-Sequenz (NC\_005776) fällt neben den bereits bei der Sequenzierung der L-Fragmente gefundenen Punktmutationen das Vorhandensein von sechs zusätzlichen Nucleotiden im Bereich von nt 2360 bis 2410 des L-ORF auf. Weiterhin besitzt der klonierte OROV-L-ORF eine Insertion (A) an nt-Position 2550 sowie eine Deletion (A) an nt-Position 2572 im Vergleich zur Referenzsequenz. Beide Änderungen führen in den entsprechenden Bereichen zu einer abweichenden AS-Sequenz (s. Abbildung 19).

```

Majority          RDLKSIWFPGKVNKEYLNQIYLPFYFNSKGLHEKHHVLIDLAKTVLEIEKEQRESLPEPWSEIPAKQTVSLNVLIIYSLA
OROV-L_NC_005776  RDLKSIWFPGKVNKEYLNQIYLPFYFNSKGLHEKHHVLIDLAKTVLEIEKEQRESLPEPWSEIPAKR[ ]LSLNVLIYSLQ 2401
OROV-L_own_sequencing RDLKSIWFPGKVNKEYLNQIYLPFYFNSKGLHEKHHVLIDLAKTVLEIEKEQRESLPEPWSEIPAK[QTVN]LNVLIIYS[LA] 2401

Majority          RELNLDTSRHNFRSRVENANNFNRSITTIISTFTSSKSCIKIGDFEEEKKEKLNITKKLAKDISKLTIANPAFLDEITN
OROV-L_NC_005776  [ ]ELNLDTSRHNFRSRVENANNFNRSITTIISTFTSSKSCIKIGDFEEEKREKLRMIQKKLAKDISKLTIANPAFLDEITN 2642
OROV-L_own_sequencing [R]LNLDTSRHNFRSRVENANNFNRSITTIISTFTSSKSCIKIGDFEEEK[KK][KND]KKLAKDISKLTIANPAFLDEITN 2642

```

**Abbildung 19: Abweichungen in der Aminosäuresequenz im OROV-L-ORF**

Ermittelte Insertionen und Deletionen im OROV-L-ORF. OROV-L\_NC\_00576 entspricht dem GenBank-Eintrag NC\_005776, OROV-L\_own\_sequencing der selbst ermittelten Sequenz. Die Nummerierung bezieht sich auf die zugrunde liegende Nukleotidsequenz des OROV-L-ORF.

### 3.1.1.3 Klonierung der OROV-M-ORF cDNA-Fragmente

Der OROV-M-ORF wurde aufgrund seiner Größe (4385 Basen) analog dem L-ORF in einzelnen Fragmenten (M1 bis M3) kloniert. Auch in diesem Fall wurden die Primer so konstruiert, dass sich die einzelnen Fragmente am 5'- und 3'-Ende um einige Basenpaare überlappen. Die sich überlappenden Regionen weisen eine singuläre Schnittstelle für ein Restriktionsenzym auf, damit eine Ligation zum vollständigen OROV-M-ORF erfolgen kann.

Am 5'- und am 3'-Ende der cDNA des M-ORF, also am 5'-Ende des M1- und am 3'-Ende des M3-Fragmentes wurde, wie auch beim L-ORF jeweils die Sequenz einer *SapI*-Schnittstelle angefügt, um die cDNA des gesamten ORF später über einen Restriktionsverdau mit *SapI* und anschließende Ligation in den Vektor pT7-riboSM2-cMpro klonieren zu können.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der cDNA der M-Fragmente**

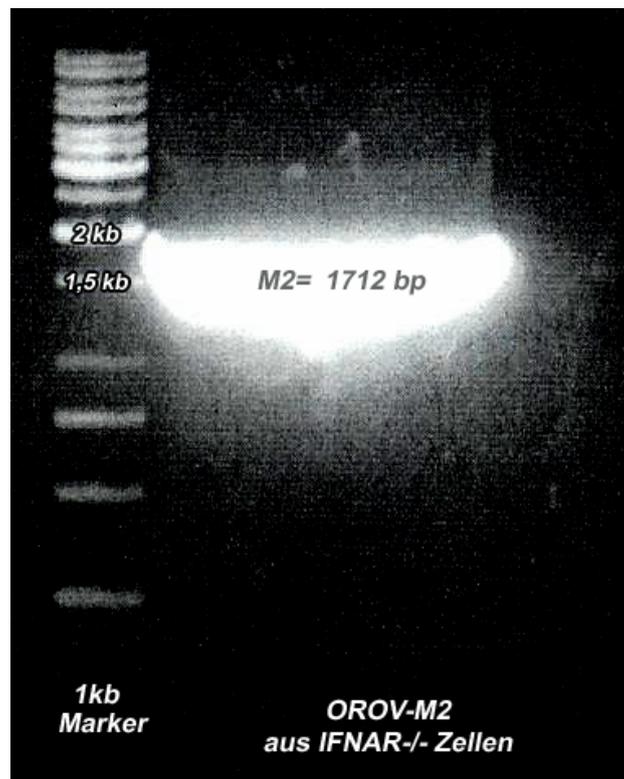
Die cDNA des OROV-M ORF wurde analog dem OROV-L ORF mithilfe von sechs spezifischen Primern in drei (OROV-M1-M3) sich überlappenden Fragmenten amplifiziert. Am 5'-Ende des M1-Fragmentes und am 3'-Ende des M3-Fragmentes wurde mithilfe der Primer jeweils die Sequenz einer *SapI*-Schnittstelle angefügt, über die der vollständige ORF-M-ORF im letzten Schritt geschnitten und in den Rescuevektor pT7-riboSM2-cMpro ligiert werden konnte.

Für die Herstellung der Primer für die Amplifikation des OROV-M-ORF wurde auf Sequenzen aus GenBank (NC\_005775) zurückgegriffen. Zur Amplifikation der Fragmente wurden folgende Primer verwendet:

OROV-M1_for	GACAGAGCTCTTCAATGGCGAATTTAATAATTA
OROV-M1_rev	ATTCTGTCTTGTAAGTATTCT
OROV-M2_for	AGATAATGGGCGATACTTGTGT
OROV-M2_rev	ATCTAATTCTGGGCGTATGACA
OROV-M3_for	TATTGAACACAACGAAAGATGC
OROV-M3_rev	GACAGAGCTCTTCACTACTTGATTTTCTGCTCCATGGC

Zunächst wurde die RNA, wie schon beim L-Segment beschrieben, aus OROV-infizierten IF-NAR/- Zellen isoliert und mithilfe der Superscript-III-Reversen-Transkriptase (Invitrogen) und Random-Hexamer-Primern (Amersham, Biosciences) in cDNA umgeschrieben (vgl. Kap.

2.2.16). Die Amplifikation der OROV-M1- bis -M3-Sequenzen erfolgte aus der cDNA unter Verwendung der Pfu-Polymerase (PfuUltra FusionHD, Stratagene), nachdem die Amplifikation mit Pfx-Polymerase (Invitrogen) fehlgeschlagen war. Bei PfuUltra FusionHD handelt es sich um ein Fusionsprotein aus einer thermostabilen Polymerase mit Proofreading-Aktivität und ein dsDNA-Bindeprotein, die eine erhöhte Affinität zu dsDNA sowie eine höheren Prozessivität besitzen. Abbildung 21 zeigt exemplarisch das amplifizierte OROV-M2-Fragment nach präparativer Gelelektrophorese. Da durch die Amplifikation mit Pfu-Polymerase PCR-Fragmente mit glatten Enden entstehen, wurde das Amplifikat mit Taq-Polymerase (1 U) inkubiert. Dadurch wurden A-Nukleotide an die 3'-Enden der M-Fragmente gehängt, was für die nachfolgende TA-Klonierung notwendig war (vgl. Kap. 2.2.7.1).

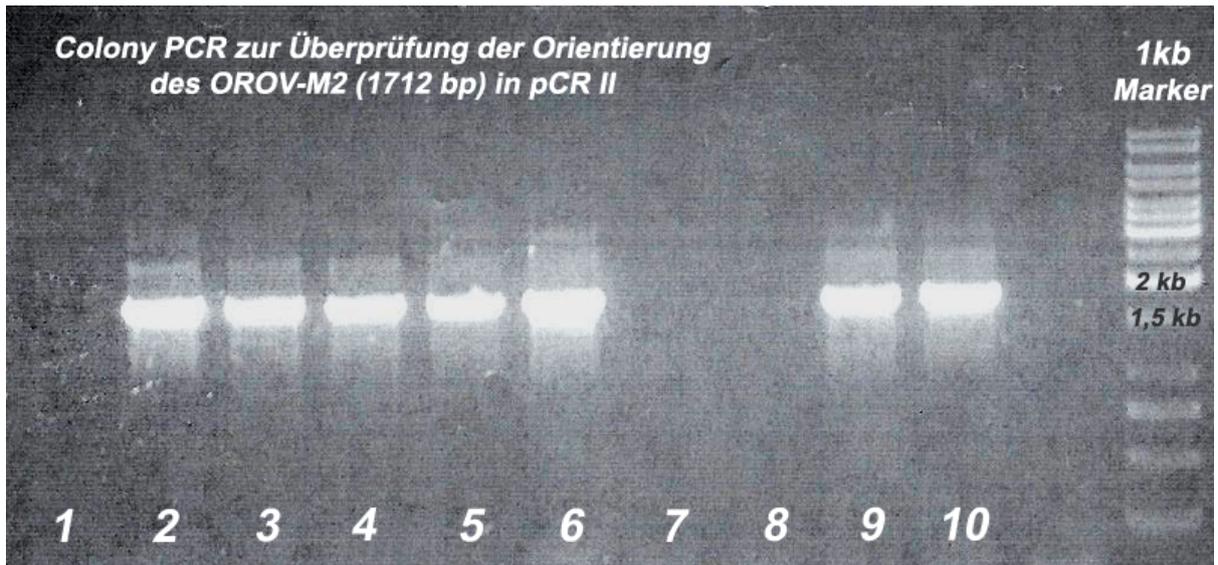


**Abbildung 21: Präparative Agarosegel-Elektrophorese des M2-Fragmentes**

Das Gelbild zeigt eine Bande bei ca. 1700 bp. Dies entspricht der Größe des M2-Fragmentes, welches mithilfe der PfuUltra-FusionHD-Polymerase (Stratagene) und den M2-spezifischen Primern aus cDNA amplifiziert wurde.

Die M-Fragmente wurden in den T-Vektor pCRII ligiert und anschließend in  $IN\alpha F'$ -kompetente Bakterien transformiert (vgl. Kap. 2.2.2). Zur Erfolgskontrolle der Ligation der M1, M2 und M3-Fragmente wurde ein Blau-Weiß-Screening durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.3).

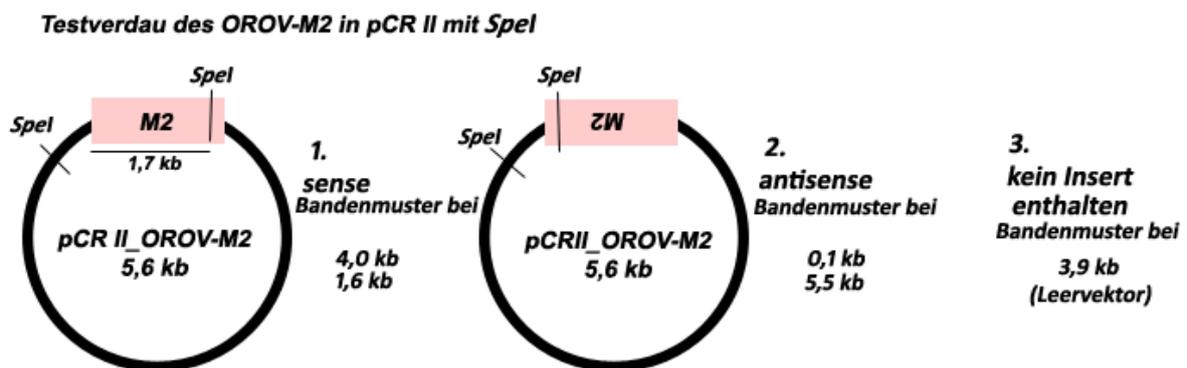
Zur Überprüfung der Anwesenheit und Orientierung des Inserts wurden Colony-PCRs durchgeführt. Zur Überprüfung der Anwesenheit des Fragmentes im Vektor wurden die M13-for- und M13-rev-Primer eingesetzt (Abbildung 11), zur Überprüfung der *sense*-Orientierung wurden die Primer M13\_for sowie der Forward-Primer des jeweiligen M-Fragmentes verwendet.



**Abbildung 22: Agarosegel-Elektrophorese: OROV-M2 in pCRII**

Agarosegel-Elektrophorese nach Colony-PCR unter Verwendung der Primer M13\_for und OROV-M2\_for zur Überprüfung der Orientierung des M2-Fragmentes in pCRII. Bei den Klonen 2 bis 6 sowie 9 und 10 zeigte sich eine Bande bei ca. 1700 kb, was der Größe des M2-Fragmentes entspricht. Damit enthalten diese Klone Plasmide, bei denen das M2-Fragment in sense-Orientierung vorliegt.

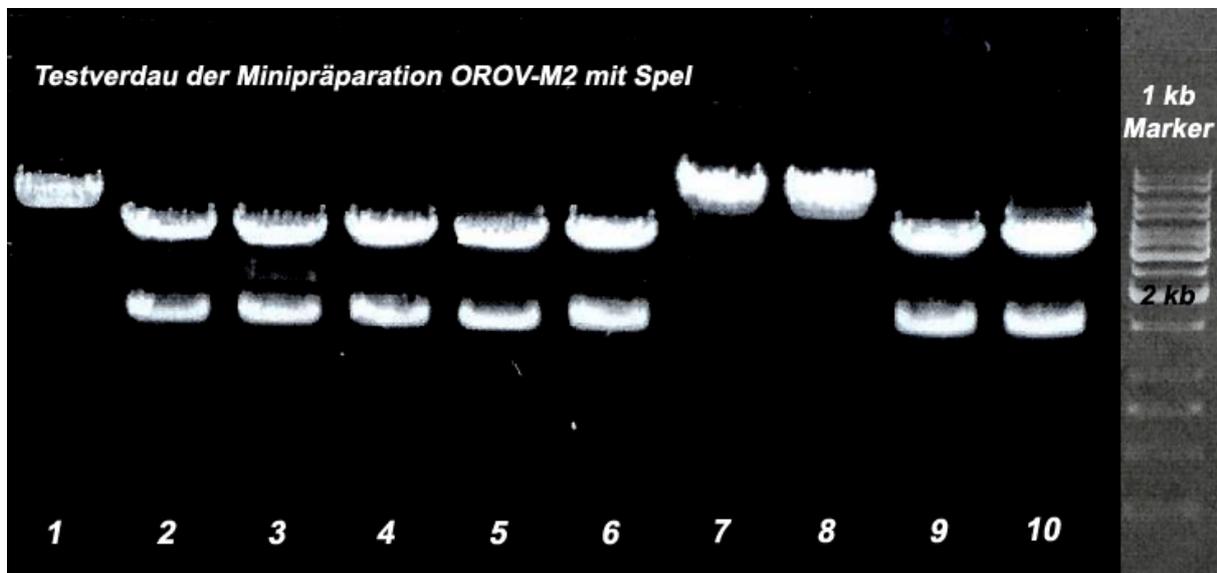
Parallel wurden die Klone, die das M-Fragment enthielten, angezüchtet und die Plasmid-DNA über Minipräparationen (vgl. Kap. 2.2.4) isoliert. Die isolierte Plasmid DNA wurde zur erneuten Kontrolle auf Anwesenheit und Orientierung der M-Fragmente im pCRII-Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut (vgl. Kap. 2.2.5). Der hier exemplarisch dargestellte Restriktionsverdau des OROV-M2-Fragmentes wurde mit dem Restriktionsenzym *SpeI* durchgeführt.



**Abbildung 23: Schematische Darstellung des *SpeI*-Testverdaus des OROV-M2-Fragmentes**

Zur Bestimmung der Orientierung des OROV-M2-Fragmentes im Vektor wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *SpeI* durchgeführt. Da sowohl der pCRII-Vektor in der MCS als auch das M2-Fragment am 3'-Ende eine *SpeI*-Schnittstelle besitzt, entstehen nach *SpeI*-Verdau je nach Orientierung des M2-Fragmentes im Vektor unterschiedliche Bandenmuster im Gelbild. Im Falle einer sense-Orientierung zum SP6-Promotor des OROV-M2-Fragmentes entstehen Fragmente von 4 kb und 1,6 kb Größe. Im Falle einer antisense-Ausrichtung zum SP6-

Promotor erhält man ein Bandenmuster der Größe 0,1 kb bzw. 5,5 kb. Ist gar kein Insert enthalten, so wird sich eine Bande im Gelbild bei 3,9 kb zeigen, was der Größe des linearisierten Ausgangsplasmids pCRII entspricht.



**Abbildung 24: Agarosegel-Elektrophorese des Testverdau von pCRII-OROV-M2 mit SpeI**

Bei den Klonen 2 bis 6 sowie 9 und 10 liegt das M2-Fragment in sense-Orientierung (Banden bei 4 kb und 1,6 kb) im Vektor vor. Bei den Klonen 1, 7 und 8 liegt das M2-Fragment in antisense-Orientierung (Banden bei 5,5 kb) im Vektor vor. Die zweite Bande ist mit 0,1 kb sehr klein und im Gelbild nicht nachweisbar.

Die Plasmide aus den Minipräparationen, die das jeweilige OROV-M Fragment als Insert enthielten, wurden zur Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab in Göttingen (s. Kap. 2.2.12).

#### **Sequenzierungsergebnisse OROV-M1-Fragment in pCRII:**

Die Sequenzierungsergebnisse des OROV-M1-Fragmentes (1700 Basen) zeigen 46 Abweichungen in den Sequenzen der sechs Klone von dem entsprechenden Sequenzabschnitt der M-Segment-Referenzsequenz NC\_005775. Bei den Abweichungen handelt es sich um Punktmutationen. In fünf Fällen führen die Mutationen zu einem Austausch in der Aminosäuresequenz. Im Falle der M1-Sequenzen ist eine Lücke von ca. 70 Nukleotiden (Position 830–900) zu vermerken, die noch nicht sequenziert worden ist. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des M-ORF wurde der M1-Fragment-Klon 1 verwendet.

#### **Sequenzierungsergebnisse OROV-M2-Fragment in pCRII:**

Die Sequenzierungsergebnisse des M2-Fragmentes (1712 Basen) zeigen 30 Abweichungen in den Sequenzen der sechs Klone in Form von Punktmutationen von der Referenzsequenz NC\_005775. Acht der 30 Abweichungen wirken sich auf Aminosäure-Ebene in Form eines Aminosäureaustausches aus. Die Klone mit dem M2-Fragment wurden in zwei Ansätzen mit einem Forward- und einem Reverse-Primer sequenziert. Im Falle der M2-Sequenzen ist eine Lücke

von ca. 200 Nukleotiden (Position 2311–2510) zu vermerken, die noch nicht sequenziert worden ist. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des M-ORF wurde der M2-Fragment-Klon 6 verwendet.

#### **Sequenzierungsergebnisse OROV-M3-Fragment in pCRII:**

Die Sequenzierungsergebnisse des M3-Fragmentes (1198 Basen) zeigen, dass die Sequenzen der fünf Klone 24 Abweichungen von der Referenzsequenz NC\_005775 aufweisen. Diese zeigen sich bei allen Sequenzen an der gleichen Stelle. In fünf Fällen wirken sich die Mutationen als Austausch in der AS-Sequenz aus. Das M3-Fragment ist vollständig sequenziert worden. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Rekonstitution des M-ORF wurde der M3-Fragment-Klon 7 verwendet.

Der vollständig sequenzierte OROV-M-ORF im Vergleich zur GenBank Referenzsequenz NC\_005775 ist im Anhang unter 7.2 aufgeführt.

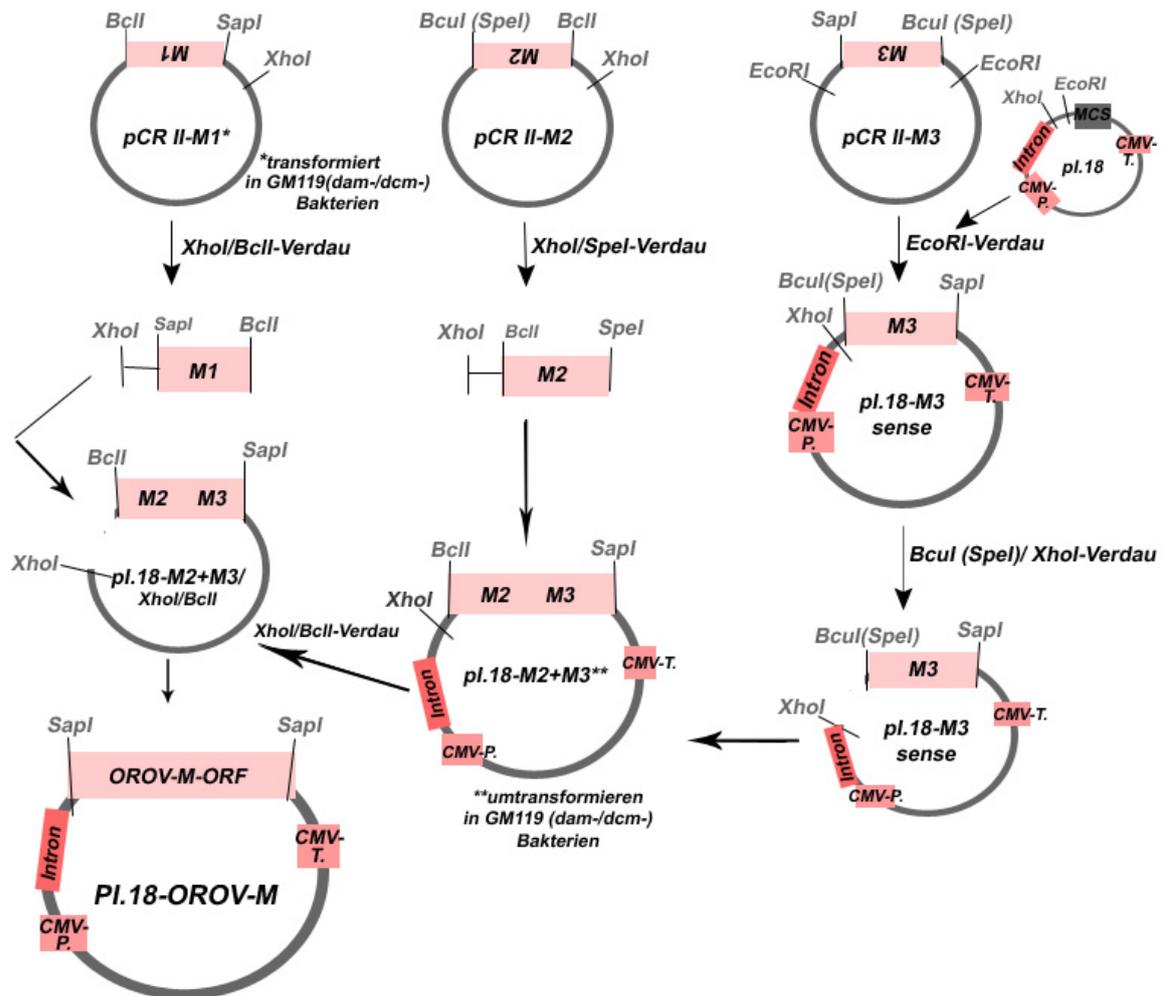
Zur Klonierung in den Expressionsvektor pl.18 zur Herstellung des vollständigen M-ORF wurden Klone verwendet, bei denen der pCRII-Vektor die M-Fragmente in *antisense*-Orientierung zum SP6-Promotor enthielt.

Die Plasmide der ausgewählten Klone wurden erneut in INF $\alpha$ F<sup>-</sup>-kompetente Bakterien transformiert und zum Zweck einer Midipräparation ÜNKs angefertigt (vgl. Kap. 2.2.4.2).

#### **3.1.1.4 Klonierung des M-ORF in den Expressionsvektor pl.18**

Nach erfolgreicher Klonierung der OROV-M1-, -M2- und -M3-Fragmente in den T-Vektor pCRII wurden die einzelnen M-Fragmente mithilfe der in Kapitel 3.1.2.2 aufgeführten Restriktionsenzyme geschnitten und in den eukaryontischen Expressionsvektor pl.18 kloniert. Dabei wurden die Einzelfragmente zum vollständigen M-ORF zusammengefügt. Vorbereitend musste der Vektor pCRII-OROV-M1 zunächst in den *dam-/dcm*-(*deficient in adenine/cytosine methylation*-)Bakterienstamm *E. coli* GM119 transformiert werden.

Das ist eine Voraussetzung für den Verdau mit dem Restriktionsenzym *BclI*, da dieses nach überlappender *Dam*-Methylierung seine Erkennungssequenz (TGATCA) nicht schneidet. Aus demselben Grund musste auch in einem späteren Schritt der pl.18-M2+M3-Vektor vor dem Verdau mit *BclI* in GM119-Bakterienzellen transformiert werden.



**Abbildung 25: Klonierung des pi.18-OROV-M-ORF**

CMV-P. = CMV-Promotor, CMV-T. = CMV-Terminator.

### 3.1.1.5 Klonierung der OROV-S-ORF-cDNA

Zunächst wurde wie bei der Herstellung des M- und L-ORF OROV-RNA aus virusinfizierten IFNAR-/--Zellen isoliert, die mit Superscript III (Invitrogen) und Random-Hexamer-Primern (Amersham Biosciences) in cDNA umgeschrieben wurde (vgl. Kap. 2.2.16). Diese cDNA diente als Template für die Amplifikation des S-ORF.

Im Gegensatz zu den OROV-M- und OROV-L-ORF wurde der S-ORF an einem Stück amplifiziert. Dies war möglich, da das S-Segment des OROV mit 755 Basen für die fehlerfreie Amplifikation mittels PCR nicht zu groß ist. Die Amplifikation erfolgte mithilfe der Pfx-Polymerase (Invitrogen). Da die Amplifikation mit Pfx-Polymerase Fragmente mit glatten Enden erzeugt, wurde der PCR-Ansatz im Anschluss mit Taq-Polymerase (1 U, Eppendorf) inkubiert, um das Anhängen des A-Nukleotids zu erreichen, was für die anschließende TA-Klonierung (vgl. Kap. 2.2.7.1) notwendig ist.

Für die Klonierung in den Vektor pT7-riboSM2 wurden mithilfe der Amplifikationsprimer am 5'- und am 3'-Ende Sequenzen für *SapI*-Schnittstellen angefügt. Für die Herstellung der Primer des OROV-S-ORF wurde auf Sequenzen aus GenBank (NC\_005777) zurückgegriffen. Es wurden folgende Primer verwendet:

OROV-S_for_sapi	GACAGAGCTCTTCAATGTCAGAGTTCATTTTCAA
OROV-S_rev_sapi	GACAGAGCTCTTCACTATATGTCAATTCCGAAT

Der S-ORF wurde nach erfolgreicher Amplifikation in den T-Vektor pCRII ligiert (vgl. Kap. 2.2.7.1) und in kompetente *INF $\alpha$ F'*-Bakterien transformiert (vgl. Kap. 2.2.2). Zur Erfolgskontrolle auf Anwesenheit des Plasmids im Bakterienklon wurde ein Blau-Weiß-Screening durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.3).

Um zu überprüfen, ob bzw. in welcher Orientierung der S-ORF im pCRII enthalten ist, wurde eine Colony-PCR durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.8). Eine Überprüfung der Anwesenheit des Inserts im pCRII-Vektor erfolgte mithilfe des Primerpaars M13\_for und M13\_rev (s. Abbildung 18:). Zur Überprüfung der *sense*-Orientierung des S-Fragmentes im Vektor wurde der M13\_for-Primer und der OROV-S\_for\_sapi Primer verwendet.

Aus den Klonen, die Plasmide mit dem S-Fragment enthielten, wurden ÜNKs angefertigt. Aus den Bakteriensuspensionen wurde die Plasmid-DNA mithilfe von Minipräparationen isoliert (vgl. Kap. 2.2.4). Die Minipräparationen wurden zur Kontrolle des Ligationserfolges mithilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xho*I (vgl. Kap. 2.2.5) verdaut. Die Schnittstellen dieser Restriktionsenzyme befinden sich in der MCS des pCRII, in die der S-ORF ligiert wurde. Anhand des spezifischen Restriktionsmusters konnten nach Agarosegel-Elektrophorese Banden in der Größe von ca. 750 bp und damit die Anwesenheit des S-ORF im pCRII nachgewiesen werden.

Die Proben, in denen Plasmide mit dem S-Fragment enthalten waren, wurden zur Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab in Göttingen (s. Kap. 2.2.12).

### **Sequenzierungsergebnisse OROV-S-ORF-Sequenz in pCRII:**

Der vollständig sequenzierte OROV-S-ORF im Vergleich zur GenBank Referenzsequenz NC\_005777 ist im Anhang unter 7.3 aufgeführt.

Es zeigten sich 13 Abweichungen in Form von Punktmutationen im Vergleich zur Referenzsequenz OROV-S NC\_005777. Hierbei handelt es sich um stille Mutationen, die keinen Aminosäureaustausch auf Proteinebene zur Folge haben und damit auch keinen Einfluss auf die Expression des Nukleoproteins oder des NSs-Proteins haben sollten. Des Weiteren zeigen sich in zwei der Klone eine Punktmutation und eine Deletion, die aber nur bei der Sequenzie-

rung mit dem M13\_for, nicht aber bei der Sequenzierung mit dem M13\_rev Primer auftrafen. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Sequenzierfehler handelte. Für die weiteren Klonierungsarbeiten wurde der Klon 3 verwendet. Das entsprechende Plasmid wurde erneut transformiert, und die transformierten Bakterien wurden zum Zweck einer Midipräparation angezüchtet (vgl. Kap. 2.2.4.2). Die Plasmide der Midi-Präparationen wurden durch eine weitere PCR-Kontrolle auf Anwesenheit des S-ORF untersucht. Im Anschluss erfolgte die Klonierung des S-ORF in den eukaryontischen Expressionsvektor pl.18.

### **3.1.1.6 Subklonierung des OROV-S-ORF in den Expressionsvektor pl.18**

Der OROV-S-ORF wurde in den eukaryontischen Expressionsvektor pl.18 kloniert. Hierfür wurde die S-ORF-Sequenz mithilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xho*I aus pCRII-OROVS geschnitten (vgl. Kap. 2.2.5) und in den Expressionsvektor pl.18, der zuvor mit *Bam*HI und *Xho*I linearisiert worden war, ligiert (vgl. Kap. 2.2.7.2). Es entstand das Expressionsplasmid pl.18-OROVS-ORF.

### **3.1.2 Herstellung der Rescuevektoren**

Die regulatorischen NTR(*non-translated region*)-Sequenzen für das OROV-L-, -M- und -S-Segment in antigenomischer Orientierung wurden nicht direkt aus der cDNA virusinfizierter Zellen amplifiziert, da das Umschreiben der viralen Gesamt-RNA zu cDNA unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern (vgl. Kap. 2.2.16) erfolgte. Durch die zufällige Anordnung der Nukleotide der Random-Hexamer-Primer sind bei Verwendung dieser Primer für die reverse Transkription die passenden Oligonukleotide für die Sequenzen der 3'-Enden der genomischen bzw. der antigenomischen viralen RNA unterrepräsentiert. Dies hat zur Folge, dass sich im Falle von Fehlpaarungen diese im Verlauf von Umschreibung und Amplifikation unter Umständen leichter durchsetzen können, sodass es zum ungewollten Einfügen von Mutationen kommen kann. Zudem stellt die virale RNA aus infizierten Zellen ein Gemisch aus viraler mRNA (die keine NTRs besitzt), genomischer und antigenomischer RNA dar, d.h., nur ein Teil der viralen RNA besitzt die zu amplifizierenden nicht codierenden Enden.

Um fehlerfreie NTR-Sequenzen der antigenomischen Segmente herzustellen, wurden sie als eine Gesamtsequenz aus sich überlappenden Primern, die gleichzeitig als Matrize dienen, in einem PCR-Ansatz hergestellt. Für die Herstellung dieser Primer wurde auf die entsprechenden OROV-Referenzsequenzen (NC\_005776) aus GenBank zurückgegriffen.

Die 5'-NTR- und 3'-NTR-Sequenzen der verschiedenen antigenomischen Segmente wurden durch einen kurzen Linker separiert, der über *Sap*I-Schnittstellen das basengenaue Einfügen der OROV-ORF-cDNA des L-, M- und S-Segments erlaubt. Die Abfolge aus 5'-NTR, *Sap*I-Linker und 3'-NTR wird im Folgenden als cLpro, cMpro und cSpro bezeichnet.

### 3.1.2.1 Der Rescuevektor pT7-riboSM2-OROV-cL

Die PCR zur Amplifikation der cLpro-Sequenz wurde mithilfe der Pfx-Polymerase (Invitrogen) (s. Kap. 2.2.8) und sechs spezifischer Primer durchgeführt, die gleichzeitig auch als Matrize dienten. Bei der Herstellung der Primer wurde auf die OROV-L-Referenzsequenz aus GenBank (NC\_005776) zurückgegriffen. Es wurden folgende Primer verwendet:

```

OROV-cL-pro1_for      5´ GACAGACGTCTCCTATAGAGTAGTGTGCTCCTATTCCG 3´
OROV-cL-pro2_rev     5´ TTTTGAGATTGTTTTTGTGTTTTCGGAATAGGAGCACAC 3´
OROV-cL-pro3_for     5´ AAACAATCTCAAATGTGAAGAGCGGTACCGCTCTTCA 3´
OROV-cLpro4_rev     5´ TACTTTTACATGTGTATAACCTTATGAAGAGCGGTACCG 3´
OROV-cLpro5_for     5´ ACACATGTAAAAGTAGTGTGTTGTTTCTAAATAGGAGCACA 3´
OROV-cLpro6_rev     5´ TCTGTCCGTCTCCACCCAGTAGTGTGCTCCTATTTAG 3´

```

```

          Esp3I          5´NTR          SapI  KpnI
GACAGACGTCTCC | TATA | GAgtagtgctcctattccgaaacaaacaaaacaatctcaa | ATG | TGAAGAGCGGTACCG
CTGTCTGCAGAGG | ATAT | Ctcacacacgaggataaggctttgtttgtttttgtagagttt | TAC | ACTTCTCGCCATGGC

SapI          3´NTR          Esp3I
CTCTTCA | TAA | ggtatacacatgtaaaagtagtgttgtttctaaataggagcaca | ctact | GGGT | GGAGACGGACAGA
GAGAAGT | ATT | ccatatgtgtacattttcatcacaacaaagatttatcctcgtgtgatga | CCCA | CCTCTGCCTGTCT

```

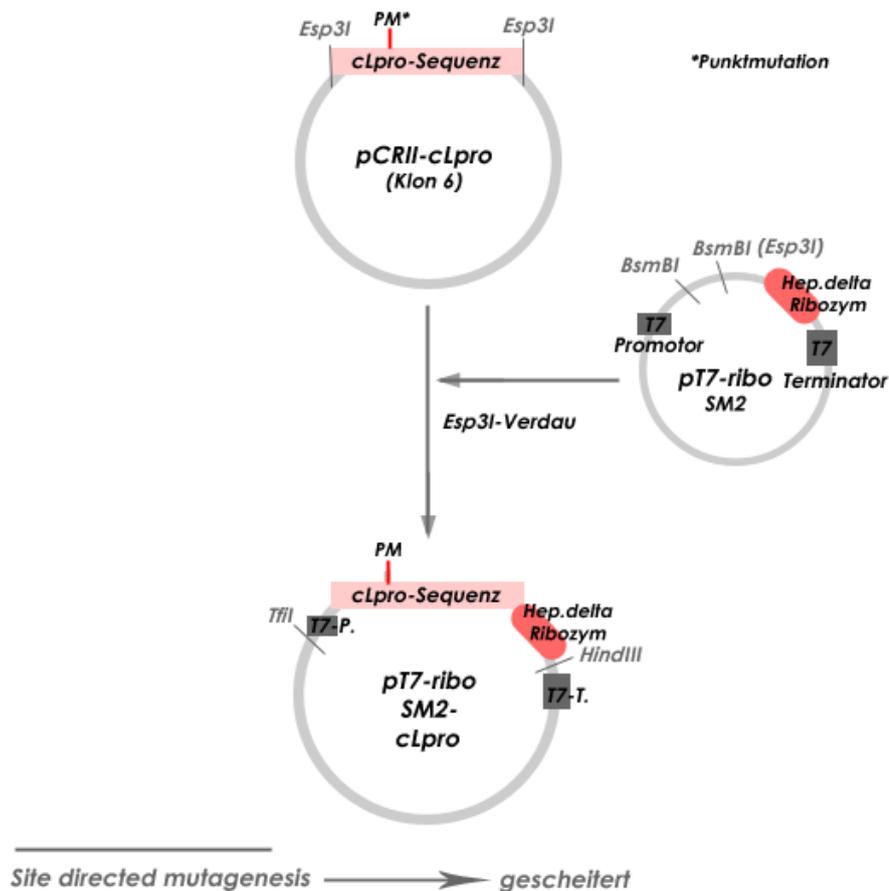
**Abbildung 26: Sich überlappende Primer OROV-cL-pro1\_for bis OROV-cL-pro6\_rev zur Herstellung der cLpro-Sequenz**

Es wurden zunächst drei PCR-Ansätze vorbereitet. Im ersten Ansatz wurden das Primerpaar OROV-cL-pro1\_for und OROV-cL-pro2\_rev, im zweiten Ansatz OROV-cL-pro3\_for und OROV-cL-pro4\_rev und im dritten Ansatz OROV-cL-pro5\_for und OROV-cL-pro6\_rev verwendet, die gleichzeitig als Templates dienten. Es wurden 20 Zyklen durchgeführt, wobei die Temperatur im Annealingsschritt (Anlagerung der Primer) 56 °C für 30 Sekunden und im Polymerisierungsschritt 68 °C für 30 Sekunden betrug. In einem zweiten Schritt wurden die restlichen Primer hinzugefügt, und eine PCR über 30 Zyklen wurde durchgeführt. In der Elektrophorese zeigte sich, dass die Ansätze 2b und 3b cDNA in gewünschter Fragmentgröße enthielten. Im dritten Schritt wurde eine PCR mit den Ansätzen 2b und 3b als Template und mit den Primern 1 (OROV-cL-pro1\_for) und 6 (OROV-cLpro6\_rev) über 30 Zyklen durchgeführt. Hierbei erbrachte die Amplifikation von Ansatz 3b ein Fragment gewünschter Größe. Demzufolge wurde dieser Ansatz aufgereinigt und für die Klonierung des pT7-riboSM2-OROV-cL verwendet.

In der Auswertung der Agarosegel-Elektrophorese wurde im Gelbild eine Bande bei 200 bp, die der Größe der kombinierten NTR-Sequenzen entspricht, erwartet. Die komplette NTR-Sequenz wurde zunächst mittels TA-Klonierung (vgl. Kap. 2.2.7.1) in den pCRII-Vektor kloniert.

## Sequenzierungsergebnisse cLpro-Sequenz in pT7-riboSM2:

Wie die Sequenzierungsergebnisse zeigen, entsprach kein Klon einer fehlerfreien cLpro-Sequenz (156 bp). Alle fünf Klone enthielten zahlreiche Deletionen. Da kein Klon eine fehlerfreie Sequenz enthielt, wurde die cLpro-Sequenz (in pCRII) des Klons 6, die eine Punktmutation enthielt, zunächst in den pT7-riboSM2-Vektor kloniert. Im Anschluss wurde zur Korrektur der Mutation eine *site-directed mutagenesis* durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.13). Diese war jedoch nicht erfolgreich, da am Ende erneut kein Klon eine fehlerfreie Sequenz enthielt.



### Abbildung 27: Klonierung des Vektors pT7-riboSM2-cLpro

In einem zweiten Versuch, die Mutation zu korrigieren, wurde die cLpro-Sequenz zunächst in zwei Einzelfragmenten amplifiziert. Als Matrize für die beiden Einzelfragmente wurde der Vektor pT7-riboSM2-cLpro (PM, Klon 6) verwendet. Das erste Fragment umfasste einige Basenpaare des Vektors pT7-riboSM2, einschließlich der Sequenz einer *Tfil*-Schnittstelle, und den ersten Teil der cLpro-Sequenz.

Zur Amplifikation des ersten Fragmentes wurden folgende Primer verwendet:

SmutF1\_for ggggaaacgcctggtat

(Forward-Primer)

Esp3I-cLpro-rep1\_m13for

cgtctcccgctcttcacattttgagattgtttttg (Reverse-Primer)

Der Reverse-Primer diente zum einen der Korrektur der Punktmutation, zum anderen wurde mit seiner Hilfe eine *Esp3I*-Schnittstelle angefügt. Da dem zweiten Fragment am 5'-Ende ebenfalls eine *Esp3I*-Schnittstelle angefügt wurde, konnten beide Fragmente unter Verlust der Schnittstellen wieder zusammengefügt werden.

Das zweite Fragment wurde mithilfe folgender Primer amplifiziert:

Esp3I-cLpro-rep2\_m13rev cgtctcgagcggtagcgtcttcataag (Forward-Primer)

T7Term tatgctagttattgctcag (Reverse-Primer)

Der Forward-Primer enthält am 5'-Ende die oben bereits genannte Sequenz der *Esp3I*-Schnittstelle und ist komplementär zu der Sequenz, die unmittelbar nach der Punktmutation in der cLpro-Sequenz folgt. Der Reverse-Primer bindet am T7-Terminator am 3'-Ende. Vor der Sequenz des T7-Terminators befindet sich die Sequenz einer *HindIII*-Schnittstelle. Beide Fragmente wurden nach PCR-Amplifikation mittels TA-Klonierung (vgl. Kap. 2.2.7.1) jeweils in den pCRII-Vektor kloniert. Somit entstanden der pCRII-cLpro-rep1, der das erste Fragment enthält, und der pCRII-cLpro-rep2, der das zweite Fragment enthält.

In einem zweiten Schritt wurden die Vektoren mit den Restriktionsenzymen *Esp3I* und *XhoI* verdaut. Dadurch wurde das Fragment II aus pCRII-cLpro-rep2 geschnitten und pCRII-cLpro-rep1 linearisiert. Das Fragment II konnte nun in den pCRII-cLpro-rep1 ligiert werden. Wie die anschließende Sequenzierung zeigte, entstand eine vollständige und fehlerfreie cLpro-Sequenz im pCRII-Vektor (pCRII-cLpro-repariert/Klon4).

Anschließend wurde mithilfe eines Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *TfiI* und *HindIII* die cLpro-Sequenz aus dem Vektor pCRII-cLpro-repariert geschnitten und in den Vektor pT7-riboSM2 kloniert. Auf diese Weise wurde der Vektor pT7-riboSM2-OROV-cLpro hergestellt, der eine fehlerfreie cLpro-Sequenz enthielt.

Im letzten Schritt wurde dann in einem *LguI*-Verdau (*SapI*) das L-Segment aus dem Vektor pl.18-OROV-L geschnitten und anstelle des Linkers in die cLpro-Sequenz in den ebenfalls *LguI*-verdauten Vektor pT7-riboSM2-OROV-cLpro ligiert, sodass der L-ORF nun von den antigenomischen 3'-und 5'-NTR-Sequenzen flankiert wurde. Somit wurde der Rescuevektor pT7-riboSM2-OROV-cL erhalten, der das komplette antigenomische OROV-L-Segment als cDNA unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase-Promotors enthält. In der folgenden Abbildung ist die Klonierungsstrategie noch einmal schematisch dargestellt.

→ Amplifikation der cLpro-Sequenz in zwei Fragmenten und Klonierung in den Rescuevektor pT7-riboSM2, Reparatur der \*Punktmutation mit spezifischem Primer

1. Fragment I

2. Fragment II

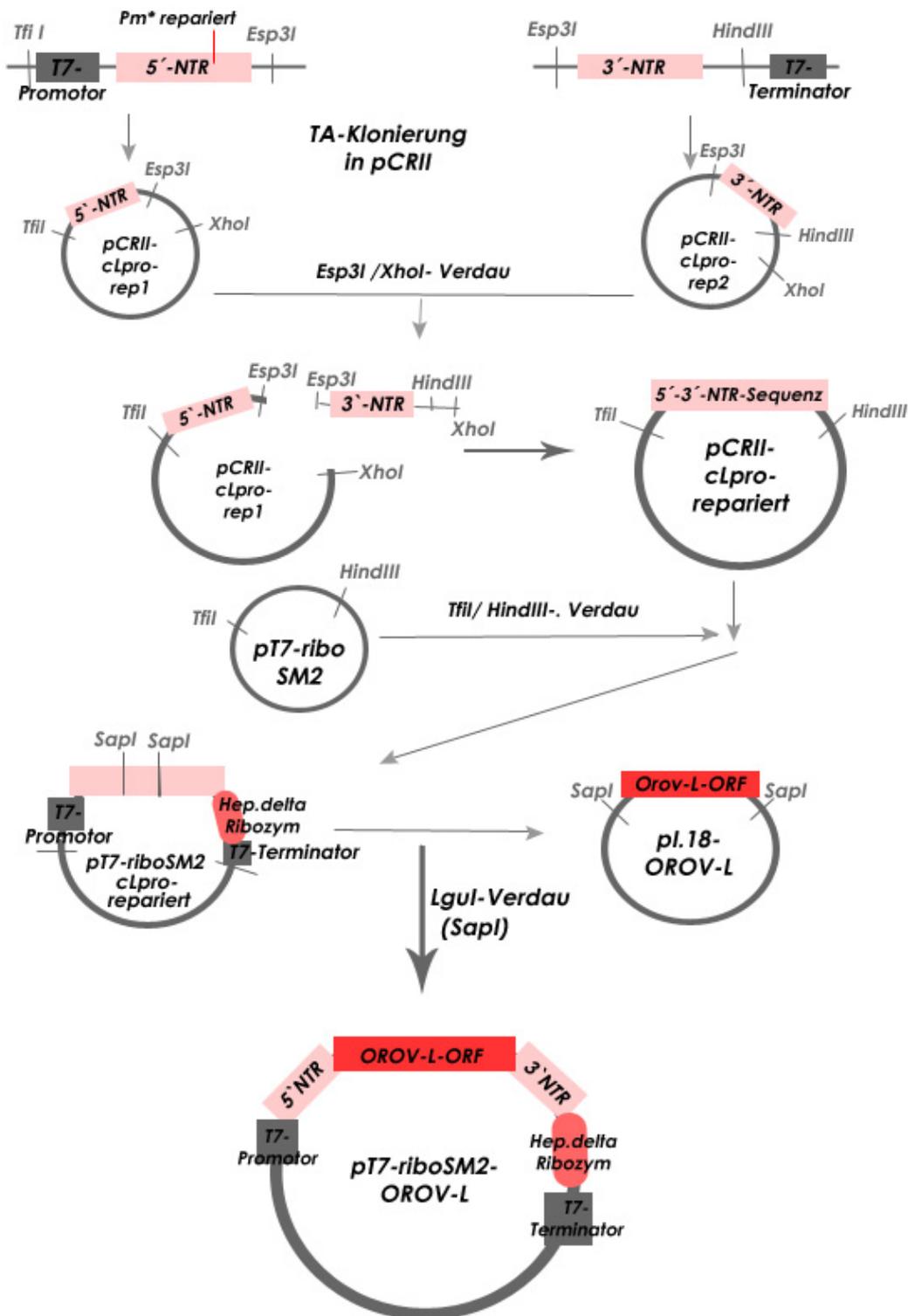


Abbildung 28: Klonierung des pT7-riboSM2-OROV-L

### 3.1.2.2 Der Rescuevektor pT7-riboSM2-cM

Die Amplifikation der pro-Sequenz des M-Segments wurde mithilfe der Pfx-Polymerase (In-vitrogen) und sechs spezifischer Primer durchgeführt, die gleichzeitig auch als Matrize dienten. Bei der Herstellung der Primer wurde auf die OROV-M-Referenzsequenz aus GenBank (NC\_005775) zurückgegriffen. Es wurden folgende Primer verwendet:

```

OROV_cM_pro1_for      5' GACAGACGTCTCTCTATAGAGTAGTGTGCTACCGGCAACAAACAG 3'
OROV_cM_pro2_rev      5' AGAGCGGTACCGCTCTTCCCATTGTCCTGTTTGTGCGGTAG 3'
OROV_cM_pro3_for    5' GAGCGGTACCGCTCTTTCGTAGATTGGCTAAAAAGGGTAGGCA 3'
OROV_cM_pro4_rev      5' TGAATTTTATTTATACCTGATTTTAGACCTGCCTACCCTTTTATAGC 3'
OROV_cM_pro5_for      5' ATAAATAAAATTTCATATAAATAAAGTCAAAAATTGTTGTCGGTA 3'
OROV_cM_pro6_rev      5' TCTGTCCGTCTCCACCCAGTAGTGTGCTACCGACAACAATTTTT 3'
  
```

```

          Esp3I          5' NTR                                SspI
5' GACAGACGTCTCC | TATA Gagtagtgtgctaccggcaacaacagtgaca | atg gGAAGAGCGGTACCGCTCTTCg | tag atttggcta
3' CTGTCTGCAGAGG ATAT | Ctcacacacgatggccggttgtttgtcactgt tac | cCTTCTCGCCATGGCGAGAAGc atc | taaaccgat
                                     SspI
                                     3' NTR
aaaagggtaggcagggtctaaaatcaggtataaaataaaattcatataaaataaagtcaaaaattgttgcggtagcacactact | GGGT GGAGAC
ttttcccatccgtccagatttttagtccatatttattttaagtatatttatttcagtttttaacaacagccatcgtgtgatga CCCA | CCTCTG
                                     Esp3I
GGACAGA3'
CCTGTCT5'
  
```

**Abbildung 29: Sich überlappenden Primer OROV\_cM\_pro1\_for bis OROV\_cM\_pro6\_rev zur Herstellung der cMpro-Sequenz.**

Die Abbildung zeigt die sich überlappenden Primer OROV\_cM\_pro1\_for bis OROV\_cM\_pro6\_rev zur Herstellung der cMpro-Sequenz.

Wie auch bei Herstellung der pro-Sequenzen des antigenomischen OROV-L-Segments wurden die NTR-Sequenzen des M-Segments als eine Gesamtsequenz amplifiziert. Die 5'- und die 3'-NTR-Sequenzen wurden wiederum durch zwei SspI-Schnittstellen und einen Linker separiert. Über die SspI-Schnittstellen kann der Linker herausgeschnitten und stattdessen der M-ORF eingefügt werden. Am 5'-Ende des Primers OROV-cM-pro1\_for und am 3'-Ende des Primers OROV-cM-pro6\_rev wurde jeweils die Sequenz einer Esp3I-Schnittstelle angefügt. Über diese Schnittstellen kann die komplette NTR-Sequenz in den Vektor pT7-riboSM2 ligiert werden.

Nach Amplifikation der cMpro-Sequenz (vgl. Kap. 3.1.2.1) wurde zum Anhängen des A-Nukleotids der PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase (1U, Eppendorf) inkubiert, weil dies für die nachfolgende TA-Klonierung der cMpro-Sequenz in den pCRII-Vektor notwendig war (vgl. Kap. 2.2.7.1). Der pCRII-Vektor wurde dann in INFαF'-kompetente Bakterienzellen transfor-

miert. Mithilfe eines Blau-Weiß-Screenings wurde ermittelt, ob die Bakterien das Plasmid enthalten (vgl. Kap. 2.2.3). Zur Überprüfung der Anwesenheit des Inserts im Plasmid wurde eine Colony-PCR mit M13\_for- und M13\_rev-Primern durchgeführt. Zur Überprüfung der Orientierung im pCRII-Vektor wurde der M13\_for und der spezifische Reverse-Primer (*anti-sense*-Orientierung) bzw. Forward-Primer (*sense*-Orientierung) verwendet.

Aus den Klonen, in denen die cMpro-Sequenz im Plasmid enthalten war, wurden die Plasmide mithilfe einer Minipräparation isoliert (vgl. Kap. 2.2.4). Die entsprechenden Proben aus der Minipräparation wurden zur Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab in Göttingen (vgl. Kap. 2.2.12).

### **Sequenzierungsergebnisse cMpro-Sequenz in pCRII:**

Wie die Sequenzierungsergebnisse zeigten, hatten alle drei pCRII-OROV-cMpro-Klone (179 bp) eine fehlerfreie Sequenz. Für die Ligation der cMpro-Sequenz in den pT7-riboSM2-Vektor wurde der pCRII-OROV-cMpro-Klon 4 verwendet.

Nun wurde mithilfe des *Esp3I*-Verdau die cMpro-Sequenz aus pCRII-OROV-cMpro geschnitten und in den *Esp3I*-verdauten pT7-riboSM2 ligiert (s. Kap. 2.2.7.2), sodass der Vektor pT7riboSM2-cMpro hergestellt wurde. Im zweiten Schritt wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren, nach dem auch zur Herstellung von pT7-riboSM2-OROV-cL vorgegangen wurde: Mittels *Lgul*-Verdau, was dem *SapI*-Verdau entspricht, wurde der M-ORF aus dem pI.18-OROV-M Expressionsvektor geschnitten, der Linker in der cMpro-Sequenz herausgeschnitten und stattdessen der M-ORF eingefügt. Somit wurde der Rescuevektor pT7-riboSM2-OROV-cM hergestellt, der das komplette antigenomische OROV-M-Segment als cDNA unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase-Promotors enthält. In der folgenden Abbildung ist die Klonierungsstrategie noch einmal schematisch dargestellt.

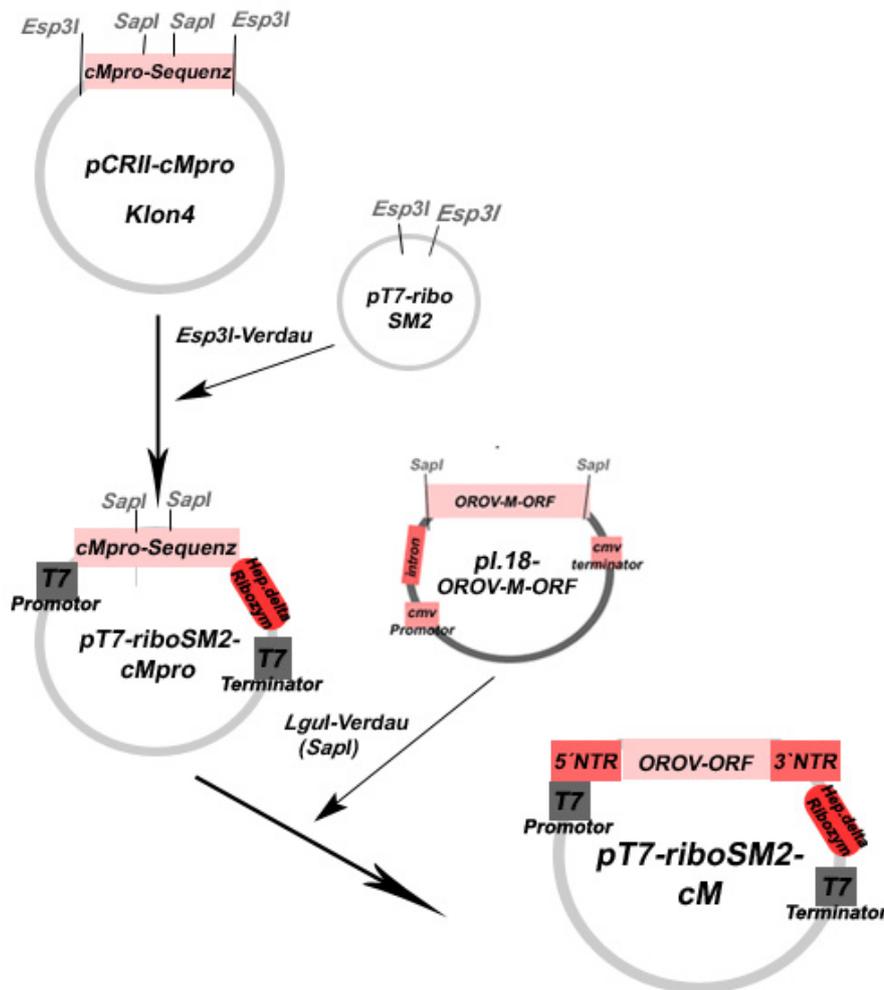


Abbildung 30: Klonierung des pT7-riboSM2-cM

### 3.1.2.3 Der Rescuevektor pT7-riboSM2-cS

Die Amplifikation der pro-Sequenz (cSpro) des S-Segments erfolgte mithilfe der Pfx-Polymerase (Invitrogen) und unter Verwendung von vier spezifischen Primern.

Die 5'-und die 3'-NTR-Sequenzen werden wie auch bei den M- und L-NTRs in einem Stück amplifiziert. Sie werden durch einen Linker separiert. Unmittelbar vor und nach der Linkersequenz befinden sich Sequenzen für SapI-Schnittstellen. Über diese kann der S-ORF in den Vektor pT7-riboSM2-cSpro eingefügt werden. Am 5'-Ende des OROV-cS\_pro1\_for-Primers und am 3'-Ende des OROV-cS\_pro4\_rev-Primers wurde jeweils die Sequenz einer Esp3I-Schnittstelle angefügt. Über diese Schnittstellen kann die cSpro-Sequenz mithilfe des Restriktionsenzym *Esp3I* geschnitten und anschließend in den Vektor pT7-riboSM2 ligiert werden.

Zur Herstellung der Primer wurde auf die OROV-S-Referenzsequenz aus GenBank (NC\_005777) zurückgegriffen. Es wurden folgende Primer verwendet:



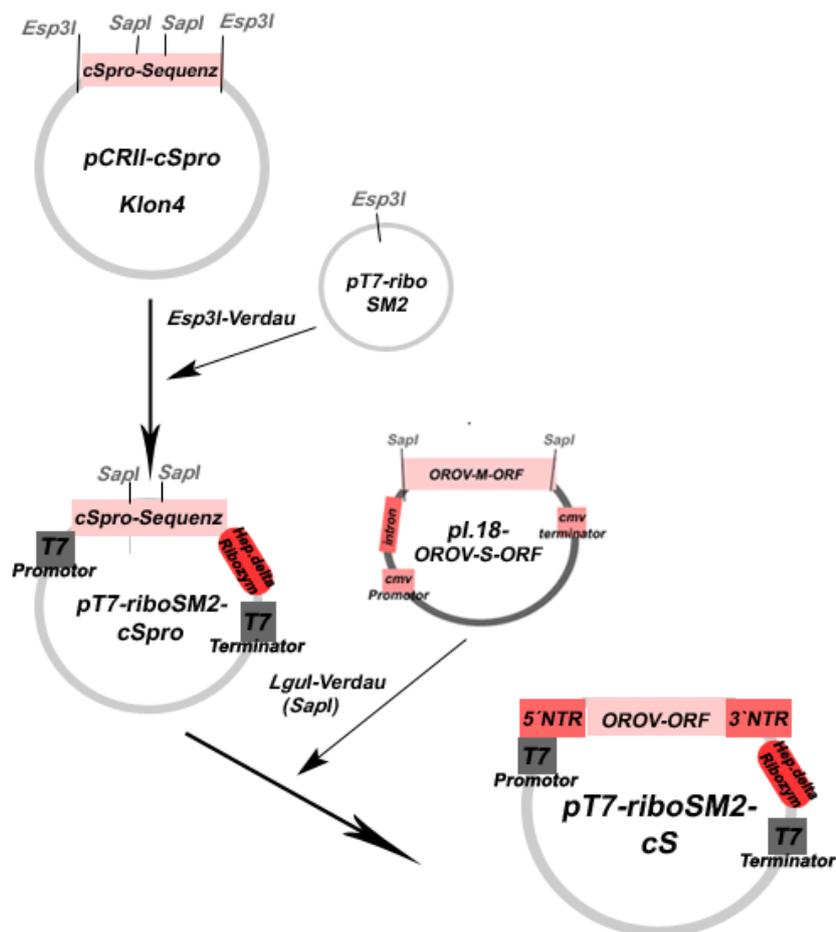


Abbildung 32: Klonierung des pT7-riboSM2-cS

### Sequenzierungsergebnisse cS-pro-Sequenz in pT7-ribo-SM2:

Wie die Sequenzierung zeigte, wiesen die pT7-riboSM2-cS-Sequenzen insgesamt 14 Punktmutationen im Vergleich zur OROV-S-Referenzsequenz (NC\_005777) auf, die sich bei allen Klonen an der gleichen Position befanden. Bei diesen Mutationen handelte es sich um stille Mutationen ohne Auswirkung auf die Aminosäureabfolge im Protein.

### 3.1.3 Herstellung der Vektoren für OROV-Smut

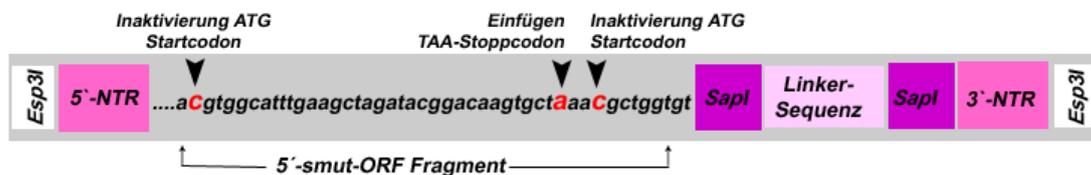
#### 3.1.3.1 Der Rescuevektor pT7-riboSM2-OROV-cSmut

Um die Rolle von OROV-NSs als Virulenzfaktor besser charakterisieren zu können und die Grundlage für die Herstellung eines rekombinanten NSs-defizienten Oropouche-Virus zu schaffen, sollte im Folgenden durch das Einbringen von Punktmutationen der NSs-ORF innerhalb des N-ORF auf dem S-Segment zerstört werden, ohne aber die Funktionalität des N-Proteins zu beeinträchtigen.

Bei der Klonierung des Rescuevektors pT7-riboSM2-cSmutpro mussten daher in die 5'-terminale Sequenz des NSs-ORF drei Mutationen eingebracht werden.

### Klonierung der cSmutpro-Sequenz

Um die Mutationen zur Zerstörung des Leserahmens der NSs-Sequenz zu erzeugen, wurde die Sequenz am 5'-Ende des S-ORF, die die Mutationen enthalten sollte, mithilfe spezifischer Primer hergestellt. Zum einen wurde durch eine Punktmutation durch den Austausch eines Thymins in ein Cytosin das Startcodon ATG zerstört, sodass eine Initiation der Translation nicht mehr stattfinden konnte. Als zweite Mutation wurde nach weiteren 33 Basen ein Stoppcodon (TAA) durch den Austausch eines Cytosins in ein Adenosin erzeugt, was im Falle einer Translation zum Leseabbruch führt. Eine dritte Punktmutation wurde unmittelbar hinter dem eingebauten Stoppcodon in einem weiteren Startcodon (ATG) gesetzt, indem ein Thymin durch ein Cytosin ersetzt wurde. Dadurch wurde eine mögliche Translationsinitiation an dieser Stelle verhindert. Alle Mutationen betrafen nur den Leserahmen der NS-Sequenz und verhinderten in der Konsequenz lediglich die Synthese des NSs-Proteins. Die Synthese des Nukleoproteins konnte weiterhin erfolgen, da der Basenaustausch an diesen drei Stellen im Leserahmen der N-Sequenz nicht zu einer veränderten Abfolge in der Aminosäuresequenz führt.



**Abbildung 33: Die cSmutpro-Sequenz**

Im Gegensatz zum L-, M-, und S-Segment wurden bei der Klonierung des OROV-Smut-Rescuevektors mithilfe von acht spezifischen Primern, die gleichzeitig als Matrize dienten, ein Fragment hergestellt, welches im Anschluss an die 5'-NTR-Sequenz die 5'-terminale-Sequenz des ORF (80 Basen) mit den drei erzeugten Mutationen enthielt. Dann folgen die Sequenzen für die *SapI*-Schnittstellen mit dem Linker für das Einfügen der restlichen Sequenz des S-ORF in den pT7-riboSM2-cSmutpro-Vektor und die 3'-NTR-Sequenz (vgl. Abbildung 33). Am 5'- und am 3'-Ende des gesamten Fragmentes wurde jeweils noch die Sequenz einer *Esp3I*-Schnittstelle für die Ligation in pT7-riboSM2 angefügt.

Für die Herstellung des cSmutpro-Fragmentes mit dem mutierten 5'-ORF-Fragment wurden folgende acht spezifische Primer verwendet. Bei der Herstellung der Primer wurde auf Sequenzen aus der GenBank (NC\_005777) zurückgegriffen:

OROV-cS\_pro1\_for  
OROV-cS\_pro2\_rev

5' GACAGACGTCTCCTATAGAGTAGTGTGCTCCACA 3'  
5' ATTGGAATTTCTTTTATGTTTTGAATTGTGGAGCACACT 3'

OROV-cS\_pro3\_NSsmut\_for 5' AAAAGAAATCCAATAATGTCAGAGTTCATTTTCAACGACTACCAC  
AACGGACTACATCTAC 3'

OROV-cS\_pro4\_NSsmut\_rev 5' **G**TATGCTGCCTCCGGATCAAATGTAGATGTAGTCCGT 3'

OROV-cS\_pro5\_NSsmut\_for 5' CGGAGGCAGCAT**A**CGTGGCATTGAAGCTAGATAC 3'

OROV-cS\_pro6\_NSsmut\_rev 5' ACACCAG**C**G**T**T**A**GCACCTTGTCGGTATCTAGCTtca 3'

OROV-cS\_pro7\_NSsmut\_for 5' GCT**A**A**A**C**G**CTGGTGTGAAGAGCGGTACCGCTCTTCATAGT 3'

OROV-cS\_pro4\_rev 5' TCTGTCCGTCTCCACCCAGTAGTGTGCTCCACTATGAAGAGCGGT 3'

*Esp3I*                      5' NTR

5' **GACAGACGCTCTCC** | TATA Gagtagtggtgctccacaatttcaaacataaaaagaaattccaataatgtcagagttcattttcaacgacgtac

3' CTGTCTGCAGAGG ATAT | Ctca**tcacacgaggtggttaagttttgtat**ttttcttttaaggtta ttgcattctcaagtaaaagttgctgcatg

**cacaacggactacatct**acatttgatc**cgaggcagcataCgtggcatttgaagctagata**ggacaagt**gctAaaCgctgg** | tgt **tGAAGAG**

gtgt**tgctgatgtagatgtaaaactaggcctccgctcgtatG**cacogtaaaacttcgatctatgctgttcaogaTtt**Gcgacc** aca|a**CTTCTC**  
*SapI*

*SapI*    3' NTR

**CGGTACC****GCTCTTCa** | tag tggagcacactact | GGGT GGAGACGGACAGA 3'

**GCCATGGCGAGAAGt** atc | acctcgtgtgatga CCCA | **CCTCTGCCTGTCT** 5'  
*Esp3I*

### Abbildung 34: Die sich überlappenden Primer zur Herstellung der cSmutpro-Sequenz mit dem 5'-Ende des S-ORF

Die Primer OROV-cS\_pro4\_NSsmut\_rev, OROV-cS\_pro6\_NSsmut\_rev und OROV-cS\_pro7\_NSsmut\_for enthalten die Mutationen, die zur Inaktivierung der zwei Startcodons und zur Herstellung eines Stoppcodons im Leserahmen der NS-Sequenz führen.

Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung der Pfx-Polymerase (Invitrogen). Mittels TA-Klonierung wurde das cSmutpro-Fragment in den T-Vektor pCRII ligiert. Über einen *Esp3I*-Doppelverdau wurde das cSmutpro-Fragment dann aus dem T-Vektor geschnitten, zum anderen wurde der pT7-riboSM2-Vektor in den MCS geschnitten. Das cSmutpro-Fragment wurde dann in den Vektor ligiert. Es entstand der Rescue-Vektor pT7-riboSM2-cSmutpro.

#### Klonierung des 3' terminalen S-ORF-Fragmentes

Die Amplifikation der Sequenz des 3'-terminalen S-ORF-Fragmentes (583 Basen) erfolgte mittels Pfx-Polymerase (Invitrogen). Als Template wurde in diesem Fall der Vektor pCRII-OROV-cS verwendet, der bereits aus der Klonierung des antigenomischen Wildtyp OROV-S-Segments vorlag.

Als Primerpaar wurde zum einen der Wildtyp OROV-S\_rev\_sapi-Primer verwendet, der auch schon bei der Amplifikation des Wildtyps OROV-S verwendet wurde, und zum anderen ein spezifischer Forward-Primer (OROV-mutS\_for\_sapi), der hinter der zu mutierenden Sequenz im S-ORF ansetzt. Bei der Herstellung der Primer wurde auf die OROV-S-Referenzsequenz aus GenBank (NC\_005777) zurückgegriffen.

Folgende Primer wurden eingesetzt:

```
OROV-mutS_for_sapi  gacagagctcttcggtggttagagtcttcttcctc  
OROV-S_rev_sapi    gacagagctcttcactatatgtcaattccgaat
```

Weil nach der Amplifikation mit Pfx-Polymerase DNA-Fragmente mit glatten Enden entstehen, wurde im Anschluss der PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase (1U, Eppendorf) inkubiert, um A-Nucleotide anzuhängen. Dies ist notwendig zur Vorbereitung auf die TA-Klonierung in den T-Vektor pCRII (vgl. Kap. 2.2.7.1). Nach der Ligation in den T-Vektor pCRII erfolgte die Transformation in kompetente *INF $\alpha$ F'*-Bakterien. Um den Erfolg der Ligation zu kontrollieren, wurde ein Blau-Weiß-Screening durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.3).

Um zu überprüfen, ob das ORF-Fragment im pCRII enthalten war, wurde eine Colony-PCR mit den Primern M13\_for und M13\_rev (vgl. Kap. 2.2.8) durchgeführt. Um die *sense*-Orientierung des Fragmentes zum SP6-Promotor im Vektor zu prüfen, wurde der M13\_for und der OROV-mutS\_for\_sapi-Primer verwendet. Zur Überprüfung der *antisense*-Orientierung wurde der M13\_for und der OROV-S\_rev\_sapi-Primer des S-ORF-Fragmentes eingesetzt.

Gleichzeitig wurden mit den Bakterienklonen, die das S-ORF-Fragment im pCRII-Vektor enthielten, ÜNKs angefertigt. Aus den Bakteriensuspensionen wurde über eine Minipräparation (vgl. Kap. 2.2.4) die Plasmid-DNA isoliert.

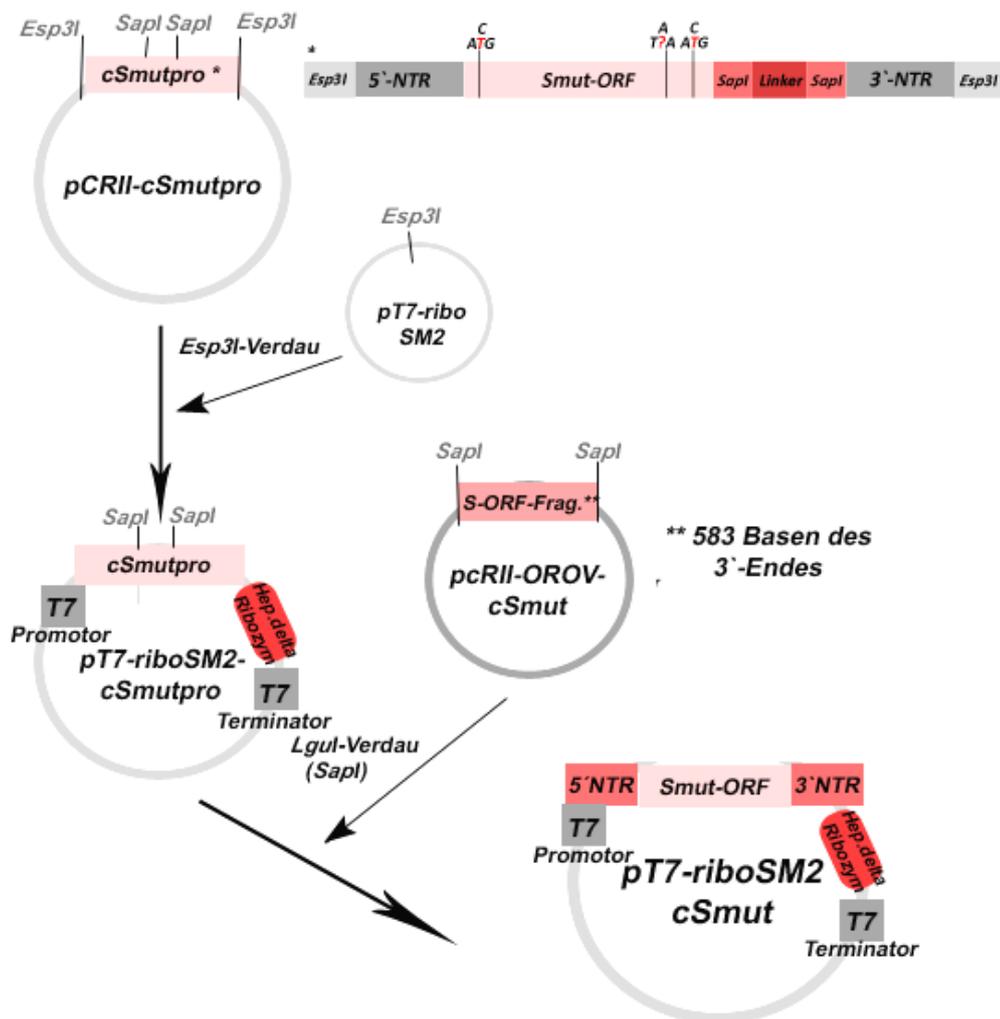
Die Proben, die Plasmide mit dem gewünschten Insert enthielten, wurden für die Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Seqlab in Göttingen (vgl. Kap. 2.2.12).

### **Sequenzierungsergebnisse 3'-terminales Smut-ORF-Fragment in pCRII:**

Wie sich in den Sequenzierungsergebnissen zeigt, weisen die fünf 3'-terminalen Smut-ORF-Sequenzen zwei Abweichungen in Form von Punktmutationen auf, die sich in allen Sequenzen an gleicher Position befinden. Diese Mutationen sind auch im Wildtyp vorhanden und haben keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Verglichen mit der Referenzsequenz OROV-S\_NC\_005777, die an Position 68 mit dem Startcodon des N-Leserahmens beginnt und an Position 112 das Startcodon des NSs aufweist, beginnen die drei 3'-terminalen Smut-ORF-Sequenzen wie erwartet erst an Position 140 mit der Sequenz einer *SapI*-Schnittstelle (GCTCTTC). Auch am Ende der Sequenzen befindet sich eine *SapI*-Schnittstelle, damit das 3'-terminale ORF-Fragment über diese geschnitten und in den pT7-riboSM2-Smutpro ligiert werden kann. Für die weiteren Klonierungsarbeiten zur Erzeugung des Smut-ORF wurde der Klon 1 verwendet.

Anhand der Ergebnisse wurden die Plasmide ausgewählter Klone erneut in *INF $\alpha$ F'* transformiert und ÜNKs für eine Midipräparation (vgl. Kap. 2.2.4.2) angefertigt.

Mithilfe des Restriktionsenzym *Lgul* (*SapI*) wurde über die *SapI*-Schnittstellen das 3'-Fragment des S-ORF (583 Basen) aus pCRII-OROV-3'Smut geschnitten. Parallel dazu wurde mit den gleichen Enzymen der Linker aus der cSmutpro-Sequenz im Vektor pT7-riboSM2-cSpro geschnitten. Im Anschluss wurde das 3'-Fragment des S-ORF anstelle des Linkers in den pT7-riboSM2-cSmutpro ligiert. Es entstand der Vektor pT7-riboSM2-cSmut, der das komplette antigenomische OROV-Smut-Segment enthält, bei dem der NSs-ORF unter Erhalt des N-ORF zerstört wurde.



**Abbildung 35: Die Klonierung des Vektors pT7-riboSM2-cSmut**

#### Sequenzierungsergebnisse pT7-riboSM2-cSmut:

Wie die Sequenzierungsergebnisse zeigen, weisen die drei pT7-riboSM2-cSmut-Sequenzen zwölf Abweichungen in Form von Punktmutationen gegenüber der Referenzsequenz NC\_005777.1 auf. Diese haben jedoch im Leserahmen des OROV-N keinerlei Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Diese Mutationen sind bei allen drei Klonen an der gleichen Stelle zu

sehen. Im Vergleich mit der Sequenz des Wildtyp-OROV-NSs weisen die Sequenzen die gewünschten drei Mutationen auf, zum einen in der Position 90, die das mutierte Startcodon des NSs-Leserahmens zeigt (ATG → ACG), zum anderen das Stoppcodon (TAA) in der Position 101 und zum dritten ein weiteres mutiertes Startcodon (ATG → ACG). Diese führen auf Proteinebene zu einem Translationsabbruch. Es kann also kein NSs-Protein mehr synthetisiert werden.

Anschließend wurde der vollständige Smut-ORF mithilfe der S-Wildtyp-Primer (OROV-S\_for/OROV-S\_rev) amplifiziert, wobei der Rescuevektor pT7-riboSM2-cSmut (Klon 6) als Matrize diente. Der vollständige Smut-ORF wurde zunächst in den T-Vektor pCRII ligiert (vgl. Kap. 2.2.7.1).

### 3.1.3.2 Subklonierung des Smut-ORF in den Expressionsvektor pl.18

Nach erfolgreicher Klonierung des vollständigen Smut-ORF in den T-Vektor pCRII erfolgte die Umklonierung in den pl.18-Expressionsvektor. Zu diesem Zweck wurde der Smut-ORF aus pCRII-OROV-Smut-ORF mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I ausgeschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pl.18 eingefügt. (vgl. Kap. 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7). Es entstand der pl.18-Smut-ORF-Expressionsvektor (vgl. Abbildung 36).

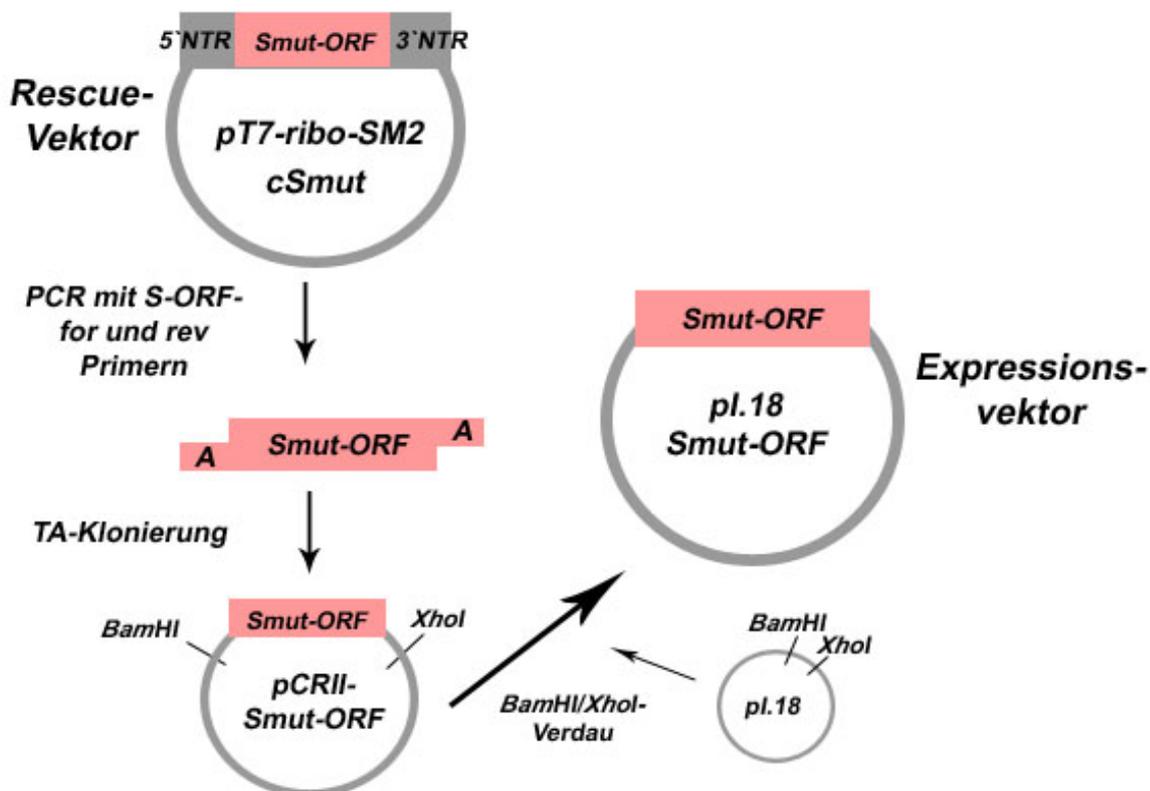


Abbildung 36: Klonierung des Expressionsvektors pl.18-Smut-ORF

### 3.1.3.3 Herstellung des Minigenom-Plasmids pT7riboSM2-cMpro-cRL

Mithilfe der Primer cRL\_for\_sapi und cRL\_rev\_sapi und unter Verwendung von pRLSV40 (Promega, s. Kap.2.1) als Template wurde die cDNA des Renilla-Luciferase-Gens amplifiziert (s. Kap. 2.2.8) und mit *SapI*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende versehen.

```
cRL_for_sapi      gacagaGCTCTTCAATGACTTCGAAAGTTTATGAT
```

```
cRL_rev_sapi      gacagaGCTCTTCTCTATTGTTTCATTTTTGAGAACTC
```

Nach Anhängen von terminalen A-Nukleotiden mithilfe von Taq-Polymerase und nach Reinigung des PCR-Produkts wurde dieses in den T-Vektor pCRII kloniert (s. Kap. 2.2.7.1) und die Korrektheit der Sequenz durch Sequenzierung überprüft (s. Kap. 2.2.12). Anschließend erfolgte die Umklonierung der Renilla-Luciferase cDNA in den Vektor pT7riboSM2-cMpro. Hierzu wurde mithilfe eines *Lgul*-Verdau (*Lgul* ist ein *SapI* Isochizomer) die Renilla-Luciferase cDNA aus pCRII-cMpro-cRL ausgeschnitten, gereinigt und in den *Lgul*-verdauten Vektor pT7riboSM2-cMpro ligiert. Hierdurch wurde das Minigenom-Plasmid pT7riboSM2-cMpro-cRL erhalten. In diesem Plasmid ist die Renilla-Luciferase-cDNA von den antigenomischen Enden des M-Segments flankiert. Diese Sequenz stellt somit ein Äquivalent der antigenomischen OROV-M-Segment-cDNA dar, bei der der OROV-M-ORF durch den Renilla-Luciferase-ORF ersetzt wurde, und wird deshalb auch als Minigenom bezeichnet.

### 3.1.3.4 Herstellung des Minigenom-Plasmids pT7riboSM2-vMpro-vRL

Mithilfe der Primer Esp3I\_OROV-vMpro\_for und Esp3I\_OROV\_vMpro\_vRL\_rev und unter Verwendung von pT7riboSM2-cMpro-cRL (s. Kap. 3.1.3.3) als Template wurde das cMpro-cRL Minigenom amplifiziert und mit *Esp3I*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende versehen.

```
Esp3I_OROV-vMpro_for
```

```
CGTCTCCTATAGagtagtgctaccgacaacaatTTTTgactttatttatatgaattttat
```

```
Esp3I_OROV-vMpro_vRL_rev
```

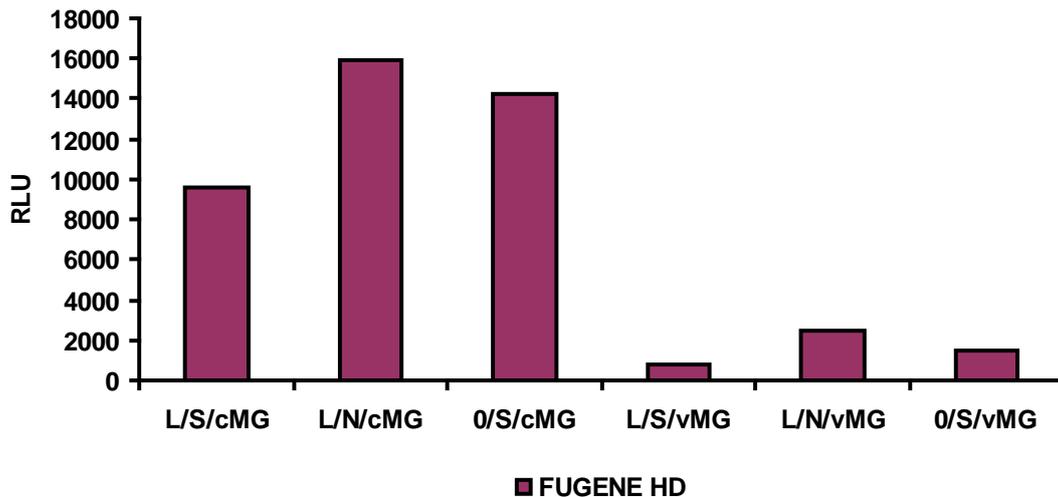
```
CGTCTCCACCCagtagtgctaccggcaacaacagtgacaATGACTTCGAAAGTTTATGAT
```

Nach Anhängen von terminalen A-Nukleotiden mithilfe von Taq-Polymerase und Reinigung des PCR-Produkts wurde dieses in den T-Vektor pCRII kloniert (s. Kap. 2.2.7.1) und die Korrektheit der Sequenz durch Sequenzierung überprüft (s. Kap. 2.2.12). Anschließend erfolgte die Umklonierung der Minigenom-cDNA in den Vektor pT7riboSM2. Hierzu wurde mithilfe eines *Esp3I*-Verdau die Minigenom-cDNA aus pCRII-vMpro vRL ausgeschnitten, gereinigt (s. Kap. 2.2.10) und in den *Esp3I*-verdauten Vektor pT7riboSM2 ligiert. Hierdurch wurde das Minigenom-Plasmid pT7riboSM2-vMpro-vRL erhalten. In diesem Plasmid ist die Renilla-Luciferase-cDNA von den genomischen Enden des M-Segments flankiert und liegt im Vergleich zu pT7riboSM2-cMpro-cRL in umgekehrter Orientierung vor. Diese Sequenz stellt somit ein Äquivalent der genomischen OROV-M-Segment-cDNA dar, bei der der OROV-M-ORF durch den Renilla-Luciferase-ORF ersetzt wurde.

Zur Etablierung des Minireplikon-Systems (vgl. entspricht Kap. 2.3.4 und Abbildung 12) für das Oropouche-Virus wurden zunächst BSR-T7-Zellen kultiviert (vgl. Kap. 2.3.1). Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie konstitutiv T7-Polymerase exprimiert. Die T7-Polymerase wird für die initiale Transkription des Minigenoms (das für Renilla-Luciferase codiert) benötigt, das der viralen Polymerase dann als Matrize für die Herstellung von Minigenom-Transkripten dient. Folglich kann eine Synthese der Renilla-Luciferase nur erfolgen, wenn eine transkriptionell aktive virale Polymerase vorhanden ist. Zusätzlich wurde das Reporterplasmid pTM1-FFluc transfiziert, welches ebenfalls einen T7-Promotor enthält, unter dessen Kontrolle die Firefly-Luciferase (FF) exprimiert wird. Der Firefly-Substratumsatz stellt in diesem Fall ein Maß für die Transfektionseffizienz dar. In einem ersten Experiment erfolgte die Transfektion mit 3 µl FuGene HD pro Ansatz. Es wurde pro Kavität 50 µl OPTIMEM verwendet.

Es wurden sechs Ansätze hergestellt. In drei dieser sechs Ansätze wurde ein Konstrukt verwendet, welches das Minigenom (Genesequenz der Renilla-Luciferase) in antigenomischer Orientierung enthält, und in den drei anderen Ansätzen wurde ein Konstrukt benutzt, das das Minigenom in genomischer Orientierung enthält. Es wurden je Ansatz 0,3 µg pT7-riboSM2-cMpro-cRL (Minigenom, antigenomische Orientierung) bzw. pT7-riboSM2-cMpro-vRL (Minigenom, genomische Orientierung) transfiziert. Je zwei der drei Ansätze wurden mit 0,3 µg pl.18-OROV-cL für die Expression der viralen Polymerase transfiziert, die verbleibenden wurden als Negativkontrolle mit 0,3µg pl.18-Leervektor transfiziert. Je zwei der Ansätze wurden mit 0,3 µg pl.18-OROV-cS für die Expression des Nukleoproteins und NSs-Proteins transfiziert, und je ein Ansatz wurde mit 0,3 µg pl.18-OROV-cSmut für die Expression des Nukleoproteins ohne NSs-Protein-Synthese transfiziert.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen lysiert. Zunächst wurde der Substratumsatz der Firefly-Luciferase gemessen, im Anschluss der Substratumsatz der Renilla-Luciferase (vgl. Kap. 2.3.3). Die Rohdaten des Renilla-Luciferase-Substratumsatzes wurden mit den Daten des Firefly-Luciferase-Substratumsatzes verrechnet, um die Transfektionseffizienz, die möglicherweise in den einzelnen Ansätzen variiert, zu berücksichtigen.

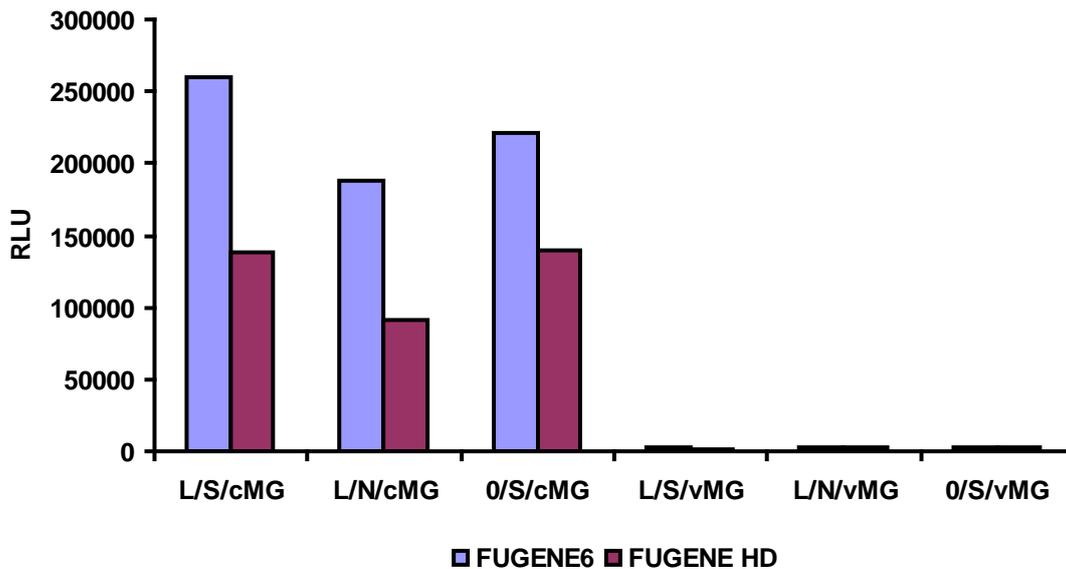


**Abbildung 37: Etablierung eines OROV-Minireplikon-Systems**

Dargestellt ist die Renilla-Luciferase-Aktivität, bezogen auf die relative Firefly-Luciferase-Aktivität 72 Stunden nach Transfektion. L = pl.18-OROV-cL, S = pl.18-OROV-cS, N = pl.18-OROV-cSmut, cMG = pT7-riboSM2-cMpro-cRL, vMG = pT7-riboSM2-vMpro-vRL, 0 = pl.18 Leervektor.

In allen Ansätzen, die mit dem Minigenom-Plasmid pT7-riboSM2-cMpro-cRL (Minigenom in antigenomischer Orientierung) transfiziert wurden, konnte Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen werden. Es zeigte sich aber auch bei dem Ansatz ein Anstieg der Renilla-Luciferase-Aktivität, der keinen pl.18-OROV-cL-Vektor enthielt, d.h., dass es zu einer Bildung von Renilla-Luciferase in Abwesenheit der viralen Polymerase gekommen ist. Die Ansätze, die mit dem vMG = pT7-riboSM2-vMpro-vRL (Minigenom in genomischer Orientierung) transfiziert worden waren, zeigten eine sehr geringe Renilla-Luciferase-Aktivität, insbesondere waren keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen messbar, was bedeutet, dass keine Minireplikonaktivität nachgewiesen werden konnte.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden für das OROV-Minireplikon-System zusätzlich ein zweites Transfektionsreagenz (FuGene 6,3 µl/Ansatz) und eine andere Variation der Mengenverhältnisse der Konstrukte verwendet. Es wurde die 3-fache Menge (0,85 µg/Ansatz) Minigenom eingesetzt und nur noch 1/3 der cL-, cS-, und -cSmut-Konstrukte (0,1 µg /Ansatz). Die Menge des pTM1-FFluc für die Expression der FF-Luciferase wurde auf die Hälfte reduziert (0,05 µg/Ansatz).

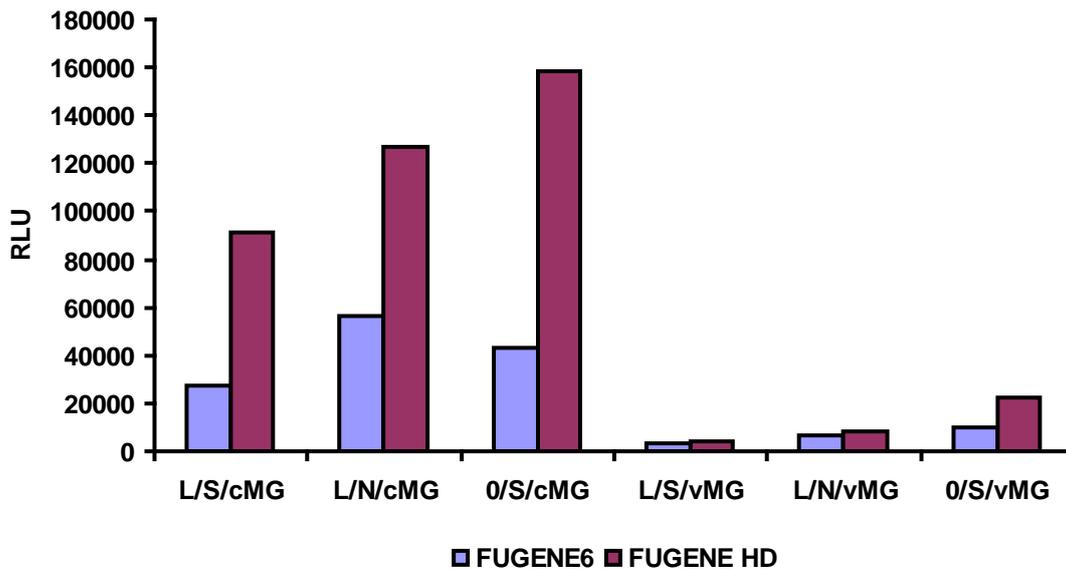


### Abbildung 38: Etablierung eines OROV-Minireplikon-Systems

Dargestellt ist die der Renilla-Luciferase-Aktivität, bezogen auf die relative Firefly-Luciferase-Aktivität 72 Stunden nach Transfektion. L = pl.18-OROV-cL, S = pl.18-OROV-cS, N = pl.18-OROV-cSmut, cMG = pT7-riboSM2-cMpro-cRL, vMG = pT7-riboSM2-vMpro-vRL, 0 = pl.18 Leervektor. Transfiziert wurde mit 3µl/Ansatz FuGene 6 und FuGene HD.

Wie auch in der ersten Versuchsreihe konnte eine Aktivität der Renilla-Luciferase bei allen Ansätzen gemessen werden, die mit dem pT7-riboSM2-cMpro-cRL transfiziert wurden. In den Ansätzen, bei denen als Transfektionsreagenz FuGene 6 verwendet wurde, ist die Aktivität 30 bis 50 Prozent stärker als bei Verwendung von FuGene HD. Eine Renilla-Luciferase-Aktivität ist allerdings auch im Falle der Abwesenheit des Plasmids pl.18-OROV-cL vorhanden, d.h., dass es zu einer Bildung von Renilla-Luciferase in Abwesenheit der viralen Polymerase gekommen ist. Bei den Ansätzen, die mit dem pT7-riboSM2-vMpro-vRL-Konstrukt (Minigenom in genomischer Orientierung) transfiziert wurden, zeigte sich in diesem Experiment kein Unterschied zwischen den Ansätzen, die das cL-Konstrukt zur Expression der viralen Polymerase enthielten, und der Negativkontrolle. Zudem zeigten die Ansätze im Vergleich zu den Ansätzen mit dem pT7-riboSM2-vMpro-cRL-Konstrukt sehr geringe Renilla-Luciferase-Aktivitäten.

In einer dritten Versuchsreihe wurden die Zellen mit 0,05 µg pT7-riboSM2-cS- bzw. -cSmut-Konstrukten/Ansatz transfiziert. Es wurde mit 0,15 µg pT7-riboSM2-cL-Konstrukt/Ansatz bzw. in diesem Experiment mit 0,15 µg des pUC19 (statt pl.18) als Leervektor in den Negativkontrollen transfiziert, um einen negativen Einfluss der Expressionskassette des pl.18-Vektors auf die Aktivität des Minireplikon-Systems auszuschließen.



**Abbildung 39: Etablierung eines OROV-Minireplikon-Systems**

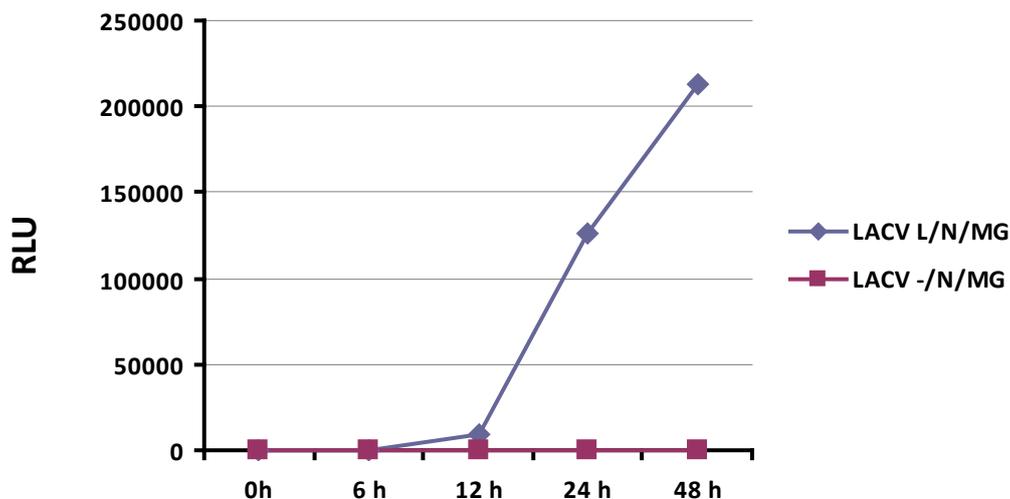
Dargestellt ist die der Renilla-Luciferase-Aktivität, bezogen auf die relative Firefly-Luciferase-Aktivität 72 Stunden nach Transfektion. L = pl.18-OROV-cL, S = pl.18-OROV-cS, N = pl.18-OROV-cSmut, cMG = pT7-riboSM2-cMpro-cRL, vMG = pT7-riboSM2-vMpro-vRL, O = pUC19. Transfiziert wurde mit 3 µl/Ansatz FuGene 6 und FuGene HD.

In diesem Experiment zeigte sich ein Anstieg der Renilla-Luciferase-Aktivität in allen Ansätzen. In den Ansätzen, die mit pT7-riboSM2-cMpro-cRL (= cMG) transfiziert wurden, ist allerdings eine vielfach stärkere Aktivität festzustellen. In diesem Experiment ist die Renilla-Luciferase-Aktivität in allen Ansätzen, die mit Fugene HD transfiziert wurden, höher als in den Ansätzen, bei denen die Konstrukte mithilfe von Fugene 6 transfiziert wurden. Auch hier zeigt sich eine Renilla-Luciferase-Aktivität in den Ansätzen, die kein OROV-cL-Konstrukt zur Expression der viralen Polymerase enthalten.

In allen Versuchen, die mit den Konstrukten des OROV-Minireplikon-Systems durchgeführt worden waren, konnte keine Minireplikon-Aktivität gemessen werden. Um zu überprüfen, ob ein Defekt der BSR-T7-Zellen in Form einer verminderten oder einer eingestellten T7-Polymerase-Expression die Ursache dafür sind, wurden die Zellen mit den Konstrukten des LACV(LaCrosse Virus)-Minireplikon-Systems transfiziert, da dieses System bereits etabliert ist und nachweislich funktioniert (Blakqori et al. 2003). Im Gegensatz zu den OROV-cL- und den OROV-cS/cSmut-Expressionskonstrukten, die unter der Kontrolle eines CMV-Promotors transkribiert werden, werden die LACV-cL- und cN-Expressionskonstrukte wie das Minigenom unter der Kontrolle eines T7-Promotors zytoplasmatisch transkribiert. Die LACV-cL- und die cN-Expressionskonstrukte besitzen daher eine IRES, mit deren Hilfe die Translation ermöglicht werden kann, ohne dass eine Cap-Struktur am 5'-Ende des Transkriptes vorhanden ist.

Die Zellen wurden mit 0,3 µg LACV-Minigenom-Konstrukt (pT7-riboGB-LACV-vMpro-vRL), 0,3 µg LACV-cN-(pTM1-LACV-N-) und 0,3 µg LACV-cL-Konstrukt (pTM1-LACV-L) transfiziert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne LACV-cL-Konstrukt transfiziert, das für die Expression der viralen Polymerase verantwortlich ist.

Es wurden fünf Ansätze pro Versuchsreihe hergestellt, um den Anstieg der Aktivität der Renilla-Luciferase über einen Zeitraum von 0, 6, 12, 24, und 48 Stunden messen zu können.



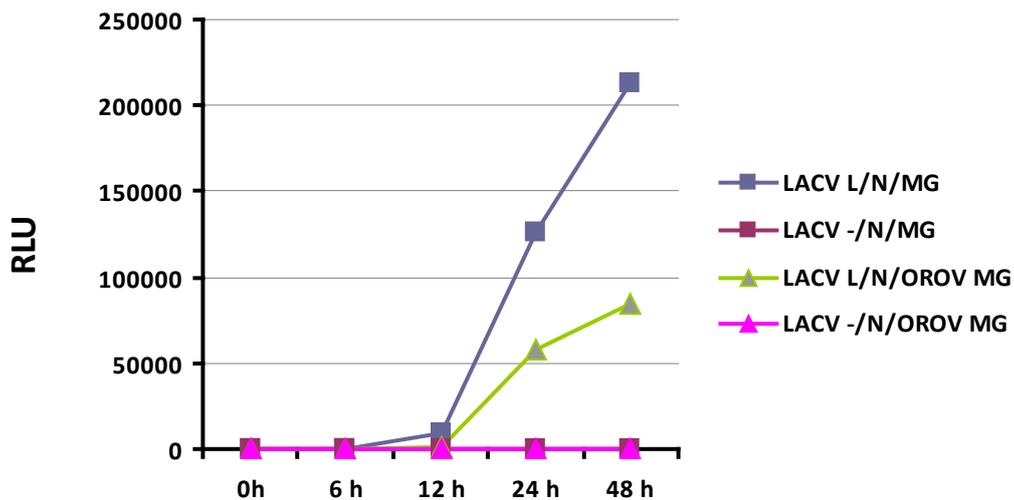
**Abbildung 40: Das LACV-Minireplikon-System**

*Gezeigt wird der Substratumsatz der Renilla-Luciferase nach 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden. LACV-L = pTM1-LACV-L, LACV-N = pTM1-LACV-N, LACV-MG = pT7-riboGB-LACV-vMpro-vRL, (-)=pl.18*

Nach Messung des Substratumsatzes der Renilla-Luciferase zeigte sich eine hohe Renilla-Luciferase-Aktivität nach 24 Stunden. Nach weiteren 24 Stunden ließ sich ein doppelt so hoher Substratumsatz messen. Es zeigte sich also ein deutlicher Anstieg der Renilla-Luciferase-Aktivität über den Zeitraum von 48 Stunden. In der Negativkontrolle, also dem Ansatz, in dem das LACV-L-Konstrukt zur Expression der viralen Polymerase fehlte, ließ sich wie erwartet keine Renilla-Luciferase-Aktivität messen. Da das LACV-Minireplikon-System in den BSR-T7-Zellen funktioniert hat, ist davon auszugehen, dass die Zellen für die Minireplikon-Versuche geeignet sind.

Weiterführend sollte nun die Funktionalität des OROV-Minigenom-Konstrukts pT7-riboSM2-vMpro-vRL überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung der LACV-cL- und der cN-Expressionskonstrukte (0,3 µg LACV-cL, 0,3 µg LACV-cN /Ansatz) statt des LACV-Minigenoms das OROV-Minigenom (pT7-riboSM2-vMpro-vRL; 0,3 µg/Ansatz) verwendet. Da es sich bei LACV und OROV um die gleiche Virusgattung (Orthobunyaviren) handelt, besteht die Möglichkeit, dass aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten die LACV-Polymerase in der

Lage ist, die regulatorischen Sequenzen der OROV-Genomsegmente zu erkennen und das Minigenom zu transkribieren. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz statt des LACV-cL-Konstruktes, das für die Expression der viralen Polymerase verantwortlich ist, der Vektor pl.18 transfiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen erneut mit den LACV-Minireplikon-System-Konstrukten (s. o.) transfiziert, jeweils mit und ohne LACV-cL-Expressionskonstrukt. Die Versuchsreihe wurde wie oben beschrieben fünfmal angesetzt, um die Renilla-Luciferase-Aktivität nach 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden messen zu können.



**Abbildung 41: „Gemischtes“ LACV/OROV-Minireplikon-System**

Gemessen wurde der Substratumsatz der Renilla-Luciferase nach 12, 24 und 48 Stunden. Um die Funktionalität des OROV-Minigenoms zu überprüfen, wurde das LACV-Minigenom gegen das OROV-Minigenom-Konstrukt ausgetauscht.

LACV-L = pTM1-LACV-L, LACV-N = pTM1-LACV-N, LACV-MG = pT7-riboGB-LACV-vMpro-vRL, (-) = pl.18, OROV-MG = pT7-riboSM2-vMpro-vRL.

Es zeigte sich, dass in Anwesenheit der LACV-Polymerase die Renilla-Luciferase-Aktivität über einen Zeitraum von 48 Stunden, auch unter Verwendung des OROV-Minigenoms, ansteigt. Die LACV-Polymerase ist demnach in der Lage, die M-Enden des OROV-Minigenoms zu erkennen und das Minigenom zu transkribieren. Im Falle der Abwesenheit des LACV-cL-Expressionskonstruktes konnte wie erwartet keine RL-Aktivität gemessen werden. Das reine LACV-Minireplikon-System zeigte im Vergleich zum gemischten OROV/LACV-Minireplikon-System eine höhere Effizienz, da größere Renilla-Luciferase-Aktivitäten erreicht wurden.

Die Versuche haben gezeigt, dass das Minigenom-Konstrukt pT7-riboSM2-vMpro-vRL durch die LACV-Polymerase transkribierbar ist und es zur Expression der Renilla-Luciferase kommt. Damit ist davon auszugehen, dass die regulatorischen M-Enden des OROV-Minigenom-Konstruktes intakt sind, da sie von der LACV-Polymerase erkannt worden sind.

## 3.2 Einfluss des OROV-NSs auf die IFN-Induktion

### 3.2.1 Interferon-Expression nach OROV-Infektion

In einem ersten Versuch wurden zunächst humane 293-Zellen mit Interferon-induzierenden Stimuli behandelt. Stimuliert wurde zum einen mit RNA, die aus Vesicular-stomatitis-Virus-(VSV-)infizierten Vero-Zellen isoliert worden war. Zum anderen wurde ein Interferon-induzierendes Virus, RVFV-Klon 13, eine NSs-Deletionsmutante des RVFV zu diesem Zweck verwendet. Als Kontrolle wurde mit zellulärer RNA aus uninfizierten Vero-Zellen stimuliert, wobei keine Induktion der Interferonexpression zu erwarten war.

Fünf Stunden später wurden die stimulierten Zellen dann mit dem OROV infiziert. Nach 18 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert (vgl. Kap. 2.2.14). Nach Reverser Transkription (vgl. Kap. 2.2.16) wurde mittels PCR untersucht, ob IFN- $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin-spezifische Transkripte amplifiziert werden konnten.

Zu diesem Zwecke wurden die folgenden Primer verwendet:

```
huIFNbeta_for:      gaggccgcattgaccatcta
huINFbeta_rev:     ccttaggatttccactctgact
```

```
hu_gamma-actin_for:  gccggtcgcaatggaagaaga
hu_gamma-actin_rev:  catggccgggggtgtgaaggtc
```

Nach Auftrennung der PCR-Ansätze in einer analytischen Agarosegel-Elektrophorese zeigten sich keine IFN- $\beta$ -Fragment-spezifischen Banden bei allen Proben, die mit OROV infiziert worden waren. Bei allen mit OROV infizierten Zellen wurde folglich die Interferon-Expression gehemmt.

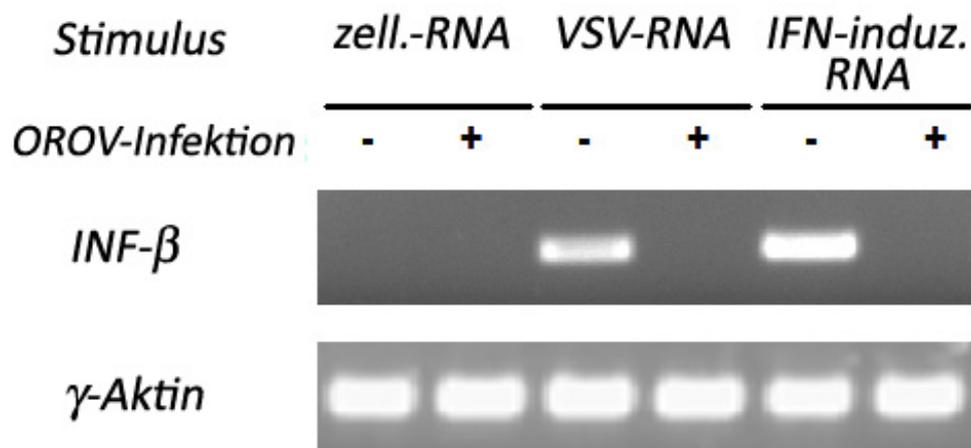


Abbildung 42: Agarosegel-Elektrophorese nach RT-PCR zum Nachweis von IFN- $\beta$  - und  $\gamma$ -Aktin-spezifischen cDNA-Fragmenten

Als Kontrolle wurde die Expression des  $\gamma$ -Aktins untersucht. Unabhängig von der Infektion mit OROV zeigte sich in allen Ansätzen ein positives Signal gleicher Stärke, d.h., dass die beobachteten Unterschiede bezüglich der IFN- $\beta$  Transkripte nicht auf den Einsatz unterschiedlicher RNA- bzw. cDNA-Mengen zurückzuführen sind.

### 3.2.2 Charakterisierung der IFN-antagonistischen Aktivität von OROV-NSs

Um einen möglichen Einfluss des OROV-NSs auf die Induktion des IFN- $\beta$ -Promotors in einem virusfreien Kontext näher untersuchen zu können und Aussagen über den Interferon-Expression-hemmenden Effekt des OROV-NSs in unterschiedlichen Zelllinien zu gewinnen, wurde die OROV-NSs-Sequenz kloniert.

#### 3.2.2.1 Klonierung der OROV-NSs-cDNA in pcDNA3.1

Zunächst wurde die RNA aus OROV-infizierten murinen IFNAR-/- („Interferon  $\alpha/\beta$ -Receptor knock-out“) und VeroE6-Zellen (African Green Monkey, Nierenzellen) isoliert und mithilfe der Superscript-III-Reversen-Transkriptase (RT, Invitrogen) in cDNA umgeschrieben (vgl. Kap. 2.2.16). Um nun die OROV-NSs-Sequenz zu erhalten, wurde eine PCR mithilfe einer Proofreading-Polymerase (Pfx, Invitrogen) unter Verwendung von spezifischen Primern durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.8). Für die Herstellung der Primer wurde auf OROV-Sequenzen aus GenBank (NC\_005777) zurückgegriffen.

```
Orov-nss_for      atgtaccacaacggactacatctacat
Orov-nss_rev      ctaggtatcctaacagacggtgc
```

Da keine spezifischen Antikörper (AK) zum Nachweis von OROV-NSs verfügbar sind, erfolgte zusätzlich eine Klonierung von modifizierten NSs-Konstrukten mit immunogenem FLAG-Tag, der sich mittels kommerziell erhältlicher AK nachweisen lässt. Zu diesem Zweck wurde eine PCR mithilfe der Pfx-Polymerase (Invitrogen) und mit spezifischen Primern durchgeführt (Orov-nss\_for und orov-NSs-flag\_rev, Orov-nss\_rev und flag-orov-nss\_for), mit deren Hilfe die FLAG-Sequenz N- bzw. C-terminal an die OROV-NSs cDNA angefügt wird.

```
orov-nss-flag_rev  CTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGGTATCCTGACAGACGGTGC
flag-orov-nss_for  ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTACCACAACGGACTACATCTACAT
```

Parallel hierzu wurde eine Amplifikationsreaktion mit  $\gamma$ -Aktin-Sequenz-spezifischen Primern durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgreich war.

Bei den PCR-Ansätzen, bei denen die RNA ursprünglich aus den Vero-Zellen stammte, wurden folgende Primer eingesetzt:

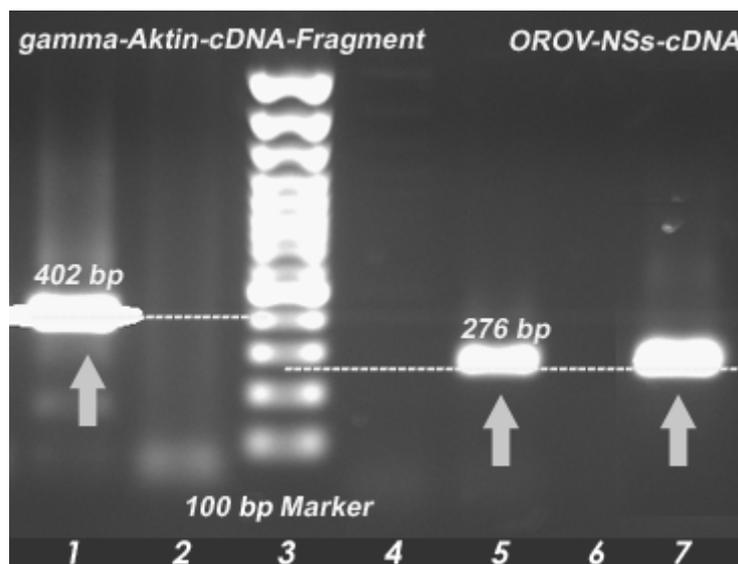
```
hu_gamma-actin_for  gccggtcgcaatggaagaaga
hu_gamma-actin_rev  catggccgggtgttgaaggtc
```

Bei den PCR-Ansätzen, bei denen die RNA aus den IFNAR<sup>-/-</sup>-Zellen stammten, wurden folgende Primer eingesetzt:

```
mu_gamma-actin_for      gccgatcgcaatggaagaaga
mu_gamma-actin_rev      catggctggggtattgaaggtt
```

Im Folgenden wird die Klonierung der NSs-cDNA ohne FLAG-Tag beschrieben, die Klonierung der Konstrukte mit FLAG-Tag erfolgte analog.

Im Anschluss an die Amplifikation wurde eine analytische Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.9), um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Erwartet wurde bei einer erfolgreichen OROV-NSs-Amplifikation (cDNA) ein Produkt mit der Größe von 276 bp sowie bei erfolgreicher Amplifikation des  $\gamma$ -Aktin-(cDNA-)Fragmentes ein Produkt mit der Größe von 402 bp.

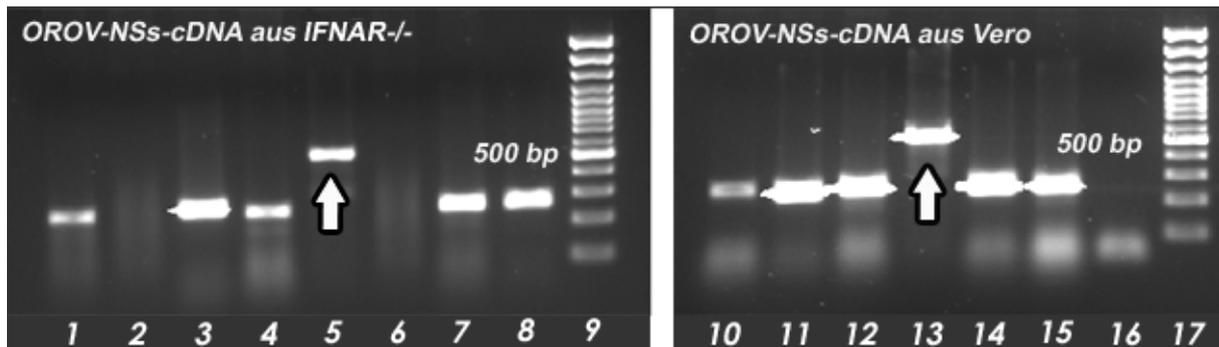


**Abbildung 43: Agarosegel-Elektrophorese der Amplifikation der OROV-NSs-cDNA**

Spur 1: PCR-amplifiziertes  $\gamma$ -Aktin-cDNA-Fragment, Spur 2: Wasserkontrolle, Spur 3: 100 bp-Marker, Spur 4: leer, Spur 5: OROV-NSs-Amplifikat aus VeroE6-cDNA, Spur 6: Wasserkontrolle, Spur 7: OROV-NSs Amplifikat, ausgehend von IFNAR<sup>-/-</sup> cDNA.

Es zeigten sich Banden in der Größe des OROV-Nss und des  $\gamma$ -Aktin im Gelbild als Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation aus der cDNA. Da die mithilfe der Pfx-Polymerase amplifizierten Produkte glatte Enden besitzen, wurden im Anschluss A-Nukleotide an den 3'-Enden angefügt, indem der PCR-Ansatz mit 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase (1 U, Eppendorf) für 15 Minuten bei 72 °C inkubiert wurde. Mithilfe des pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA-Expression-Kits (Invitrogen, vgl. Kap. 2.2.7.1) wurde anschließend das Amplifikationsprodukt zunächst in den TOPO-Vektor pcDNA 3.1 ligiert. Die Ligationsansätze wurden dann in kompetente TOP10- und XL1-

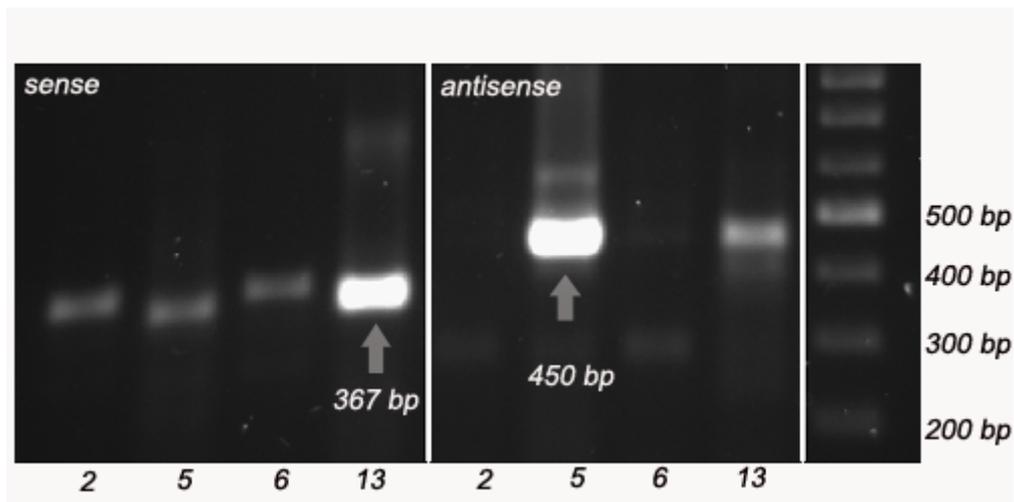
blue-Bakterienzellen transformiert (vgl. Kap. 2.2.2) und diese auf LB-Amp-Platten über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Ausgewählte Kolonien wurden in 5 ml LB-Amp-Flüssigkultur angeimpft. Parallel dazu wurde eine Colony-PCR (vgl. Kap. 2.2.8) unter Verwendung der Primer T7\_for (5'-TTAATACGACTCACTATAGGG-3') und BGH\_rev (5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3') durchgeführt, mit deren Hilfe überprüft wurde, ob die OROV-cDNA in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors ligiert wurde. Die Regionen, in denen die Primer binden, befinden sich vor und hinter der MCS im Vektor, sodass im Falle einer erfolgreichen Ligation des Inserts in die MCS des Vektors dieses als PCR-Produkt nachzuweisen ist.



**Abbildung 44: Agarosegel-Elektrophorese: OROV-NSs-cDNA in pcDNA 3.1**

Agarosegel-Elektrophorese der Colony-PCR-Ansätze zur Erfolgskontrolle der Ligation der amplifizierten OROV-NSs-cDNA in den TOPO-Vektor pc-DNA 3.1. Spur 1–8: Klone 1–8 (ausgehend von OROV-infizierten IFNAR<sup>-/-</sup>-Zellen), Spur 9: 100 bp-Marker, Spur 10–15: Klone 1–6 (ausgehend von OROV-infizierten Vero-Zellen), Spur 16: Wasserkontrolle, Spur 17: 100 bp-Marker. Eine Insertion von OROV-NSs liegt vor, wenn sich eine Bande bei 500 bp zeigt wie im Falle der Klone 5 und 13. Liegen die Bande bei 265 bp (Größe des Vektors, Spur 1, 3, 4, 7, 8, 10–12, 14 und 15), ist das Insert im Vektor nicht enthalten.

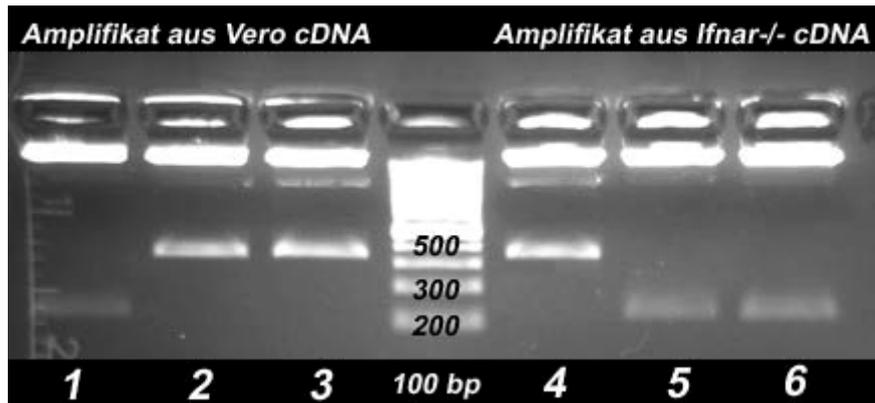
Von den Klonen 2, 5, 6 und 13 wurde eine Übernachtkultur (ÜNK) in LB-Amp-Nährmedium angesetzt, und dann wurde mithilfe einer Minipräparation die Plasmid-DNA isoliert (vgl. Kap. 2.2.4). Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in zwei weiteren PCR-Ansätzen auf die Orientierung des Inserts im Vektor untersucht. Mit den Primern T7\_for/orov-nss\_rev wurde auf *sense*-Orientierung getestet. Bei *sense*-Orientierung des Inserts wurde im Gelbild der Agarosegel-Elektrophorese eine Bande in der Größe von 357 bp erwartet. Mit dem Primerpaar BGH\_rev/orov-nss\_for wurde auf eine *antisense*-Orientierung des OROV-NSs im Vektor getestet. Im Falle einer *antisense*-Orientierung des Inserts im Vektor wurde im Gelbild eine Bande bei 430 bp erwartet.



**Abbildung 45: Agarosegel-Elektrophorese: OROV-NSs cDNA im Vektor pcDNA3.1.**

Agarosegel-Elektrophorese einer diagnostischen PCR zur Überprüfung der Orientierung der OROV-NSs-cDNA im Vektor pcDNA3.1. Spur 1 bis 4 zeigen den PCR-Ansatz der Klone 2, 5, 6 und 13, bei denen die Primer zur Ermittlung der sense-Orientierung des Inserts eingesetzt wurden. Spur 5 bis 8 zeigt den PCR-Ansatz der Klone 2, 5, 6 und 12, bei denen die Primer zur Ermittlung der antisense-Orientierung verwendet wurden. Spur 9 zeigt den 100 bp-Marker. In Klon 12 liegt das Insert in sense-Orientierung (367 bp), in Klon 5 in antisense-Orientierung (450 bp) vor.

Da aus der Klonierung mit dem mit Pfx-Polymerase erzeugten Amplifikat nur zwei positive Klone gewonnen wurden, die das OROV-NSs enthalten (einen Klon [12] in sense- und einen in antisense-Orientierung [5] im Vektor), wurde in einem weiteren Ansatz OROV-NSs mithilfe der Taq-Polymerase (Eppendorf) aus IFNAR<sup>-/-</sup>- und Vero-Zell-cDNA amplifiziert (vgl. Kap. 2.2.8). Es folgte die Ligation in den TOPO-Vektor pCR3.1 und die Transformation in kompetente XL1-blue-Bakterienzellen (vgl. Kap. 2.2.2). Die Bakteriensuspensionen wurden auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Es wurden jeweils drei gewachsene Klone in LB-Amp-Flüssigmedium angezchtet. Die Plasmid-DNA wurde mithilfe von Minipräparationen isoliert (vgl. Kap. 2.2.4). Zur Kontrolle der Ligation der OROV-NSs-cDNA in den Vektor wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I durchgeführt. Diese Enzyme schneiden in der Multiple cloning site (MCS) des Vektors. Im Falle der Anwesenheit des OROV-NSs im Vektor wird die OROV-NSs-cDNA herausgeschnitten und kann nach Agarosegel-Elektrophorese als Bande in der Größe von ca. 500 bp nachgewiesen werden. Im Gelbild zeigt sich, dass die Klone 2 und 3 (aus Vero-Zell-cDNA) und der Klon 4 (IFNAR<sup>-/-</sup> Zell-cDNA) die OROV-NSs-cDNA enthalten.



**Abbildung 46: Agarosegel-Elektrophorese: OROV-NSs in pcDNA3.1**

Agarosegel-Elektrophorese der pcDNA3.1-OROV-NSs-Plasmid-DNA nach Verdau mithilfe der Enzyme BamHI und XhoI zum Nachweis des OROV-NSs-Inserts. Die Spur 1 bis 3 zeigt die Klone 1 bis 3 (Amplifikat aus Vero-cDNA), die Spur 4 zeigt den 100 bp-Marker, die Spur 5 bis 7 zeigt die Klone 4 bis 6 (Amplifikat aus IFNAR-/- cDNA).

Im Anschluss wurden die Minipräparationen der Klone 12 (Pfx-Polymerase/*sense*-Orientierung), 5 (Pfx-Polymerase/*antisense*-Orientierung) und 2-4 (Taq-Polymerase) für die Sequenzierung vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden pro Probe zwei Ansätze angefertigt. Dem einen wurde jeweils der T7\_for-Primer und dem anderen jeweils der BGH\_rev-Primer (vgl. Kap. 2.2.7.1) hinzugefügt. Damit wurde erreicht, dass die Sequenzen vollständig sequenziert und so im Vergleich Mutationen von Sequenzierfehlern differenziert werden können. Pro Ansatz wurde 0,6 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Seqlab in Göttingen.

#### **Sequenzierungsergebnisse OROV-NSs in pcDNA 3.1:**

Für die Überprüfung der OROV-NSs-Sequenzen wurden die Sequenzen zweier OROV-Stämme als Referenzsequenzen verwendet: zum einen der Stamm TRVL 9760 (AF164531), zum anderen die OROV-S-Referenzsequenz des Stammes BeAn19991 (GenBank NC\_005777). Diese Sequenz unterscheidet sich von der des Stammes TRVL 9760 (GenBank AF164531) durch drei Punktmutationen, die nach Translation keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des OROV-NSs haben. Dabei handelt es sich also um stille Mutationen, erstens in der Position 104, die ein Cytosin statt eines Adenosins, zweitens in der Position 287, die ein Guanin statt eines Adenosins, und drittens in der Position 318, die ein Cytosin statt eines Thymins aufweist.

Wie die Sequenzierungsergebnisse zeigten, waren die Sequenzen der fünf OROV-NSs-Klone identisch mit der des Stammes TRVL 9760 (GenBank AF164531). Die Sequenz des Klons 12 wies eine Punktmutation (Position 308: Adenin statt Guanin) auf. Diese hat als stille Punktmutation allerdings keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Klon 3 und 4 wiesen keine Abweichungen auf. Klon 3 lag in *sense*-Orientierung im Vektor und Klon 4 in *antisense*-Orientierung vor. Die anderen Sequenzen enthalten Punktmutationen, die sich auf

die Aminosäuresequenz auswirken und daher möglicherweise auch die NSs-Funktion beeinflussen.

Die Plasmide aus den Klonen 4 und 12 wurden erneut in XL1-blue-kompetente Bakterien transformiert und zum Zweck einer Midipräparation in 50 ml LB-Amp-Medium angezüchtet (vgl. Kap. 2.2.4.2).

#### **Sequenzierungsergebnisse OROV\_NSs-Flag- und Flag-OROV\_NSs-Sequenzen:**

Wie die Sequenzierungsergebnisse zeigten, enthielten die Klone 1 (*sense*-Orientierung), 5 (*antisense*-Orientierung) und 8 (*antisense*-Orientierung) OROV-NSs-Sequenzen mit dem 3'-terminalen FLAG-tag, die ansonsten aber die gleiche Sequenz wie der Referenzstamm TRVL 9760 AF164531 aufwiesen. Klon 2 wies eine Deletion auf und Klon 3 eine Punktmutation im Startcodon.

Bei den Sequenzen des OROV-NSs mit dem 5'-terminalen FLAG-tag enthielten die Klone 11 und 16 (*sense*-Orientierung) und die Klone 13 und 15 (*antisense*-Orientierung) die gleiche Sequenz wie der Referenzstamm TRVL 9760 AF164531. Zwei Klone wiesen Deletionen von drei nachfolgenden Nukleotiden im FLAG-tag auf.

Die anderen Klone der OROV-NSs\_flag- und Flag\_OROV-NSs-Klonierungen enthielten Abweichungen von der Referenzsequenz wie Punktmutationen und Deletionen, die nach Translation zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen würden, sodass die Synthese eines funktionalen NSs-Proteins mit FLAG-tag mit diesen Konstrukten nicht möglich ist.

#### **3.2.2.2 Umklonierung der OROV-NSs-cDNA aus pcDNA3.1-OROV-NSs in den eukaryontischen Expressionsvektor pl.18**

Aus Versuchen mit Bunyamwera- und RVFV-NSs weiß man, dass nach Transfektion der entsprechenden pcDNA3.1-Konstrukte nur eine sehr geringe Expression der viralen Proteine stattfindet. Grund hierfür ist wahrscheinlich die Hemmung der zellulären RNA-Polymerase II durch das Bunyamwera bzw. RVFV NSs-Protein, sodass die hCMV-IE-Promotor-(humanes Cytomegalie-Virus immediate early Promotor-)gesteuerte NSs-Expression gehemmt wird. Weiterhin enthalten Bunyaviren kryptische Splice Stellen in ihrem Genom. Diese haben unter den Bedingungen des viralen Replikationszyklus keine Relevanz für die Transkription, da Bunyaviren zytoplasmatisch replizieren. Unter den künstlich geschaffenen Bedingungen einer Plasmid-basierten Expression jedoch werden diese Stellen möglicherweise im Zellkern während der Prozessierung des Primärtranskripts vom Spliceapparat der Zelle erkannt und benutzt. Die virale Sequenz wird somit zerstört, indem sie an den Splice Stellen geschnitten wird. Im Gegensatz dazu besitzt der pl.18-Expressionsvektor zusätzlich ein CMV-Intron zwischen dem Promotor und der MCS. Die Konsequenz ist, dass zum einen die RNA mit Intron stabiler ist, zum anderen veranlasst dieses den Spliceapparat bevorzugt, das tatsächliche Intron zu schneiden, sodass die virale Sequenz intakt bleibt.

Für die Klonierung wurden zunächst 2 µg pl.18-Vektor und 10 µg pcDNA3.1-OROV-NSs *sense* (Klon 12, stille Punktmutation) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I bei 37 °C für 1,5 Stunden inkubiert. Dies wurde durchgeführt, um zum einen mithilfe der im Plasmid vorhandenen Schnittstellen die OROV-NSs-cDNA aus dem TOPO-Vektor pcDNA 3.1 herauszuschneiden und den pl.18 Expressionsvektor über die gleichen Schnittstellen zu linearisieren.

Anschließend wurde eine Gelreinigung durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.10), die OROV-NSs-cDNA isoliert und anschließend die DNA-Konzentration im UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop) bestimmt.

Danach wurde der gereinigte linearisierte pl.18-Vektor (pl.18x*Bam*HI/*Xho*I) mithilfe der Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) dephosphoryliert (vgl. Kap. 2.2.6), um die Religation von einfach verdautem Vektor zu verhindern. Die Konsequenz wäre sonst nach Transformation des Ligationsansatzes (s. u.) eine sehr hohe Anzahl von Klonen, ohne das gewünschte Insert zu bekommen.

Für die Ligation (Rapid-Ligation-Kit, Fermentas) wurden nun drei Kontrollansätze und der eigentliche Ligationsansatz durchgeführt:

1. In der Mock-Ligation wurde phosphorylierter pl.18-Vektor, *Bam*HI/*Xho*I, verdaut, verwendet, jedoch kein OROV-NSs als Insert und keine Ligase. Die Erwartung war, dass keine Klone auf den LB-Amp-Platten zu sehen wären, da linearisierter Vektor nur sehr ineffizient in die Bakterienzelle gelangen kann.
2. Als Religationskontrolle wurde phosphorylierter pl.18-Vektor, *Bam*HI/*Xho*I, verdaut, verwendet. Die Erwartung war, dass bei vollständigem Verdau keine Ampicillin-resistenten Klone erhalten würden. Die Anzahl der Klone ist somit umgekehrt proportional zur Effizienz des Doppelverdaus.
3. Als Dephosphorylierungskontrolle wurde dephosphorylierter pl.18-Vektor, *Bam*HI/*Xho*I, verdaut, verwendet. Die Erwartung war, dass sich keine Klone bzw. erheblich weniger Klone als im vorhergehenden Ansatz zeigen würden, da dephosphorylierter Vektor nicht mehr religieren kann, selbst wenn kompatible DNA-Enden vorliegen.
4. Für die eigentliche Reaktion wurde 88 ng dephosphorylierter pl.18, *Bam*HI/*Xho*I und 26 ng OROV-NSs, *Bam*HI/*Xho*I, verdaut, was einem stöchiometrischen Verhältnis von Vektor : Insert von 1 : 3 entspricht. Hier wurden nun Klone erwartet, da das Insert über den Phosphatrest am 5'-Ende nun in den Vektor mithilfe der Ligase ligiert werden kann. Das Plasmid liegt nun wieder in zirkulärer Form vor und kann von den Bakterien aufgenommen werden. Der entstehende Nick zwischen dephosphorylierten 5'-Enden des Vektors und den 3'-Enden des Inserts wird schließlich von der Bakterienzelle erkannt und repariert.

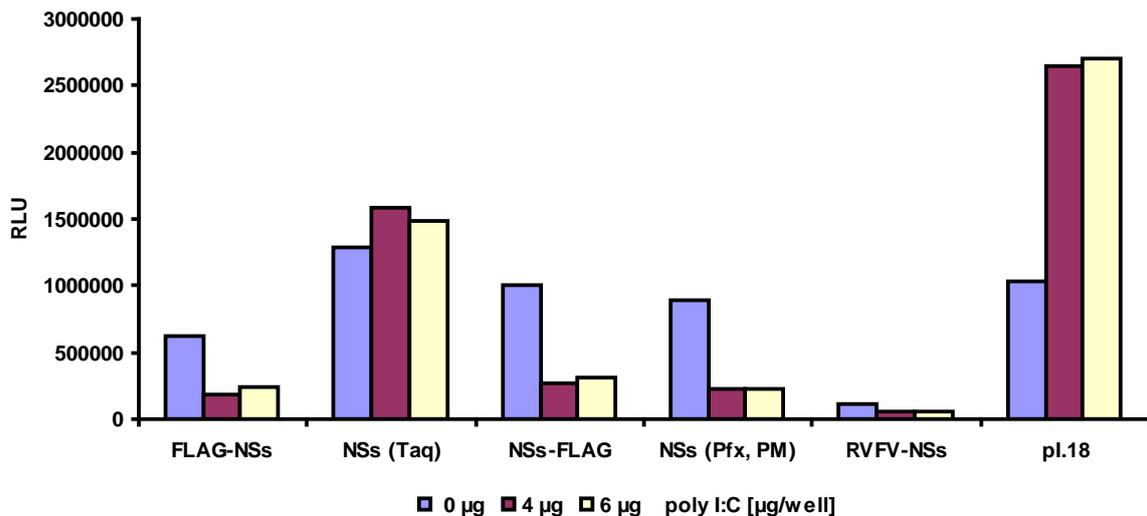


men. Dies erfolgte mithilfe eines Luciferase-Reporterassays (vgl. Kap. 2.3.3), bei dem eine Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors zur Expression der Firefly-Luciferase (FF-Luciferase) führt. Wird diesem Enzym das entsprechende Substrat hinzugefügt, ist der Substratumsatz als Lichtemissionen messbar und stellt ein indirektes Maß für die Aktivität des IFN- $\beta$ -Promotors dar. Hohe Werte stehen für einen hohen Substratumsatz und damit eine hohe Promotoraktivität. Niedrige Werte stehen entsprechend für einen geringen Substratumsatz und damit eine niedrige Promotoraktivität.

Als Interferon-induzierender Stimulus wurde synthetische Doppelstrang-(ds-)RNA (poly(I:C)) eingesetzt. Da die stimulatorische Kapazität von poly(I:C) abhängig von der jeweiligen Präparation ist, musste zunächst die optimale Menge der dsRNA für die Stimulation ermittelt werden.

Hierzu wurden VeroE6-Zellen in 6-Kavitäten-Platten mit 0  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 6  $\mu$ g, 8  $\mu$ g und 10  $\mu$ g dsRNA stimuliert. Die Zellen waren 24 Stunden zuvor mit je 0,5  $\mu$ g des Plasmids pl.18 sowie des IFN- $\beta$ -Promotor-Reporterplasmids p125 luc und 0,05  $\mu$ g des Reporterplasmids pRLSV 40 luc (konstitutiv aktiver SV40-Promotor, Renilla-Luciferase) je Kavität transfiziert worden. Es wurde in dieser Versuchsreihe eine Konzentration von 4  $\mu$ g/well (6-well-Platten) bzw. Ansatz als optimal für die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors ermittelt.

Um zu ermitteln, inwieweit sich die klonierten OROV-NSs-Konstrukte (OROV-NSs/Taq-Polymerase amplifiziert, OROV-NSs mit PM/Pfx-Polymerase amplifiziert) sowie die modifizierten OROV-NSs-Konstrukte (OROV-NSs-FLAG/FLAG-OROV-NSs) in ihrer IFN-antagonistischen Aktivität unterscheiden, wurden sie in 293T-Zellen transfiziert und anschließend wurden die Zellen mit poly(I:C) stimuliert. Als Negativkontrolle (d.h., es wurde keine Hemmung der IFN- $\beta$ -Promotoraktivierung erwartet) wurde das Plasmid pl.18 transfiziert. Als Positivkontrolle wurde pl.18-RVfV-NSs-FLAG, ein Expressionsplasmid für RVfV-NSs, transfiziert, da für RVfV-NSs eine Hemmung der Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors bereits nachgewiesen worden war. Zu diesem Zweck wurden in Zellkulturplatten mit sechs Kavitäten  $6 \times 10^5$  293T-Zellen/Kavität kultiviert. Die subkonfluenten Kulturen wurden dann nach 24 Stunden mit 0,5  $\mu$ g der OROV-NSs-Expressionskonstrukte, 0,5  $\mu$ g des RVfV-NSs-Expressionskonstrukts und 0,5  $\mu$ g des Plasmides pl.18 sowie 1  $\mu$ g des IFN- $\beta$ -Promotor-Reporterplasmids p125 luc je Kavität transfiziert. Nach 24 Stunden wurde mit 4  $\mu$ g und 6  $\mu$ g synthetischer dsRNA/Ansatz stimuliert. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen lysiert und mithilfe des Dual Luciferase Assay die Luciferase-Aktivitäten bestimmt (vgl. Kap. 2.3.3).



**Abbildung 48: Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors in 293T-Zellen nach Stimulation mit synthetischer dsRNA**

Es wurden verschiedene Konzentrationen (0  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 6  $\mu$ g) synthetischer dsRNA (poly(I:C)) eingesetzt, jeweils entsprechend in Anwesenheit der NSs-Konstrukte (FLAG-NSs, NSs-FLAG, NSs(Taq/Pfx)) und im Vergleich mit einem RVFV-NSs-Konstrukt (Positivkontrolle) und dem pl.18-Leervektor. Gemessen und dargestellt wurde der Substratumsatz der FF-Luciferase als indirektes Maß für die Promotoraktivität.

Es konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass unter Einsatz von 4  $\mu$ g bzw. 6  $\mu$ g synthetischer dsRNA im Vergleich mit dem unstimulierten Ansatz die IFN- $\beta$ -Promotoraktivität um das 3-Fache stimuliert werden konnte (pl.18-Ansatz). Bei gleichzeitiger Expression konnte erstmals eine Hemmung der IFN- $\beta$ -Promotoraktivität durch OROV-NSs nachgewiesen werden. Auffällig war, dass OROV-NSs die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors in den mit dsRNA stimulierten Ansätzen komplett hemmte. Die IFN- $\beta$ -Promotoraktivität war in diesen Ansätzen gleich (NSs Taq) oder niedriger (FLAG-NSs, NSs-FLAG, NSs (Pfx)) nach Stimulation mit dsRNA im Vergleich zu den Ansätzen ohne Stimulation. Das als Positivkontrolle eingesetzte RVFV-NSs hemmte die Aktivität des IFN- $\beta$ -Promotors noch stärker als OROV-NSs.

Im Vergleich mit dem OROV-NSs-Konstrukt (Taq-Polymerase) hemmten die OROV-NSs-Konstrukte (Pfx-Polymerase) mit der stillen PM und die modifizierten OROV-NSs-FLAG- bzw. FLAG-OROV-NSs-Konstrukte deutlich effizienter. Der angefügte FLAG-Tag hat, wie sich zeigte, keinen Funktionsverlust zur Folge, sodass sich NSs-Tag wie authentisches NSs verhält. Daher wurden diese OROV-NSs-Konstrukte für die weiteren Versuche verwendet.

Zur Charakterisierung der IFN-antagonistischen Aktivität des OROV-NSs wurden nun Versuchsreihen mit zwei Zelllinien, 293- und VeroE6, wie folgt durchgeführt.

Die Zellen wurden in 12-Kavitäten-Platten mit je  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Kavität ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurde 1  $\mu$ g/Ansatz des Reporterplasmids p125 luc für die Expression der FF-Luciferase unter Kontrolle des IFN- $\beta$ -Promotors transfiziert. Parallel wurde nun 12,5 ng/Ansatz eines zweiten Reporterplasmids pRLSV40 transfiziert, das der Expression der

Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40-Promotors dient. Der Substratumsatz der Renilla-Luciferase stellt ein Maß für die Transfektionseffizienz dar und ist unabhängig von der FF-Luciferase-Aktivität. Ein Zellschwund durch die Toxizität der synthetischen dsRNA, Schwankungen in der Zellzahl oder eine ineffiziente Transfektion können dann in Form einer verminderten Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen werden. Je vier der Versuchsansätze wurden mit 0,5 µg pl.18 als Leervektor und 0,5 µg der Expressionskonstrukte OROV-NSs (Pfx/PM) und RVFV-NSs transfiziert (s. Kap. 2.3.2). Pro Ansatz wurden 50 µl OPTIMEM zur Verdünnung und 4 µl FuGene HD zur Transfektion der Konstrukte in die Zelle verwendet. Es wurden OPTIMEM, die Reporterplasmide, die Expressionskonstrukte und das FuGene HD zu einem Reaktionsansatz vereint und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Ansätze wurden dann auf die Zellen gegeben und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Ansätze mit Typ I- IFN-induzierender synthetischer dsRNA und zum Vergleich mit VSV-RNA aus infizierten Vero-Zellen stimuliert. Diese Stimuli wurden verwendet, da sie über zwei unterschiedliche Proteine die Aktivierung des IFN-β-Promotors vermitteln. Zum einen über RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*) und zum anderen über MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*). Beide Proteine agieren als cytosolische Rezeptoren intrazellulärer dsRNA und als positive Regulatoren der antiviralen Immunantwort.

Der Sensor MDA5 erkennt die synthetische dsRNA poly(I:C). Im Gegensatz dazu erkennt der intrazelluläre Sensor RIG-I unmodifizierte 5'-Triphosphat-Reste viraler RNA als PAMP, wie sie z. B. bei VSV-RNA vorliegen. Die Signalwege haben gemeinsam, dass sie dieselben Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche die IFN-β-Synthese induzieren (s. Abbildung 1).

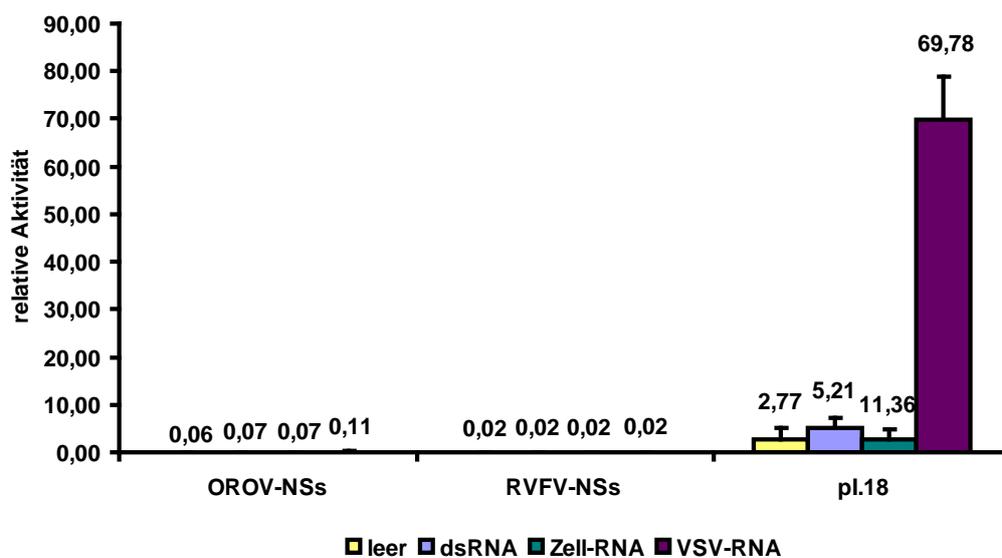
Als Kontrolle wurde zum einen mit Gesamt-RNA (die den IFN-β-Promotor nicht aktiviert) aus nicht infizierten VeroE6-Zellen stimuliert. Um auszuschließen, dass eine Transfektion von RNA unabhängig von der eingesetzten RNA zu einer Aktivierung des IFN-β-Promotors führt, wurde zum anderen ein Kontrollansatz ohne RNA-Transfektion durchgeführt. Es wurden je Ansatz 1 µg VSV-RNA und 1 µg zelluläre RNA eingesetzt. In dieser Versuchsreihe wurde 1,4 µg/Ansatz synthetischer dsRNA eingesetzt, da auf eine andere Charge poly(I:C) als bei den vorangegangenen Versuchen zurückgegriffen wurde.

Nach weiteren 16 Stunden wurden die Ansätze lysiert. Die Substrate für die FF-Luciferase und die Renilla-Luciferase wurden hinzugefügt und die Luciferase-Aktivitäten bestimmt (vgl. Kap.2.3.3).

Für die Berechnung und Darstellung wurden die Messwerte des Substratumsatzes der FF-Luciferase (indirektes Maß für die Aktivierung des IFN-β-Promotors) und die Messwerte des Substratumsatzes der Renilla-Luciferase (indirektes Maß für die Aktivität des konstitutiv aktiven SV40-Promotors) mehrerer unabhängiger Versuche zugrunde gelegt. Zunächst wurden die Rohdaten der Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert, indem sie durch den Renilla-

Luciferase Wert des Ansatzes mit dem Leervektor pl.18 ohne Stimulation einer ausgewählten Versuchsreihe geteilt wurden. Dann wurden die FF-Luciferase-Rohdaten auf die normalisierte Renilla-Luciferase-Aktivität bezogen, indem die einzelnen FF-Werte durch die jeweiligen normalisierten Renilla-Luciferase-Werte geteilt wurden. Damit wurden FF-Luciferase Werte gewonnen, bei denen ein möglicher Zellschwund durch den zytotoxischen Effekt der Stimulationsreagenzien, eine schwankende Zellzahl oder unterschiedliche Transfektionseffizienzen berücksichtigt worden sind.

Dadurch konnte die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors nach Stimulation als Vielfaches der Promotoraktivität des Kontrollansatzes des ausgewählten Experiments dargestellt werden. Die Mittelwerte dieser Datensätze werden in den Abbildungen Abbildung 49 Abbildung 52 und Abbildung 54 Abbildung 56 grafisch dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen angewendet. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  gewählt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist daher die Nullhypothese zu verwerfen, und es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchswerten.

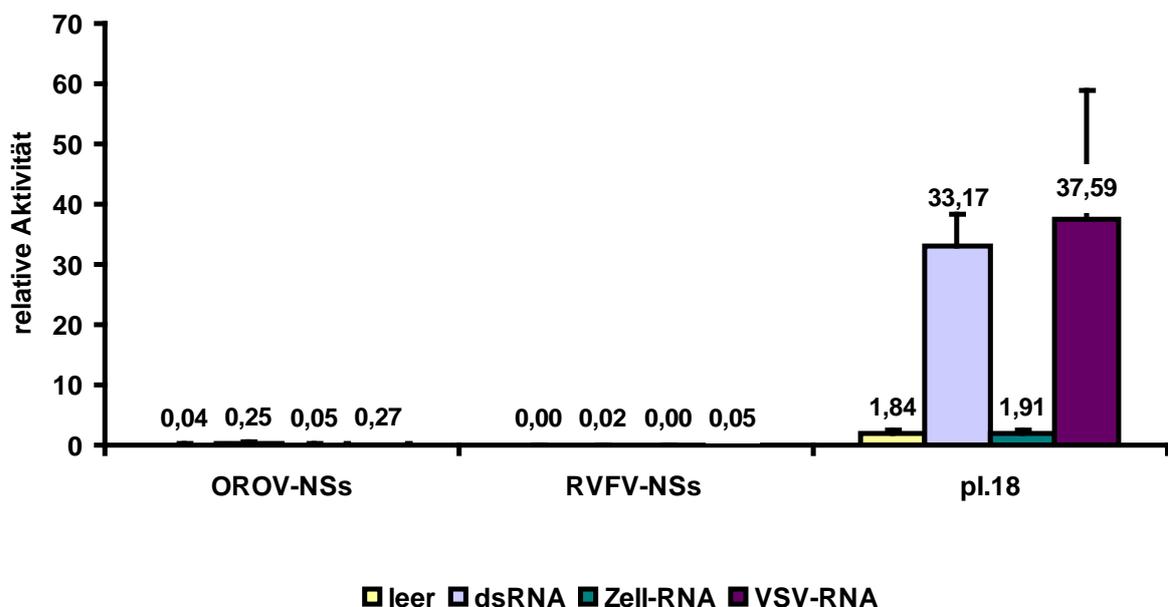


**Abbildung 49: Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors nach Stimulation in 293- Zellen**

Die Stimulation erfolgte mit Doppelstrang-RNA (dsRNA = poly(I:C)), zellulärer RNA aus VeroE6-Zellen (Zell-RNA) und RNA aus VSV-infizierten VeroE6-Zellen (VSV-RNA) bei gleichzeitiger Expression von OROV-NSs. Als Kontrollen wurde die Stimulation bei gleichzeitiger Expression von RVFV-NSs bzw. ohne Expression eines Nichtstrukturproteins (pl.18) durchgeführt. Den Berechnungen lagen fünf unabhängig durchgeführte Einzelexperimente zugrunde.

Abbildung 49 zeigt, dass durch die Stimulation mit VSV-RNA eine ca. 26-fache Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors im Vergleich zur Stimulation mit zellulärer RNA erreicht wird. Durch die Stimulation mit synthetischer dsRNA hingegen wurde zwar ebenfalls eine statistisch signifikante Aktivierung erreicht ( $p = 0,025$ ), jedoch nur um das 2-Fache. VSV-RNA ist also ein deut-

lich potenterer Stimulus in den 293-Zellen als synthetische dsRNA. Nach Stimulation mit zellulärer RNA kam es im Vergleich zu den Ansätzen ohne Stimulation zu keiner Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors, d.h., eine Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors durch das Transfektionsreagenz selbst kann somit ausgeschlossen werden. Des Weiteren zeigt die Positivkontrolle, dass die Expression von RVFV-NSs die IFN- $\beta$ -Promotor-abhängige Induktion der FF-Luciferase-Expression komplett und unabhängig vom Stimulus hemmte. In Anwesenheit des OROV-NSs-Konstruktes wurde die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors ebenfalls komplett gehemmt. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Aktivierung des Promotors, bei den mit VSV-RNA stimulierten Zellen in An- bzw. Abwesenheit des OROV-NSs ( $p = 0,0006$ ), ebenso bei den mit synthetischer dsRNA ( $p = 0,02$ ) stimulierten Zellen. Bei den mit VSV-RNA stimulierten Zellen zeigte sich in Anwesenheit von OROV-NSs eine geringfügig höhere Aktivität des Promotors (1,5-fache Aktivierung) als bei den nicht stimulierten Zellen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,35$ ).



**Abbildung 50: Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors nach Stimulation in VeroE6-Zellen**

Die Stimulation erfolgte mit Doppelstrang-RNA (dsRNA = poly(I:C)), zellulärer RNA aus VeroE6-Zellen (Zell-RNA) und RNA aus VSV-infizierten VeroE6-Zellen (VSV-RNA) bei gleichzeitiger Expression von OROV-NSs. Den Berechnungen lagen fünf unabhängig durchgeführte Einzelerperimente (Reporterassays) zugrunde.

Im Gegensatz zu den 293-Zellen zeigt sich bei VeroE6-Zellen im Vergleich zu mit zellulärer RNA stimulierten Zellen, dass durch die Stimulation mit synthetischer dsRNA eine nahezu gleich starke Aktivierung (17-fach) des IFN- $\beta$ -Promotors erreicht wurde wie durch die Stimulation mit VSV-RNA (19-fach). Im Vergleich der mit VSV-RNA bzw. synthetischer dsRNA stimulierten Zellen mit Zellen, die den Leervektor pl.18 enthielten, zeigt sich, dass die Expressi-

on des OROV-NSs-Konstrukts die Aktivierung des Promotors der mit VSV-RNA ( $p = 0,017$ ) und der mit synthetischer dsRNA ( $p = 0,01$ ) stimulierten Zellen hemmt.

In Anwesenheit von RVFV-NSs wird die Aktivierung des Promotors unabhängig vom Stimulus (VSV-RNA/zelluläre RNA:  $p = 0,0969$  und synthetische dsRNA/zelluläre RNA:  $p = 0,07882$ ) gehemmt. Auffällig war die Tatsache, dass in Anwesenheit der NSs-Proteine bereits die Grundaktivität des IFN- $\beta$ -Promotors stark herabgesetzt war (0,04 in Anwesenheit von OROV-NSs im Vergleich zu 1,84 ohne Expression eines Nichtstrukturproteins).

OROV-NSs hemmt die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors sowohl in der Zelllinie 293 als auch in VeroE6-Zellen. Die Unterschiede in der Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors zwischen den mit dem Plasmid pl.18 und den mit pl.18-OROV-NSs transfizierten Zellen sind statistisch signifikant. Im Vergleich zu RVFV-NSs ist OROV-NSs ein geringfügig schwächerer Inhibitor. OROV-NSs hemmt wie auch RVFV-NSs die Grundaktivität des IFN- $\beta$ -Promotors in beiden Zelllinien.

### **3.2.2.4 Einfluss des OROV-NSs auf die Transkriptionsfaktoren, die an der Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors beteiligt sind**

Um nun mehr über den Wirkmechanismus des OROV-NSs zu erfahren, wurde untersucht, ob OROV-NSs einen Einfluss auf die Aktivität artifizierlicher Promotoren hat, die selektiv von nur einem der Transkriptionsfaktoren (TF) aktiviert werden, die zur Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors benötigt werden. Hierbei handelt es sich um die Faktoren AP1-, NF $\kappa$ b-, und IRF3, die an die PRDs (positive regulatory domains: IV, III, I, II; s. Kap. 1.1.2.3) des IFN- $\beta$ -Promotors binden.

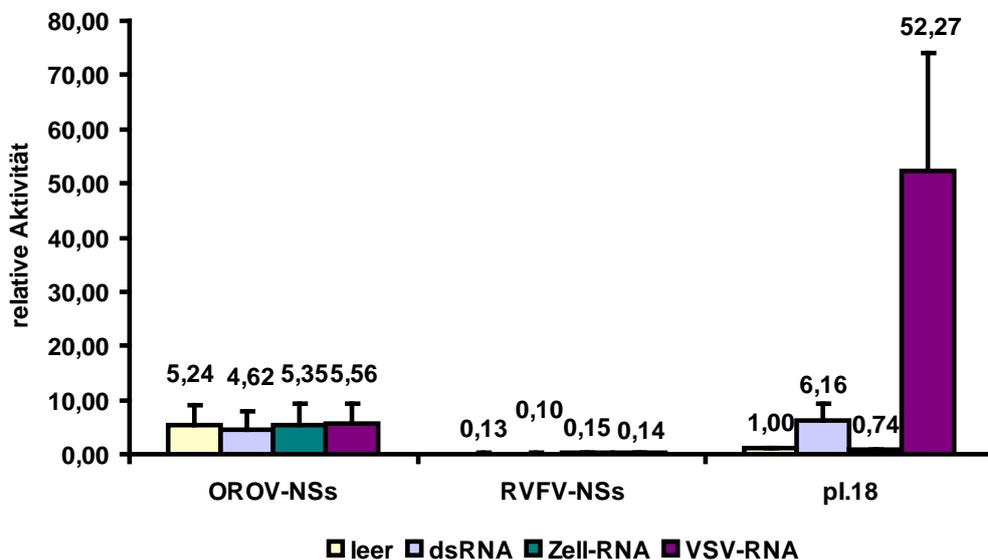
Es wurde daher untersucht, ob OROV-NSs in der Lage ist, die Aktivierung artifizierlicher Promotoren, die selektiv durch IRF-3, NF- $\kappa$ B und AP-1 aktivierbar sind, zu hemmen.

In Reporterassays wurden zu diesem Zweck artifizierliche Promotoren eingesetzt (s. Kap. 2.3.3), die mehrere Kopien der gleichen PRD für jeweils einen der genannten Transkriptionsfaktoren enthalten. Durch die Bindung von mehreren TFs des gleichen Typs ist eine Aktivierung des jeweiligen Promotors möglich. Die Aktivierung dieser Promotoren führt, wie bereits in Kapitel 2.3.3 beschrieben, zur Expression der FF-Luciferase, deren Aktivität nach Zugabe des Substrates quantitativ in Form von Lichtemissionen gemessen werden kann.

#### *3.2.2.4.1 Einfluss des OROV-NSs auf einen IRF 3-responsiven Promotor in 293-Zellen und VeroE6-Zellen*

In den Versuchen zur Ermittlung des Einflusses des OROV-NSs auf einen IRF3-responsiven Promotor wurde ein artifizierlicher Promotor mit PRD-III-Bindungsstellen im p55C1b luc Reporterplasmid verwendet. Transfiziert wurden 0,5  $\mu$ g des p55C1b-luc-Reporterplasmids und je 0,5  $\mu$ g der Expressionsvektoren mit den pl.18-OROV-NSs- und pl.18-RVFV-NSs-Konstrukten bzw. des Ausgangsplasmids pl.18 pro Ansatz. Zusätzlich wurden 0,05  $\mu$ g/Ansatz des Reporterplasmids pRLSV0 mit dem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Expression der Renilla-Luciferase cotransfiziert (vgl. Kap. 3.2.2.3).

Stimuliert wurden die 293- und Vero-Zellen mit 1,4 µg synthetischer dsRNA und 2 µg VSV-RNA pro Ansatz.



**Abbildung 51: Aktivierung eines IRF3-responsiven Promotors nach Stimulation in 293-Zellen**

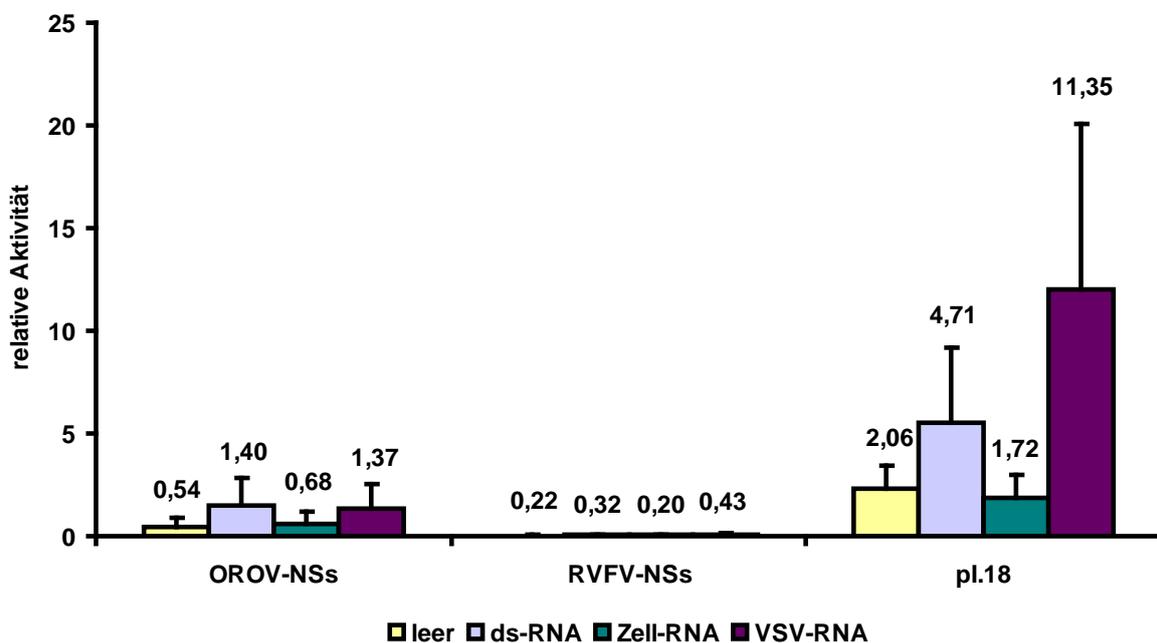
Die Stimulation erfolgte mit Doppelstrang-RNA (dsRNA=poly(I:C)), zellulärer RNA aus VeroE6-Zellen (Zell-RNA) und RNA aus VSV-infizierten VeroE6-Zellen (VSV-RNA) in Anwesenheit des OROV-NSs und RVFV-NSs. Den Berechnungen lagen vier unabhängig durchgeführte Einzelexperimente zugrunde. Wegen der starken Variabilität der Renilla-Luciferase-Aktivität in den Einzelexperimenten, wurde als Bezugsgröße für die Berechnungen der Mittelwert der Luciferase-Aktivitäten nach Transfektion mit pl.18 und Stimulation mit Gesamt-RNA aus VeroE6-Zellen anstelle eines Einzelwertes gewählt.

Abbildung 51 zeigt, dass durch die Stimulation der 293-Zellen mit VSV-RNA eine 70-fache Aktivierung des IRF3-responsiven Promotors im Vergleich zu Zellen, die mit zellulärer RNA stimuliert wurden, erreicht wurde. Die Stimulation mit synthetischer dsRNA der Zellen, die mit pl.18 transfiziert worden waren, erbrachte nur eine 8-fache Induktion bezüglich der Stimulation mit zellulärer RNA (VSV-/zell.RNA:  $p = 0,016$ , syn. dsRNA/zell.RNA:  $p = 0,024$ ). Im Vergleich zu den Werten der mit synthetischer dsRNA und VSV-RNA stimulierten Zellen zeigte sich eine komplette Hemmung der Promotoraktivität durch RVFV ( $p = 0,02$  [VSV-RNA],  $p = 0,02$  [sRNA]). RVFV-NSs war in der Lage, unabhängig vom verwendeten Stimulus (VSV-RNA bzw. dsRNA) die Aktivierung des IRF-3-responsiven Promotors vollständig zu unterdrücken

Das OROV-NSs hemmte die durch die Stimulation erreichte Aktivierung des Promotors. Eine statistische Signifikanz mit dem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  besteht allerdings nur bei den Werten der mit VSV-RNA stimulierten Zellen im Vergleich zu den Werten der stimulierten Zellen mit dem Leervektor pl.18 ( $p = 0,02$ ). Im Falle der mit synthetischer dsRNA-stimulierten Zellen bestand zwischen den Ansätzen mit und ohne OROV-NSs unter diesen Bedingungen

keine statistische Signifikanz ( $p = 0,53$ ). Es zeigte sich also bei der Stimulation mit dsRNA eine sehr viel geringere Effizienz als bei der Stimulation mit VSV-RNA.

Auffällig war allerdings, dass die Promotoraktivität der mit pl.18-OROV-NSs transfizierten und unstimulierten (5,24-fach) bzw. mit zellulärer RNA (7,2-fach) stimulierten Zellen deutlich höher war als in den unstimulierten bzw. mit zellulärer RNA stimulierten Ansätzen, bei denen das Ausgangsplasmid pl.18 transfiziert wurde. Verglichen mit den Werten der mit pl.18-RVFV-NSs transfizierten Ansätze, fiel auf, dass OROV-NSs ebenso effizient die Aktivierung des Promotors hemmte, allerdings war die Grundaktivität des IRF3-responsiven Promotors in Anwesenheit von OROV-NSs höher als in Anwesenheit von RVFV-NSs.



**Abbildung 52: Aktivierung eines IRF3-responsiven Promotors nach Stimulation in VeroE6-Zellen**

Die Stimulation erfolgte mit Doppelstrang-RNA (dsRNA = poly(I:C)), zellulärer RNA aus VeroE6 Zellen (Zell-RNA) und RNA aus VSV-infizierten VeroE6-Zellen (VSV-RNA) in Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs. Den Berechnungen lagen sechs unabhängig durchgeführte Einzelexperimente (Reporterassays) zugrunde.

Wie Abbildung 52 zeigt, führte eine Stimulation der mit dem Leervektor pl.18 transfizierten Zellen mit VSV-RNA im Vergleich zur Stimulation mit zellulärer RNA in den VeroE6-Zellen zu einer statistisch signifikanten ( $p = 0,02$ ), jedoch geringeren Aktivierung des Promotors als in den 293-Zellen. Die Stimulation mit synthetischer dsRNA bewirkte in den Zellen, verglichen mit den Werten der mit zellulärer RNA stimulierten Zellen, eine 2,7-fache Aktivierung. Unter der Festsetzung des Signifikanzniveaus  $\alpha = 0,05$  ist dieser Unterschied aber statistisch nicht signifikant ( $p = 0,11$ ). Das RVFV-NSs hemmt die Aktivierung des Promotors sehr effizient. Die Unterschiede zwischen den mit dsRNA bzw. VSV-RNA stimulierten Ansätzen, bei denen RVFV-NSs exprimiert wurde, und den Ansätzen, die mit dem Plasmid pl.18 transfiziert wur-

den, sind statistisch signifikant (dsRNA:  $p = 0,03$  , VSV-RNA:  $p = 0,01$ ). Im Vergleich der Werte der stimulierten mit den unstimulierten Zellen, die mit pl.18-RVFV-NSs transfiziert wurden, zeigte sich ein leichter Anstieg nach Stimulation um das 1,6-fache (dsRNA/ Zell-RNA) bzw. 2,2-fache (VSV-RNA/Zell-RNA). Dieser Anstieg ist jedoch statistisch nicht signifikant (dsRNA:  $p = 0,52$ , VSV-RNA:  $p = 0,25$ ).

OROV-NSs hemmte ebenfalls die Aktivierung des IRF3-responsiven Promotors. Die Unterschiede der Ansätze mit OROV-NSs transfiziert und mit VSV-RNA stimuliert wurden, verglichen mit den mit VSV-RNA stimulierten Ansätzen, die mit dem pl.18 Leervektor transfiziert wurden, sind statistisch signifikant ( $p = 0,017$ ). Allerdings ergaben die Unterschiede bei den Ansätzen, die mit synthetischer dsRNA stimuliert wurden, bei dem festgelegten Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  keine statistische Signifikanz ( $p = 0,08$ ).

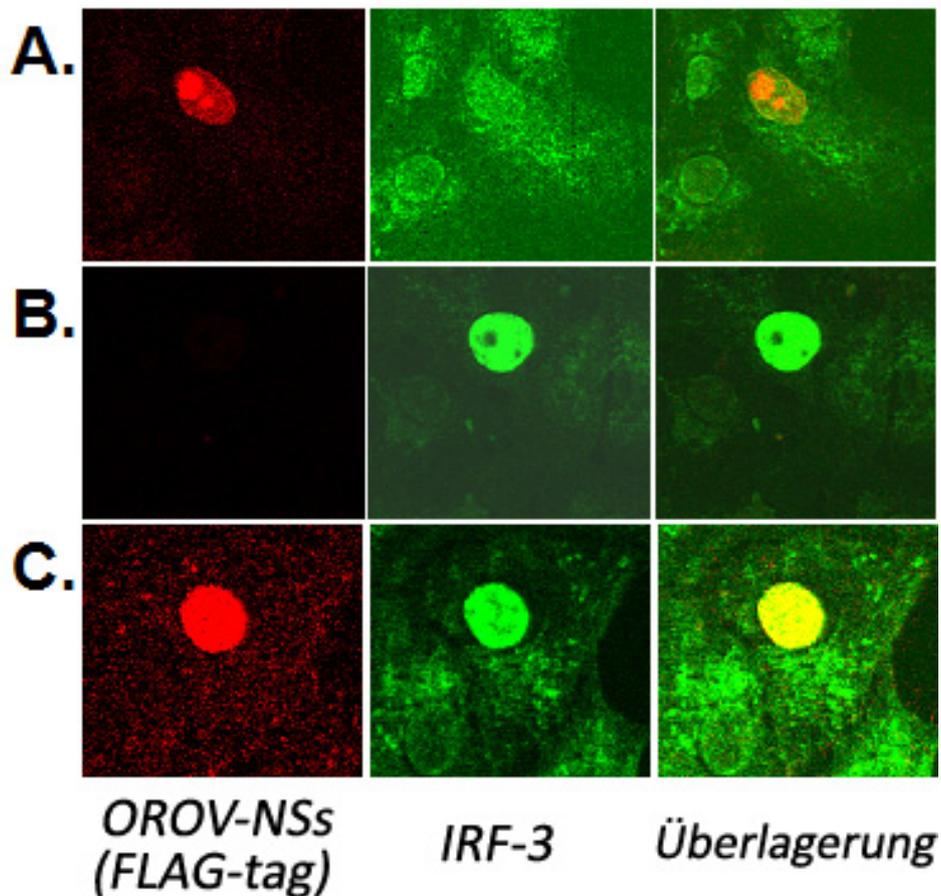
Im Vergleich der Werte der stimulierten mit den unstimulierten Ansätzen, die mit OROV-NSs transfiziert wurden, zeigte sich ein leichter Anstieg nach Stimulation um das 2,5-fache (dsRNA/zell. RNA) bzw. 2-fache (VSV-RNA/Zell-RNA). Dieser Anstieg ist jedoch statistisch nicht signifikant (dsRNA/Zell-RNA:  $p = 0,24$ , VSV-RNA/Zell-RNA:  $p = 0,24$ ).

OROV-NSs hemmte die Aktivierung des IRF3-responsiven Promotors in beiden Zelllinien. Allerdings zeigte sich eine signifikante Hemmung der VSV-RNA-induzierten Promotoraktivierung, im Gegensatz zur dsRNA induzierten Aktivierung. Hier konnte keine signifikante Hemmung bei ineffizienterer Stimulation nachgewiesen werden. Demzufolge ist dsRNA in diesem Fall ein schlechterer Stimulus in VeroE6-Zellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass OROV-NSs wohl weniger stark hemmt als RVFV-NSs, bei dem auch in Zellen mit dsRNA-induzierter Aktivierung des Promotors eine signifikante Hemmung zu beobachten war.

#### *3.2.2.4.2 Untersuchung des Einflusses des OROV-NSs auf die nukleäre Translokation von IRF3*

In einem immunhistochemischen Verfahren, der Immunfluoreszenz, wurde mithilfe spezifischer Antikörper untersucht, inwieweit die Translokation des TFs IRF3 durch OROV-NSs beeinflusst wird. IRF3 muss vor der Translokation in den Zellkern zunächst durch Phosphorylierung aktiviert werden, die zu einer Homodimerisierung von IRF3 führt.

Für die Untersuchung der Wirkung des OROV-NSs auf Einzelzell-Ebene wurden zunächst VeroE6-Zellen, die zuvor auf sterilen Deckgläsern kultiviert wurden, mit einem Expressionsplasmid für OROV-NSs-FLAG (2 $\mu$ g) (pl.18-OROV-NSs-FLAG und zur Kontrolle mit dem Ausgangsplasmid pl.18 (B) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 6 $\mu$ g/Kavität synthetischer dsRNA stimuliert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 3 Prozent Paraformaldehyd (PFA) 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Das so angefertigte Präparat wurde dann mithilfe spezifischer Antikörper für IRF3 (grün) und OROV-NSs-FLAG (rot) angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.



**Abbildung 53: Einfluss des OROV-NSs auf die IRF3-Translokation mittels Immunfluoreszenz**

Reihe A: Transfektion mit pl.18-OROV-NSs-FLAG, keine Stimulation mit poly(I:C); Reihe B: Transfektion mit pl.18; Stimulation mit poly(I:C); Reihe C: Transfektion mit pl.18-OROV-NSs-FLAG, Stimulation mit poly(I:C).

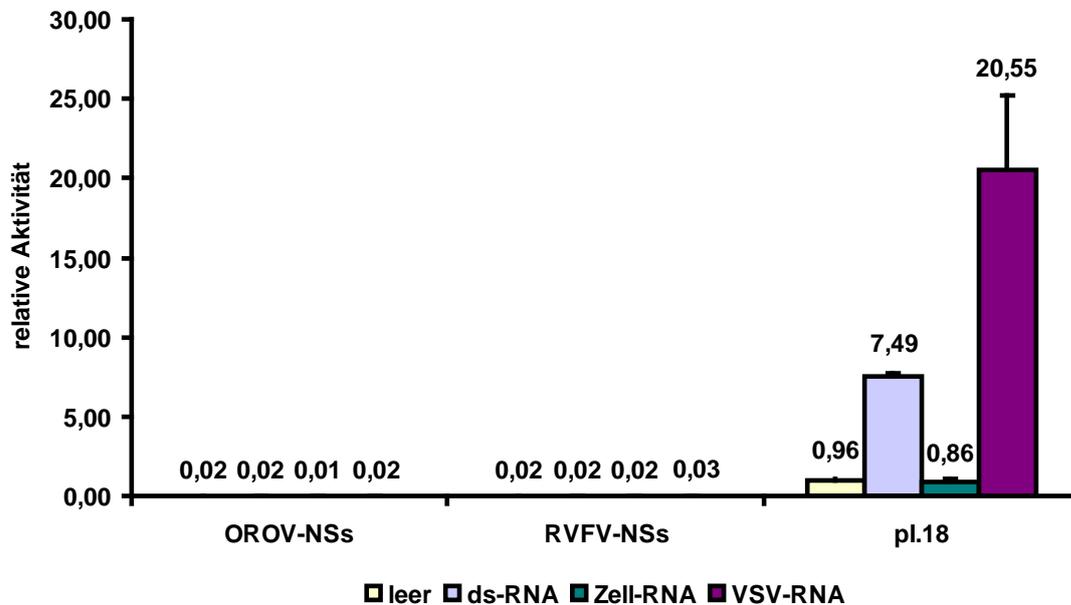
Es zeigte sich, dass unabhängig von der Anwesenheit des OROV-NSs eine nukleäre Translokation des TF IRF3 nach Stimulation mit dsRNA stattfindet. IRF3 konnte auch nach Transfektion mit OROV-NSs im Zellkern nachgewiesen werden. OROV-NSs hemmt demnach nicht die nukleäre Translokation von IRF3, obwohl es in der Lage ist, die Aktivierung eines IRF3-responsiven Promotors zu hemmen.

#### 3.2.2.4.3 Wirkung des OROV-NSs auf den NFκB-responsiven Promotor in humanen 293-Zellen und VeroE6-Zellen

Die Überprüfung des Einflusses des OROV-NSs auf die Promotoraktivität eines für den TF NFκB responsiven, artifiziiellen Promotors erfolgte im Reporterassay mithilfe des p55A2-luc-Reporterplasmids. Der Promotor enthält mehrere hintereinandergeschaltete PRD-II-Domänen, die dem TF NFκB als Bindungsstelle dienen. Die Aktivierung des Promotors durch NFκB führt zur Expression der FF-Luciferase (vgl. Kap. 2.3.3). Anhand des Substratumsatzes der FF-Luciferase konnte indirekt die Promotoraktivität in Form von Lichtemissionen gemessen werden. Es wurden 1 µg p55A2-luc-Reporterplasmid pro Ansatz eingesetzt. Zusätzlich

wurde 0,05 µg pro Ansatz des Reporterplasmids pRL-SV40 mit dem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Expression der Renilla-Luciferase zur Überprüfung des Transfektionserfolges cotransfiziert (vgl. Kap. 2.3.3).

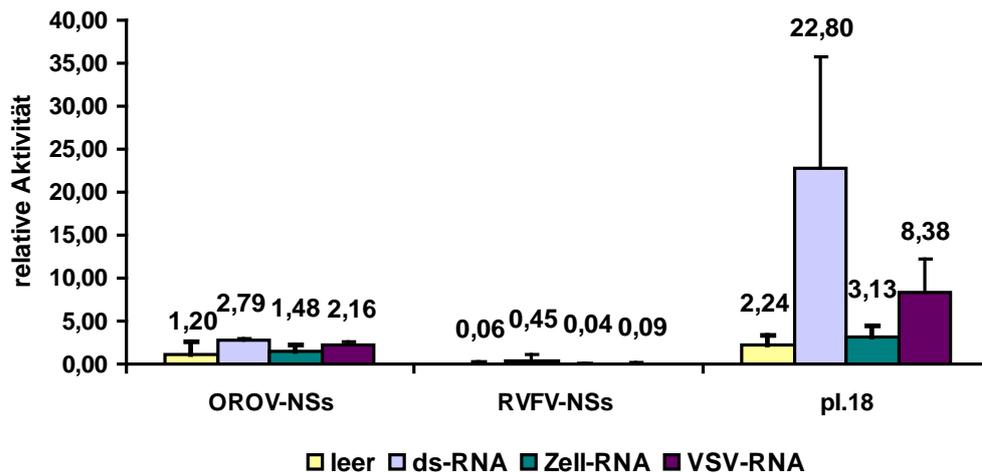
Stimuliert wurde mit 4 µg synthetischer dsRNA bzw. 1 µg VSV-RNA.



**Abbildung 54: Aktivierung eines NFκB-responsiven Promotors nach Stimulation in 293-Zellen**

Die Stimulation erfolgte mit Doppelstrang-RNA (dsRNA = poly(I:C)), zellulärer RNA (Zell-RNA) und RNA aus VSV-infizierten VeroE6-Zellen (VSV-RNA) in Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs. Den Berechnungen lagen vier unabhängig durchgeführte Einzelexperimente (Reporterassays) zugrunde.

Die Stimulation mit synthetischer dsRNA führte in 293-Zellen zu einer 8,7-fachen Aktivierung des Promotors, die Stimulation mit VSV-RNA zu einer 23,9-fachen Aktivierung des Promotors ( $p = 0,012$ ), bezogen auf den Wert des mit zellulärer RNA stimulierten Ansatzes ( $p = 0,0035$ ). Die Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs führte unabhängig vom Stimulus zu einer kompletten Hemmung der Aktivierung des Promotors. Im Vergleich mit der Aktivierung des Promotors in den Zellen, die mit dem Plasmid pl.18 transfiziert wurden, zeigte sich im Falle der Stimulation mit VSV-RNA eine statistisch signifikante Hemmung durch RVFV-NSs ( $p = 0,01$ ) und OROV-NSs ( $p = 0,01$ ). Ebenso zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung durch RVFV-NSs ( $p = 0,005$ ) und OROV-NSs ( $p = 0,005$ ) im Falle der Stimulation mit synthetischer dsRNA. Die Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs bewirkte darüber hinaus eine Hemmung der Grundaktivität des Promotors.



**Abbildung 55: Aktivierung eines NFκB-responsiven Promotors nach Stimulation in VeroE6-Zellen**

Die Stimulation erfolgte mit Doppelstrang-RNA (dsRNA=poly(I:C)), zellulärer RNA (Zell-RNA) und RNA aus VSV-infizierten VeroE6-Zellen (VSV-RNA) in Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs. Den Berechnungen lagen drei unabhängig durchgeführte Einzelexperimente (Reporterassays) zugrunde.

Die Stimulation mit synthetischer dsRNA führte zu einer 5,4-fachen Aktivierung, bezogen auf die Stimultion mit zellulärer RNA, und war in dieser Versuchsreihe ein effizienterer Stimulus der VeroE6-Zellen als die VSV-RNA (3,2-fache Aktivierung). Das RVFV-NSs hemmte die Aktivierung des Promotors mit statistischer Signifikanz ( $p = 0,03$ ). Im Falle der mit dsRNA stimulierten Ansätze, bezogen auf den Wert des mit zellulärer RNA stimulierten Ansatzes, zeigte sich in Anwesenheit von OROV-NSs eine geringe Aktivierung des Promotors (2,6-fach). Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,057$ ). Im Vergleich zu den Werten der stimulierten Ansätze, die mit dem Plasmid pl.18 transfiziert wurden, zeigte sich eine deutliche Hemmung der Promotoraktivierung in Anwesenheit von OROV-NSs (VSV-RNA:  $p = 0,05$ ; dsRNA:  $p = 0,015$ ) und RVFV-NSs (VSV-RNA:  $p = 0,04$ ; dsRNA:  $p = 0,1$ ). Diese Unterschiede sind unter der Bedingung des Signifikanzniveaus  $\alpha = 0,05$  statistisch signifikant, lediglich die Hemmung der Stimulation des Promotors mit VSV-RNA durch OROV-NSs zeigte eine geringfügig höhere Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p = 0,055$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass OROV-NSs in der Lage war, die Aktivierung des NFκB-responsiven Promotors in beiden Zelllinien zu hemmen. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der Promotoraktivierung in An- und Abwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs.

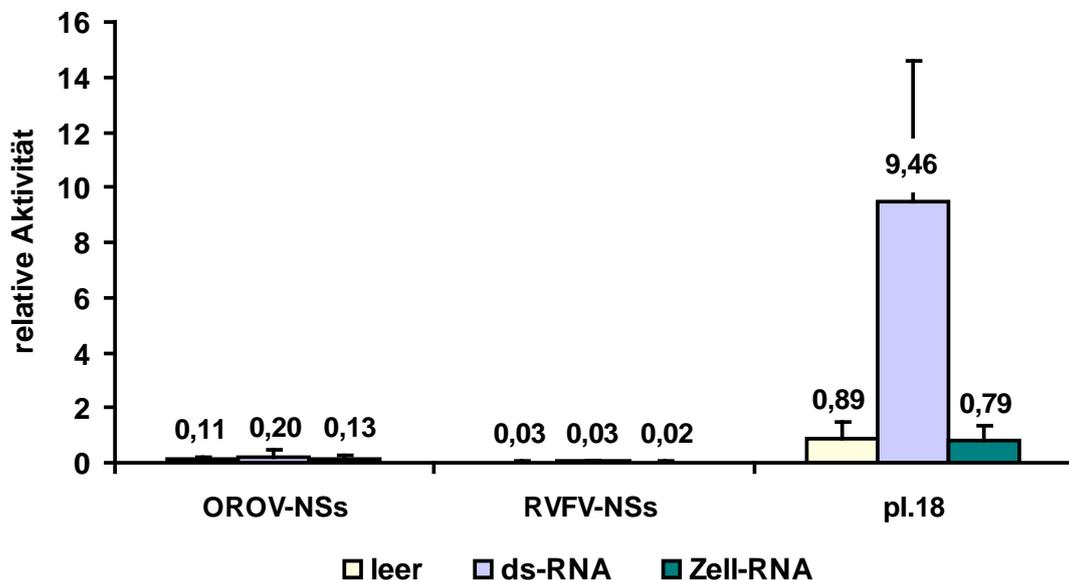
### 3.2.2.5 Wirkung des OROV-NSs auf den Transkriptionsfaktor AP1 in humanen 293-Zellen

Zur Untersuchung der Aktivität des AP1-responsiven Promotors in Anwesenheit von OROV-NSs wurde das pAP1-Reporterplasmid (1 µg/Ansatz) verwendet. Dieses Plasmid enthält ei-

nen Promotor, der mehrere aufeinanderfolgende AP1-Bindungsstellen (PRD IV) des IFN- $\beta$ -Promotors enthält. Zur Überprüfung des hemmenden Einflusses auf die Promotoraktivität wurden 0,5  $\mu$ g/Ansatz pl.18-OROV-NSs bzw. als Positivkontrolle 0,5  $\mu$ g/Ansatz pl.18-RV-FV-NSs transfiziert.

Zusätzlich wurden 0,05  $\mu$ g/Ansatz des Reporterplasmids pRL-SV40 mit dem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Expression der Renilla-Luciferase zur Überprüfung des Transfektionserfolges hinzugefügt (vgl. Kap. 3.1.3.4).

Die Stimulation erfolgte mit 4  $\mu$ g/Ansatz synthetischer dsRNA und die Kontrolle mit 1  $\mu$ g/Ansatz zellulärer RNA. Vorversuche hatten ergeben, dass eine Aktivierung des AP1-responsiven Promotors durch Stimulation mit VSV-RNA nicht möglich ist.



**Abbildung 56: Aktivierung eines AP1-responsiven Promotors nach Stimulation in 293-Zellen**

Die Stimulation erfolgte mit Doppelstrang-RNA (dsRNA=poly(I:C)) und zellulärer RNA (Zell-RNA) in Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs. Den Berechnungen lagen vier unabhängig durchgeführte Einzelerperimente (Reporterassays) zugrunde.

Wie in Abbildung 56 dargestellt, bewirkte die Stimulation mit synthetischer dsRNA eine 12-fache Aktivierung des AP1-responsiven Promotors, bezogen auf den Wert des mit zellulärer RNA stimulierten Ansatzes ( $p = 0,04$ ).

Die Positivkontrolle RVFV-NSs hemmte die Aktivierung des AP1-responsiven Promotors in mit dsRNA stimulierten 293-Zellen komplett. Der Unterschied zwischen den Werten der mit dsRNA stimulierten 293-Zellen mit und ohne RVFV-NSs-Expression ist mit  $p = 0,03$  statistisch signifikant. Ein Vergleich der Aktivität der Promotoren in den unstimulierten Zellen, die den

pI.18-Leervektor bzw. den RVFV-NSs-Expressionsvektor enthalten, zeigte, dass RVFV-NSs auch die Grundaktivität des AP1-responsiven Promotors hemmt.

In Anwesenheit von OROV-NSs zeigte sich trotz 1,5-fachen Anstiegs der Promotoraktivität durch die Stimulation mit dsRNA, bezogen auf den Ansatz, der mit zellulärer RNA stimuliert wurde, eine Hemmung der Aktivierung des AP1-responsiven Promotors, da der beobachtete Anstieg der Promotoraktivität statistisch nicht signifikant ( $p = 0,66$ ) ist. Der Unterschied zwischen den Werten der mit dsRNA stimulierten Zellen mit und ohne OROV-NSs ist hingegen mit  $p = 0,04$  statistisch signifikant.

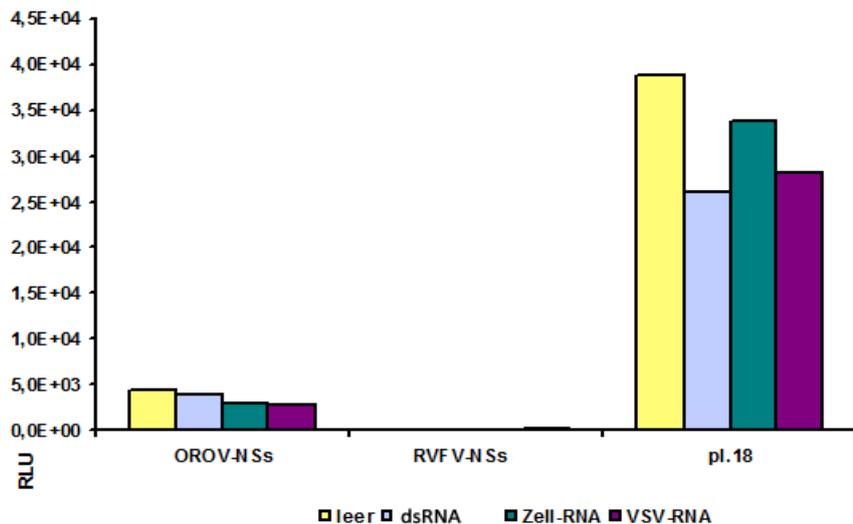
Zusätzlich wurde die Grundaktivität des Promotors durch die Expression von OROV-NSs in den 293-Zellen im Vergleich zu dem Ansatz ohne Expression eines Nichtstrukturproteins (pI.18) gehemmt.

Es konnte gezeigt werden, dass OROV-NSs die durch dsRNA Stimulation bewirkte Aktivierung des AP1-responsiven Promotors in 293-Zellen hemmte. In 293-Zellen konnte in dieser Versuchsreihe keine ausreichende Stimulation mit VSV-RNA erreicht werden. In VeroE6-Zellen erbrachte weder die Stimulation durch VSV-RNA noch die Stimulation mit synthetischer dsRNA eine ausreichende Aktivierung des AP1-responsiven Promotors, sodass im Bezug auf die Wirkung des exprimierten OROV-NSs hier keine Aussage gemacht werden konnte.

### **3.2.2.6 Wirkung des OROV-NSs auf den SV40-Promotor zur Expression der Renilla-Luciferase-Aktivität in 293- und VeroE6-Zellen**

Um Aufschluss über die Transfektionseffizienz, die Zellzahl und den zytotoxischen Effekt der Stimulationsreagenzien zu erhalten, wurde in den Versuchsreihen das Plasmid pRL-SV40 transfiziert, das der Expression der Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40-Promotors dient.

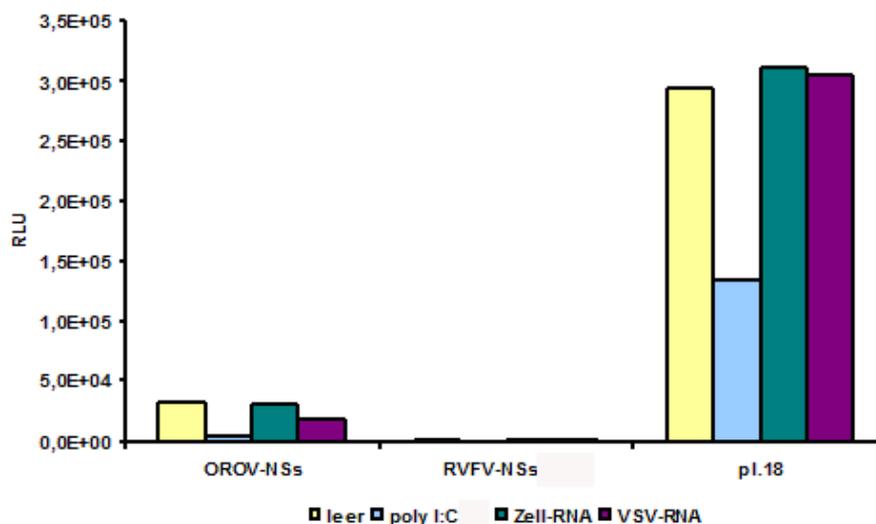
Die Werte der SV40-Promotoraktivität (Substratumsatz der Renilla-Luciferase) wurden mit denen des IFN- $\beta$ -Promotors (Substratumsatz der FF-Luciferase) verrechnet (vgl. Kap. 2.3.3), sodass unabhängig von den oben genannten Faktoren der Effekt der NSs-Konstrukte auf die IFN- $\beta$ -Promotor-Aktivität ermittelt werden konnte. Die Renilla-Luciferase-Aktivität sollte durch die Stimulation des IFN- $\beta$ -Promotors durch synthetische ds- und VSV-RNA keinerlei Veränderungen erfahren. Ebenso sollte dies im Falle einer spezifischen Hemmung der Induktion des IFN- $\beta$ -Promotors durch OROV-NSs keinen Effekt auf die Aktivierung des SV40-Promotors haben.



**Abbildung 57: Aktivität des SV40-Promotors nach Stimulation von 293-Zellen**

Die Stimulation erfolgte mit synthetischer dsRNA, zellulärer RNA und VSV-RNA in Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs. Gemessen wurde die Lichtemission als Folge des Substratumsatzes der Renilla-Luciferase, die ein indirektes Maß für die Promotoraktivität darstellt (s. Kap. 2.3.3).

Es zeigte sich, dass die Aktivität des SV40-Promotors nach Stimulation mit der synthetischen dsRNA im Vergleich zu dem unstimulierten Ansatz zu einem Rückgang der Aktivität der Renilla-Luciferase führte. Die Stimulation mit VSV-RNA führte ebenfalls zu einem leichten Rückgang der Aktivität. In Anwesenheit des RVFV-NSs wurde die Promotoraktivität fast komplett gehemmt. Auch die Anwesenheit von OROV-NSs führte zu einer deutlichen Hemmung der Aktivität des SV40-Promotors.



**Abbildung 58: Aktivität des SV40-Promotors nach Stimulation von VeroE6-Zellen.**

Die Stimulation erfolgte mit synthetischer dsRNA, zellulärer RNA und VSV-RNA in Anwesenheit von OROV-NSs und RVFV-NSs. Gemessen wurde die Lichtemission als Folge des Substratumsatzes der Renilla-Luciferase, die ein indirektes Maß für die Promotoraktivität darstellt (s. Kap. 2.3.3).

Abbildung 58: Aktivität des SV40-Promotors nach Stimulation von VeroE6-Zellen. zeigt, dass die Aktivität der Renilla-Luciferase nach Stimulation mit synthetischer dsRNA in VeroE6-Zellen, verglichen mit dem Wert des unstimulierten Ansatzes, um ca. 50 Prozent zurückgegangen war. Die Stimulation mit VSV-RNA hatte, verglichen mit der Aktivität des Promotors in dem unstimulierten Ansatz keinen Einfluss auf die SV40-Promotoraktivität. In Anwesenheit des RVFV-NSs war die Aktivität des SV40-Promotors unabhängig von dem Effekt der Stimuli kaum noch nachweisbar. Auch OROV-NSs hemmte die Aktivität des SV40-Promotors in VeroE6-Zellen.

Unter Stimulation mit synthetischer dsRNA zeigte sich in VeroE6-Zellen ein deutlicher Rückgang der Aktivität des konstitutiv aktiven SV40-Promotors um bis zu 50 Prozent. OROV-NSs hemmte wie auch RVFV-NSs den konstitutiv aktiven SV40-Promotor in 293LP- und VeroE6-Zellen. Dies ist vor allem darin begründet, dass synthetische dsRNA zytotoxische Eigenschaften hat, die zu einem Zellverlust und damit auch zu einer verminderten Expression der Renilla-Luciferase geführt haben.

## 4 Diskussion

### 4.1 Klonierung der OROV-ORFs und Herstellung der Rescue- und Expressionsplasmide für das Minireplikon- und Reverse-Genetik-System

Das Minireplikon-System stellt eine etablierte Methode dar, die virale Transkription und Replikation auf molekularer Ebene zu untersuchen. Zudem bietet es die Möglichkeit, mithilfe der klonierten viralen Gensegmente rekombinante Nukleokapside in Zellkultur zu erzeugen und die Auswirkungen einer Manipulation des viralen Genoms in Zellkultur zu untersuchen (vgl. Kap. 2.3.4).

Zur Herstellung rekombinanter OROV-Nukleokapside *in vivo* werden ein sogenanntes Mini-genom mit flankierenden NTR-Sequenzen in einem sogenannten Rescuevektor, exprimierbare N-Protein-cDNA und exprimierbare L-Protein-cDNA in Form von Expressionsvektoren (Helferplasmide) benötigt. Für das Reverse-Genetik-System zur Herstellung rekombinanter Viren wird zusätzlich die M-ORF-cDNA im Expressionsplasmid und die S-, M-, und L-Segment-cDNA in Rescuevektoren gebraucht. Zunächst wurden die OROV-L-, -M-, und -S-ORF kloniert. Zusätzlich wurde eine S-Sequenz mit mutiertem OROV-NSs-Gen hergestellt, indem drei Punktmutationen eingebracht wurden, die dazu führen, dass das NSs nicht synthetisiert werden kann. Da sich diese Mutationen im Leserahmen des N (Nukleoprotein) allerdings nur als stille Mutationen zeigen, haben sie keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des Nukleoproteins. Für die Klonierung der Gensegmente wurde der OROV-Stamm TRVL9760 = Trinidad (AF164531) verwandt. Da es von diesem Stamm aber nur eine partielle S-Segment-Sequenz in GenBank (AF164531) gibt, konnte demzufolge dieser Stamm nur als Referenzsequenz für das S-Segment herangezogen werden. Für das M- und L-Segment wurde als Referenzsequenz der Stamm BeAn19991 (S = NC\_005777.1, M = NC\_005775.1, L = NC\_005776.1) verwendet, da ansonsten keine weiteren Sequenzen zum Vergleich zur Verfügung stehen. Die Sequenzanalyse der cDNA (S-, M-, L-Segment) insbesondere des L-Segments erbrachte demzufolge Abweichungen von der Referenzsequenz. Es traten Punktmutationen auf, und zwar in allen Sequenzen an der gleichen Stelle. Einige der Mutationen führten zu einem Austausch in der AS-Sequenz. Eine mögliche Ursache wäre, dass sich diese Mutationen während der Passagen in der Zellkultur gebildet haben. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen anderen OROV-Stamm handelt, als wie angenommen um den Stamm TRVL 9760. Letzten Endes kann ein weiterer Grund für die Unterschiede auch in der Fehlerhaftigkeit der Referenzsequenz liegen. Diese kann aufgrund von veralteten Sequenzierungsmethoden, die zum Zeitpunkt der Sequenzierung verwendet wurden, entstanden sein. Es ist nicht zwangsläufig davon auszugehen, dass diese Abweichungen von der Referenzsequenz einen Einfluss auf die Funktionalität der viralen Proteine haben.



*A. Sequenzähnlichkeiten anhand der AS-Identität. B. Ausschnitt des Sequenzvergleichs. Dargestellt ist der Abschnitt, bei dem bei der Sequenzierung der OROV-L ORF-cDNA die Insertion von sechs Nukleotiden im Vergleich zur Referenzsequenz (NC\_005776) ermittelt wurde.*

Aufgrund des durchgeführten Sequenzvergleichs ist es für die erste AS-Insertion an AS-Position 789 sehr wahrscheinlich, dass die Referenzsequenz fehlerhaft ist. Von den elf zum Vergleich herangezogenen Orthobunyavirus-Polymerase-Sequenzen enthalten sieben an dieser Position Triplets für die AS Threonin, was sich mit dem Ergebnis der selbst durchgeführten Sequenzierung des OROV-L ORF deckt. Die vorangehende und die folgenden Positionen sind hochkonserviert, da alle Sequenzen einschließlich der selbst ermittelten Sequenz an Position 788 sowie Position 790 und 791 identisch sind (Q bzw. VN), lediglich die OROV-L-Referenzsequenz NC\_005576 zeigt hier Abweichungen (R bzw. LS). Für die zweite AS-Insertion an Position 801 ergibt der Sequenzvergleich ein weniger eindeutiges Ergebnis. Die Sequenzierung ergab hier ein Triplet für Arginin, während alle anderen zum Vergleich herangezogenen Sequenzen ein Triplet für Lysin enthalten. Da es sich hierbei um zwei sehr ähnliche AS handelt (polare lineare Seitenkette mit positiver Nettoladung) ist das Sequenzierungsergebnis zumindest nicht unwahrscheinlich. Für die vorangehende Position 800 wurde Alanin ermittelt; vier der elf Vergleichssequenzen enthalten an der analogen Position ebenfalls diese AS, die restlichen sieben ein Cystein, während die Referenzsequenz hier ein Glutamin enthält. Während Alanin und Cystein beides neutrale, unpolare AS sind, handelt es sich bei Glutamin um eine polare AS. Daher ist die durch die Sequenzierung ermittelte Sequenz plausibler als die Referenzsequenz. Für die nachfolgende Position 802 ergab die Sequenzierung ein Codon für Asparagin, was sich mit acht der elf Vergleichssequenzen deckt. Zwei der Vergleichssequenzen enthalten hier ein Codon für Serin, während die verbleibende Sequenz an dieser Position ein Methionin aufweist. Damit treten an dieser Position sowohl neutrale unpolare AS (Methionin) als auch neutrale polare AS (Asparagin und Serin) auf, wobei die polaren AS stark bevorzugt sind. Die Referenzsequenz dagegen codiert an dieser Position für Glutaminsäure, also für eine polare AS mit negativer Nettoladung. Aufgrund des Sequenzvergleichs ist es daher wahrscheinlich, dass die ermittelte OROV-L-ORF-Sequenz korrekt ist und die Referenzsequenz hier einen weiteren Fehler enthält.

Für die A-Insertion an nt-Position 2550 sowie die A-Deletion an nt Position-2572 im Vergleich zur Referenzsequenz, die im entsprechenden Bereich zu einer abweichenden AS-Sequenz führen (s. Abbildung 19), kann aufgrund des Vergleichs mit den elf Orthobunyavirussequenzen keine Aussage über die korrekte Sequenz gemacht werden, da hier große Unterschiede zwischen den einzelnen Sequenzen vorhanden sind. Offensichtlich handelt es sich hierbei um einen nicht konservierten Bereich.

Es ist unklar, inwieweit sich diese Abweichungen auf die Funktionalität des L-Proteins der viralen Polymerase auswirken. Sollte es sich bei diesen Abweichungen um Mutationen handeln, die im Verlauf der Klonierung aufgetreten sind, so ist es durchaus wahrscheinlich, dass

diese das L-Protein (virale Polymerase) in seiner Funktion teilweise oder ganz beeinträchtigen.

## **4.2 Etablierung des OROV-Minireplikon-Systems**

Für die Etablierung des OROV-Minireplikon-Systems wurden die Zellen mit den OROV-L- und S- bzw. Smut-Expressionskonstrukten und dem OROV-Minireplikonplasmid transfiziert. Es konnte aber keine Aktivität des OROV-Minireplikon-Systems nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die verwendeten Zellen keine oder eine nicht ausreichende Expression der T7-Polymerase aufweisen und das System deshalb nicht funktioniert. Aus diesem Grund wurden die Zellen zur Kontrolle mit den bereits vorhandenen Konstrukten pTM1-LACV-L, pTM1-LACV-N und pT7-riboGB-LACV-vMprovRL des LACV-Minireplikon-Systems transfiziert. In zwei Messungen zeigte sich eine deutlich ansteigende Aktivität des T7-Polymerase-basierten LACV-Minireplikon-Systems über den Zeitraum von 48 Stunden (vgl. Kap. 3.1.3.4). Somit ist davon auszugehen, dass die Zellen zur initialen Transkription des Minigenoms genügend T7-Polymerase exprimieren.

Da gezeigt werden konnte, dass mit den verwendeten BSR-T7-Zellen die Rekonstitution eines LACV-Minireplikons möglich war, muss die fehlende Minireplikon-Aktivität im Falle des OROV-Systems eine andere Ursache haben.

Eine mögliche Ursache könnte sein, dass das OROV-Minigenom eine fehlerhafte Sequenz besitzt, die zu einer fehlenden Funktionalität führt, oder dass es durch möglicherweise inkorrekte M-Enden nicht transkribiert werden kann. Die M-NTR-Enden dienen als regulatorische Sequenzen für die Transkription und Replikation durch die virale Polymerase. Im Falle inkorrekturer NTR-Sequenzen wäre eine Transkription bzw. Replikation des Minigenoms nicht möglich. Da für die Reverse Transkription der isolierten OROV-RNA Random-Hexamer-Primer verwendet worden sind, konnten die NTR-Sequenzen nicht aus der cDNA amplifiziert werden, da davon auszugehen war, dass insbesondere die randständigen NTR-Sequenzen nicht oder nur fehlerhaft umgeschrieben würden. Die Sequenzen der OROV-M-Enden wurden daher komplett über konstruierte Primer hergestellt. Dabei wurde auf Daten aus GenBank (NC\_005775) zurückgegriffen. Diesbezüglich könnten allerdings auch die Referenzsequenzen, auf die bei der Herstellung der Primer zurückgegriffen wurde, fehlerhaft und dadurch die Funktionalität der M-Enden beeinträchtigt sein. Jedes RNA-Molekül des dreiteiligen Genoms der Bunyaviren besitzt am 3'- und 5'-Ende eine nicht-translatierte Region, die unter anderem eine 8 Nukleotide lange Region am 5'- und 3'-Ende beinhaltet, die jeweils komplementär zueinander sind und so eine sogenannte Pfannenstielform ausbilden (Hewlett et al. 1977). Die Referenzsequenzen in diesem Fall beinhalteten neun komplementäre Basen, was eine Einschränkung in ihrer regulatorischen Funktion gegenüber der Polymerase bewirken kann (Elliott 1996).

Um die Funktionalität der regulatorischen M-Enden des Minigenoms zu überprüfen, wurde daher ein gemischtes Minireplikon-System etabliert, indem die Zellen mit den LACV-L- und

N-Expressionskonstrukten und dem OROV-Minireplikon transfiziert wurden. Da die Funktionalität der einzelnen Konstrukte des LACV-Minireplikonsystems nachgewiesen ist und es sich bei LACV und OROV um die gleiche Virusgattung (Orthobunyaviren) handelt, sodass die Möglichkeit besteht, dass aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten die LACV-Polymerase in der Lage ist, die regulatorischen Sequenzen der OROV-Genomsegmente zu erkennen und das Minigenom zu transkribieren, konnte durch den isolierten Austausch des Minireplikons die Funktionalität der NTR-Regionen überprüft werden. Die Durchführung erfolgte analog den vorangegangenen Experimenten. Es konnte über den Zeitraum von 48 Stunden eine ansteigende Luciferase-Aktivität im Minireplikon-System gemessen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die LACV-Polymerase anscheinend in der Lage ist, die OROV-M-Enden zu erkennen und das Minigenom zu transkribieren. Damit wurde gezeigt, dass die OROV-M-Enden insofern korrekt sind, als sie durch eine heterologe Orthobunyavirus-Polymerase als Transkriptions- bzw. Replikationssignal erkannt werden. Ferner ist auch der codierende Bereich des Minigenoms selbst intakt, da ja Renilla-Luciferase exprimiert werden konnte.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den in dieser Arbeit hergestellten Expressionskonstrukten für das OROV-Minireplikon-System und den Konstrukten des LACV-Systems besteht darin, dass die Expression der OROV-Proteine unter der Kontrolle des CMV-Promotors, eines Promotors, der durch die zelluläre RNA-Polymerase II abgelesen wird, erfolgt, während die LACV-Proteine mithilfe des T7-Promotors exprimiert werden. In diesem Fall ist es notwendig, dass der cDNA eine IRES vorgeschaltet ist. Die IRES übernimmt die Funktion eines 5'-Caps, ohne das eine Translation nicht möglich ist, da dieses die Erkennungssequenz für die Ribosomen darstellt. Während die T7-Polymerase-getriebene Transkription komplett im Zytoplasma stattfindet, erfolgt die RNA-Polymerase-II-getriebene Transkription im Zellkern. Unter normalen Umständen findet der Replikationszyklus der Bunyaviren im Zytoplasma statt. Es ist daher anzunehmen, dass die Genomsequenzen des OROV kryptische Splice Stellen enthalten, die, solange sich die RNA des Virus im Zytoplasma befindet, keinerlei Konsequenzen haben. Im Kern hingegen werden diese Stellen u. U. vom Spliceapparat der Zelle erkannt und benutzt, sodass die virale RNA zerstört wird. Obwohl der für die OROV-Expressionkonstrukte verwendete p1.18-Vektor das Intron A des humanen CMV enthält und dem Spliceapparat ein echtes Intron zum Schneiden zur Verfügung stellt, ist es möglich, dass die virale RNA vom Spliceapparat zerstört wird und es darum zu keiner Synthese der viralen Proteine kommt.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, wäre die Umklonierung der OROV-L- und S- bzw. Smut-cDNA in einen pTM-Vektor. Die Expression des L- bzw. des S-Proteins stünde in diesem Fall analog dem LACV-Minireplikon-System unter der Kontrolle eines T7-Promotors und würde den Weg über den Zellkern und die zelluläre Polymerase-II vermeiden.

Eine weitere mögliche Ursache dafür, dass im OROV-Minireplikon-System keinerlei Aktivität gemessen werden konnte, könnte eine nicht funktionelle virale Polymerase sein. Folglich

könnte das Minigenom nicht transkribiert, und die Renilla-Luciferase nicht exprimiert werden. Allein die Tatsache, dass der klonierte L-ORF laut Sequenzanalyse sechs Nukleotide mehr als die Referenzsequenz besitzt, muss nicht bedeuten, dass es sich um eine nicht funktionelle Sequenz handelt. Vielmehr könnte eine Ursache für ein defektes L-Protein die Insertion und Deletion von Adenosin an verschiedenen Stellen der Sequenz darstellen (vgl. Kap. 4.1), was in der Konsequenz zu einem Austausch in der AS-Sequenz in sieben Fällen führt.

Daher muss die L-Sequenz erneut überprüft werden. Zu diesem Zweck müssen wiederholt Zellen mit dem OROV infiziert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Die Sequenzen des L-Segments, die die Mutationen enthielten, müssen im Anschluss amplifiziert und über eine Sequenzierung überprüft werden. Sollte die Sequenzanalyse ergeben, dass die L-Sequenz von der vorliegenden abweicht oder mit der Referenzsequenz übereinstimmt, so muss die fehlerhafte Sequenz erneut kloniert werden. In diesem Fall sollte die RNA jedoch direkt aus Viruspartikeln und nicht aus infizierten Zellen isoliert werden, sodass im selben Schritt auch die Sequenzierung der NTRs möglich ist. Im Gegensatz zu einer Isolation von Virus-RNA aus infizierten Zellen, in denen ein Gemisch aus zellulärer RNA, viralen Transkripten sowie antigenomischer und genomischer viraler RNA vorliegt, erhält man bei einer Isolation der RNA aus Viruspartikeln ausschließlich die zu sequenzierenden virale Genomsegmente.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein defektes Nukleoprotein. Es bildet mit der genomischen RNA Ribonukleoproteinkomplexe, die der Polymerase als Matrize dienen (Kolakofsky und Hacker 1991). Allerdings zeigten sich in der Sequenzieranalyse keine Abweichungen in der N-Sequenz, die auf eine eingeschränkte Funktionalität des N-Proteins hinweisen, sodass diese Möglichkeit als wenig wahrscheinlich anzusehen ist.

### **4.3 Die Interferon-antagonistische Wirkung des OROV-NSs**

#### **4.3.1 Die Hemmung der IFN-Induktion durch OROV**

Das Oropouche-Virus ist ein Orthobunyavirus aus der Familie der Bunyaviren, einer weltweit verbreiteten Virusfamilie mit zahlreichen humanpathogenen Vertretern. Viele dieser Viren besitzen Mechanismen, dem Immunsystem des Wirts zu entgehen, indem sie unterschiedliche Faktoren, die am Abwehrsystem beteiligt sind, blockieren. Die Aktivierung des antiviral wirksamen IFN-Systems ist oft das Angriffsziel dieser viralen Mechanismen. In dieser Arbeit sollte die IFN-antagonistische Wirkung des OROV gezeigt und näher untersucht werden. Von anderen Bunyaviren des gleichen Genus (Orthobunyavirus) wie Bunyamwera-Virus und La-Crosse-Virus sind IFN-antagonistische Eigenschaften bereits bekannt. Auch bei dem Phlebovirus Rift-Valley-Fever-Virus ist ein hemmender Effekt auf das IFN-System nachgewiesen.

Zunächst wurde daher untersucht, ob OROV in der Lage ist, die Induktion des Typ-I-Interferons IFN- $\beta$  zu unterdrücken, indem in OROV-infizierten 293-Zellen untersucht wurde, ob es zu einer Induktion von IFN- $\beta$  kommt.

Zu diesem Zweck wurden 293-Zellen mit OROV infiziert und 18 Stunden nach Infektion auf die Synthese von IFN- $\beta$ -spezifischen Transkripten mittels RT-PCR untersucht. In den OROV-infizierten Zellen konnten keine IFN- $\beta$ -spezifischen Transkripte nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten nach Infektion mit RVFV-Klon 13 (Muller et al. 1995), einem bekannten IFN-Induktor, IFN- $\beta$ -spezifische Transkripte nachgewiesen werden.

Darüberhinaus wurde untersucht, inwieweit OROV in der Lage ist, durch VSV-RNA bzw. RVFV-Klon 13 induzierte IFN- $\beta$  Transkription zu unterdrücken. Zu diesem Zweck wurden VSV-RNA-transfizierte bzw. RVFV-Klon-13-infizierte Zellen zusätzlich mit OROV infiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass in allen Ansätzen, die mit OROV infiziert wurden, keine IFN- $\beta$ -Transkripte nachweisbar waren (vgl. Abbildung 42). In den Kontrollansätzen ohne Infektion mit OROV hingegen waren IFN- $\beta$ -Transkripte nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass OROV, wie andere Bunyaviren auch, offensichtlich in der Lage ist, die IFN- $\beta$ -Synthese aktiv zu unterdrücken. OROV muss demnach einen IFN-Antagonisten besitzen. Von RVFV und BUNV ist bekannt, dass die IFN-antagonistische Wirkung auf ein Nichtstrukturprotein (NSs), das auf dem S-Segment codiert, zurückzuführen ist. Auch OROV codiert auf dem S-Segment für ein Nichtstrukturprotein, dessen Gen sich auf einem um +1 Nukleotid verschobenen Leseraster in der Sequenz des N-Proteins befindet.

#### *4.3.2 Die antagonistische Wirkung des OROV-NSs auf die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors*

Um die IFN-antagonistische Wirkung des OROV-NSs-Proteins im virusfreien Kontext zu untersuchen, wurden Reporterassays (vgl. Kap. 3.2.2.3) durchgeführt, mit deren Hilfe die Aktivität des IFN- $\beta$ -Promotors in mit VSV-RNA und synthetischer dsRNA stimulierten Zellen in An- und Abwesenheit des OROV-NSs-Proteins gemessen wurde. Es wurden zwei Zelllinien (293T und VeroE6, vgl. Kap. 2.3.1) verwendet, um eine mögliche Wirtszellspezifität auszuschließen.

Es konnte in beiden Zelllinien eine statistisch signifikante Hemmung der Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors durch das OROV-NSs-Protein nachgewiesen werden, unabhängig vom verwendeten Stimulus (dsRNA bzw. VSV-RNA) und unabhängig von der verwendeten Zelllinie. Da in der Kontrolle ohne NSs eine statistisch signifikante Aktivierung des Promotors gemessen werden konnte, ist davon auszugehen, dass sowohl durch synthetische dsRNA als auch durch VSV-RNA eine Aktivierung stattgefunden hat.

Damit konnte gezeigt werden, dass das OROV-NSs die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors hemmt. Hierbei interagiert das NSs-Protein des OROV anscheinend mit einer Komponente,

die spezieübergreifend vorhanden ist, da es sowohl in der humanen Zelllinie (293) als auch der Affenzelllinie (VeroE6) den gleichen Effekt zeigt.

Da OROV-NSs unabhängig vom verwendeten Stimulus, RNA mit unmodifizierten 5'-Triphosphat-Enden (VSV-RNA) bzw. synthetische dsRNA (poly(I:C)), die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors hemmt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Hemmmechanismus nicht um eine spezifische Hemmung einer der beiden intrazellulären Sensoren RIG-I bzw. MDA5 handelt. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass entweder OROV-NSs in der Lage ist, mit beiden Sensoren zu interagieren, oder die Hemmung der IFN- $\beta$ -Induktion durch OROV-NSs stromabwärts in der Signalkaskade zu suchen ist.

Im Vergleich mit dem RVFV-NSs zeigt sich, dass das OROV-NSs-Protein ein ähnlich starkes Hemmpotenzial aufweist. Beide NSs-Proteine unterdrücken unter gegebenen Voraussetzungen statistisch signifikant die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors.

### ***4.3.3 Die antagonistische Wirkung des OROV-NSs auf IRF3-, NF $\kappa$ B- und AP1-responsive Promotoren***

Da die Transkription der IFN- $\beta$ -mRNA von den zellulären Transkriptionsfaktoren IRF3, AP1 und NF $\kappa$ B abhängig ist, wurde überprüft, ob OROV die Aktivierungskaskade einer der Transkriptionsfaktoren spezifisch hemmt oder stromabwärts generell die Transkription blockiert. Die genannten Transkriptionsfaktoren sind in vielen Fällen Angriffspunkt viraler IFN-Antagonisten. Das multifunktionale NS1-Protein des Influenzavirus beispielsweise verhindert die Aktivierung des IRF3 (Talon et al. 2000; Garcia-Sastre 2001). Die Inaktivierung von IRF3 durch Hemmung der Phosphorylierung (Rabies-Virus und Ebola-Virus) oder andere Mechanismen (Bildung von viralen IRF-Homologen durch HHV-8), ist von einigen weiteren Virusarten bekannt (Haller et al. 2006).

Mithilfe von Reporterplasmiden mit speziellen, für nur jeweils einen der Transkriptionsfaktoren AP1-, NF $\kappa$ B- und IRF3- responsiven, artifiziellen Promotoren, die an die PRDs (*positive regulatory domains*) IV, I, III des IFN- $\beta$ -Promotors binden, wurde untersucht (vgl. Kap. 3.2.2.4), ob OROV-NSs in der Lage ist, die Aktivierung artifizierlicher Promotoren, die selektiv durch IRF-3, NF- $\kappa$ B und AP-1 aktivierbar sind, zu hemmen bzw. im Falle von IRF3 die Translokation in den Zellkern hemmt.

Es zeigte sich, dass OROV-NSs die Aktivierung des IRF3-reponsiven Promotors in beiden untersuchten Zelllinien unabhängig vom verwendeten Stimulus (VSV-RNA, dsRNA) komplett hemmt (vgl. Abbildung 51 und Abbildung 52). Im Vergleich mit den VSV-RNA-stimulierten 293T-Zellen wird deutlich, dass in den Zellen der Negativkontrolle (ohne OROV-NSs) mit der VSV-RNA eine starke Aktivierung des Promotors erreicht werden konnte, wohingegen in Anwesenheit von OROV-NSs keinerlei Aktivierung möglich war. Auch im Falle der Stimulation mit synthetischer dsRNA (poly(I:C)) war in Anwesenheit von OROV-NSs keinerlei Aktivierung

des IFN- $\beta$ -Promotors zu beobachten. Problematisch war hierbei allerdings, dass die Stimulation mit synthetischer dsRNA (poly(I:C)) im Kontrollansatz wesentlich ineffektiver war im Vergleich zu VSV-RNA, was zur Folge hatte, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und dem Ansatz mit OROV-NSs zu beobachten waren. Möglicherweise ist der zytotoxische Effekt der transfizierten synthetischen dsRNA sehr viel stärker als der von transfizierter VSV-RNA. Vergleicht man die Wirkung des OROV-NSs mit dem RVFV-NSs-Protein, so wird ersichtlich, dass das RVFV-NSs-Protein nicht nur die Aktivierung des Promotors hemmt, sondern auch die Grundaktivität des Promotors. Das RVFV-NSs zeigt im Vergleich zu dem OROV-NSs eine stärkere Hemmung des IRF3-responsiven Promotors.

In den VeroE6-Zellen ist mit synthetischer dsRNA eine etwas effizientere Stimulation erzielt worden als in den 293T-Zellen. Allerdings wurde mithilfe der VSV-RNA eine geringere Stimulation erreicht als in den 293-Zellen. Wie sich zeigte, hemmt OROV-NSs, wie auch RVFV-NSs, die Promotoraktivität der mit VSV-RNA stimulierten Ansätze mit statistischer Signifikanz (vgl. Abbildung 51). Sowohl OROV-NSs als auch RVFV-NSs hemmen die Aktivierung des Promotors in den Ansätzen, die mit synthetischer dsRNA stimuliert wurden. Allerdings ist der Unterschied zur Negativkontrolle statistisch nicht signifikant. Auch hier spielt die Zytotoxizität des poly(I:C) möglicherweise eine entscheidende Rolle.

In Anwesenheit von OROV-NSs zeigte sich eine geringe, aber statistisch nicht signifikante Aktivierung des mit VSV-RNA und dsRNA stimulierten Promotors. Im Gegensatz dazu hemmt RVFV-NSs die Aktivierung des Promotors unabhängig von der Stimulation komplett. Dies zeigt, dass OROV-NSs offensichtlich ein weniger effizienter Inhibitor ist als RVFV-NSs.

#### *4.3.4 Einfluss des OROV-NSs auf die Translokation von IRF3 in den Zellkern*

Da IRF3 im Gegensatz zu NF $\kappa$ B oder AP1 in der Lage ist, ohne die synergistische Wirkung anderer Transkriptionsfaktoren den IFN- $\beta$ -Promotor zu aktivieren (Haller et al. 2006), wurde überprüft, ob das OROV-NSs-Protein einen Einfluss auf die Translokation von IRF3 in den Zellkern nimmt. Die Hemmung der IRF3 Kerntranslokation ist für den IFN-antagonistischen Effekt einiger Viren verantwortlich, wie z.B. Rabies-Virus, Ebola-Virus, oder HHV8 (Brzozka et al. 2005).

Mithilfe eines Immunfluoreszenzverfahrens (vgl. Kap.3.2.2.4) wurde untersucht, ob OROV-NSs die durch Stimulation mit synthetischer dsRNA induzierte Kerntranslokation von IRF3 hemmen kann. Von den Negativstrang-RNA-Viren Rabies-Virus (Brzozka et al., 2005) und Ebola-Virus (Basler et al., 2003) ist bekannt, dass die Translokation des IRF3 durch das virale Phosphoprotein (P-Protein) verhindert wird, das die Phosphorylierung des IRF3 als Voraussetzung für die Homodimerisierung und Translokation in den Kern verhindert.

Wie sich in der Immunfluoreszenz zeigte, ließ sich IRF3 nach Stimulation der Zellen mit synthetischer dsRNA in An- und Abwesenheit des OROV-NSs im Zellkern nachweisen (vgl. Abbildung 53). Es ist daher anzunehmen, dass die Wirkung des OROV-NSs nicht auf der Ebene der IRF3-Aktivierung bzw. der IRF3-Translokation in den Zellkern greift, sondern entweder auf der Ebene der intrazellulären RNA-Sensoren RIG-I und MDA5 oder auf der Ebene der Transkription. Eine Hemmung von RIG-I und MDA5 scheidet aus, da durch Stimulation mit VSV-RNA bzw. dsRNA eine Kerntranslokation von IRF3 erreicht werden kann, was auf einen funktionierenden Signalweg vom intrazellulären Sensor bis zur Aktivierung von IRF3 schließen läßt. Damit wird eine Hemmung der Promotoraktivierung auf Transkriptionsebene am wahrscheinlichsten, was auch im Einklang mit der Beobachtung steht, dass im Reporterassay die Aktivierung des IRF3-responsiven Promotors unterdrückt wurde, obwohl eine Aktivierung des IRF3 stattfindet. Einerseits wäre es denkbar, dass das OROV-NSs-Protein mit dem Transkriptionscoaktivator CBP300, der für die Bindung des Transkriptionsfaktors IRF3 an den IFN- $\beta$ -Promotor mit verantwortlich ist, interagiert und so die Anlagerung des Transkriptionsfaktors verhindert. Andererseits ist es auch möglich, das OROV-NSs selbst an den Promotor bindet und auf diese Weise die Anlagerung des Transkriptionfaktors blockiert.

Allerdings konnte im Reporterassay gezeigt werden, dass das OROV-NSs auch die Aktivierung NF $\kappa$ B- und AP1-responsiver Promotoren hemmt. So konnte gezeigt werden, dass das OROV-NSs die Aktivierung des NF $\kappa$ B-responsiven Promotors in beiden Zelllinien mit statistischer Signifikanz und mit fast dem gleichen Hemmpotenzial, wie sie auch das RVFV-NSs-Protein aufweist, hemmt (vgl. Kap. 3.2.2.4). Wie im Falle der Versuchsreihe mit dem IRF3-responsiven Promotorkonstrukt zeigte sich, dass die 293-Zellen mit dsRNA mit deutlich geringerer Effizienz stimulierbar waren als mit VSV-RNA. Möglicherweise ist dies auf die Zytotoxizität des poly(I:C) zurückzuführen. In dieser Versuchsreihe konnte dagegen in den VeroE6-Zellen mit dsRNA effizienter stimuliert werden als mit VSV-RNA. Möglicherweise reagieren die 293-Zellen empfindlicher auf die synthetische dsRNA als die VeroE6-Zellen.

Es zeigte sich, dass OROV-NSs auch in den VeroE6-Zellen die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-responsiven Promotors unabhängig vom Stimulus mit statistischer Signifikanz hemmt. Im Gegensatz zu RVFV-NSs, das offensichtlich nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Grundaktivität des Promotors hemmt, zeigt sich eine statistisch nicht signifikante Aktivierung des Promotors in dem mit dsRNA stimulierten Ansatz in Anwesenheit von OROV-NSs.

Auch die Aktivierung des AP1-responsiven Promotors wurde durch OROV-NSs in mit dsRNA stimulierten 293T Zellen im Vergleich zum Ansatz ohne OROV-NSs mit statistischer Signifikanz gehemmt (vgl. Kap. 3.2.2.5). In dieser Versuchsreihe konnte eine Aktivierung des AP1-responsiven Promotors durch VSV-RNA in 293T-Zellen nicht erreicht werden. Ebenso wenig zeigte sich eine ausreichende Stimulation der VeroE6-Zellen mit dsRNA und VSV-RNA.

Aufgrund der Ergebnisse kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass die IFN-antagonistische Wirkung des OROV-NSs nicht durch die Hemmung eines spezifischen Tran-

skriptionsfaktors verursacht wird. Eine für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor spezifische Hemmung der Aktivierung ist eher unwahrscheinlich, da die Aktivierung auf sehr unterschiedliche Weise abläuft (vgl. Abbildung 1). Es muß sich vielmehr um einen Mechanismus handeln, der stromabwärts der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, NF $\kappa$ B und AP1 möglicherweise auf der Ebene der Transkription oder Translation stattfindet.

#### *4.3.5 Die hemmende Wirkung des OROV-NSs auf den konstitutiv aktiven SV40-Promotor*

Davon ausgehend, dass der Hemmmechanismus des OROV-NSs stromabwärts der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren die IFN- $\beta$ -Promotoraktivierung blockiert, sollte ermittelt werden, ob die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promotors lediglich unterdrückt wird oder ob durch eine allgemeine Hemmung auch andere Promotoren betroffen sind.

Zusätzlich zu dem Reporterplasmid, das den IFN- $\beta$ -Promotor enthält, wurde ein Reporterplasmid transfiziert, das unabhängig von der Stimulation über einen konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Expression der Renilla-Luciferase führt. Auffällig war, dass in allen Ansätzen, in denen OROV-NSs exprimiert wurde, eine stark verminderte Renilla-Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollansätzen gemessen wurde. Als mögliche Ursache hierfür kommt die Hemmung der zellulären Transkription und/oder Translation durch OROV-NSs-Protein in Betracht. Weiterhin ist denkbar, dass die Expression von OROV-NSs zytotoxisch ist und zu einem Absterben der transfizierten Zellen führt. Da bei den transfizierten Zellen zumindest optisch (Mikroskop) keine Unterschiede der Zellzahl in den Ansätzen mit und ohne OROV-NSs Expression zu beobachten war, ist letztere Möglichkeit wenig wahrscheinlich. Allerdings müssten zusätzlich Zellviabilitätsmessungen bzw. Apoptose-Messungen durchgeführt werden, um diese Möglichkeit definitiv ausschließen zu können.

Die Beobachtungen, dass durch OROV-NSs-Protein sowohl die IRF3, NF $\kappa$ B und AP-1-responsiven Promotoren gehemmt werden als auch die Aktivität des SV40-Promotors reduziert wird, lässt vermuten, dass OROV-NSs eine generelle Hemmung der zellulären Transkription bzw. Translation bewirkt.

Von anderen Bunyaviren ist bekannt, dass die NSs-vermittelte Hemmung der IFN-Induktion auf der Ebene der Transkription stattfindet, wobei die verschiedenen NSs-Proteine unterschiedliche Angriffspunkte haben. Vom RVFV-NSs weiß man, dass es einerseits das basale zelluläre Transkriptions-System hemmt (Billecoq et al. 2004; Le May et al. 2004). Dabei verhindert es die Bildung des Komplexes aus p44, XPB und XPD, die als Komponenten des zellulären Transkriptionsfaktors IIH (TFIIH) einen essenziellen Cofaktor der zellulären RNA-Polymerase II (RNAP II) darstellen (Le May et al. 2004). Andererseits bindet RVFV-NSs an den TF YY1, der eine Untereinheit eines Sin3A/NCoR/HDACs-Repressor-Komplexes darstellt und für die Regulation der Gen-Expression des IFN- $\beta$  mitverantwortlich ist. Dies führt in der Konsequenz zu einer Hemmung der IFN- $\beta$ -Expression (Le May et al. 2008).

Das NSs des mit OROV näher verwandten BUNV (beide gehören dem Genus *Orthobunyavirus* an) hat ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die generelle Gen-Expression und damit auch auf die Transkription des IFN- $\beta$  (Weber et al. 2002). Dabei interferiert das BUNV-NSs mit dem MED8-Protein des Mediator Komplexes. Der Mediator Komplex ist eine weitere basale Komponente der durch die RNA-Polymerase II vermittelten Transkription. Er aktiviert die durch die TFIIF-Kinase vermittelte Phosphorylierung der Serin-5-Reste der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II, was einen wichtigen Schritt für die Aktivierung der zellulären Transkription darstellt (Leonard et al. 2006).

Aus den durchgeführten Experimenten ist der genaue Mechanismus für OROV-NSs noch nicht abzuleiten. Es ist wahrscheinlich, dass es sich wie im Falle des RVFV-NSs und des BUNV-NSs um eine Hemmung der zellulären Transkription durch die Hemmung der RNA-Polymerase II handelt. Um die Möglichkeit einer (zusätzlichen) Translationshemmung durch OROV-NSs auszuschließen, müssten zusätzliche Reporterassays durchgeführt werden, bei denen anstelle der Reporter-Plasmide *in vitro* transkribierte Reporter-RNA transfiziert wird. Sollte hierbei in Anwesenheit von OROV-NSs keine Hemmung mehr beobachtet werden, wäre gezeigt, dass die Translation durch OROV-NSs nicht beeinflusst wird.

## 5 Zusammenfassung

Das Oropouche-Virus (OROV) ist ein humanpathogener Vertreter aus der Gattung der Orthobunyaviren innerhalb der Familie Bunyaviridae. Bisher existiert weder eine wirksame antivirale Therapie noch eine Impfung zur Behandlung bzw. Vorbeugung der durch OROV ausgelösten Dengue-Fieber-ähnlichen Erkrankung. Voraussetzungen hierfür sind ein Reverse-Genetik-System zur molekularen Charakterisierung und zur gezielten Attenuierung des Virus für die Entwicklung eines sicheren Impfstoffs sowie ein besseres Verständnis der viralen Pathogenitätsfaktoren.

Für die Etablierung eines OROV-Reverse-Genetik-Systems wurden alle OROV-Gensegmente des OROV-Stamms Trinidad kloniert, sequenziert und alle benötigten Rescue- und Helferplasmide hergestellt. Die Funktion der klonierten viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die die Grundlage des Reversen-Genetik-Systems darstellt, wurde in Minireplikon-Versuchen überprüft. Die Transkription bzw. Replikation eines OROV-Minigenoms konnte unter Einsatz der klonierten OROV-Polymerase nicht erreicht werden, gelang aber mit Hilfe der heterologen RNA-Polymerase des verwandten La-Crosse-Virus. Die Ursache für die Inaktivität des OROV-Minireplikon-Systems konnte nicht abschließend geklärt werden, die gewonnenen Daten weisen jedoch darauf hin, dass die klonierte OROV-Polymerase keine bzw. ungenügende Aktivität aufweist und gegebenenfalls neu kloniert werden muss, während das Nukleoprotein und die als Promotor wirkenden nicht-codierenden Genomenden funktionell sind.

Darüber hinaus wurde als potentieller Pathogenitätsfaktor das auf dem S-Segment des OROV-Genoms codierte Nichtstruktur- (NSs-) Protein kloniert und auf seine Typ-I-Interferon-antagonistischen Eigenschaften untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit war zuvor gezeigt worden, dass nach OROV-Infektion die Induktion des antiviral wirksamen Typ-I-Interferon- (IFN-) Systems ausbleibt. Im Virus-freien Kontext exprimiertes OROV-NSs war in der Lage, die Aktivierung des IFN- $\beta$  Promotors komplett zu unterdrücken und ist somit als wichtiger Pathogenitätsfaktor anzusehen. Die gewonnenen Ergebnisse weisen zudem darauf hin, dass diese Hemmung, ähnlich wie bei den NSs-Proteinen des Rift-Valley-Fever-Virus und des Bunyamwera-Virus, durch Interferenz mit der RNA-Polymerase II-vermittelten Transkription erfolgt. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass OROV mit dem NSs-Protein - analog zu anderen Bunyaviren - einen wirksamen viralen IFN-Antagonisten besitzt.

## 6 Literatur

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4), 783-801
2. Alcami A, Symons JA, Smith GL (2000): The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J Virol* 74 (23), 11230-9
3. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413 (6857), 732-8
4. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE (2004): The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49), 17264-9
5. Ank N, West H, Paludan SR (2006): IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 26 (6), 373-9
6. Anonymous (2000): Outbreak of Rift Valley fever-Saudi Arabia, August-October, 2000. *Morb Mortal Wkly Rep* 49 (40), 905-8
7. Azevedo RS, Nunes MR, Chiang JO, Bensabath G, Vasconcelos HB, Pinto AY, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG, Vasconcelos PF (2007): Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis* 13 (6), 912-5
8. Basler CF, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, Paragas J, Muhlberger E, Bray M, Klenk HD, Palese P, Garcia-Sastre A (2003): The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 77 (14), 7945-56
9. Billecocq A, Spiegel M, Vialat P, Kohl A, Weber F, Bouloy M, Haller O (2004): NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J Virol* 78 (18), 9798-806
10. Billiau A, Matthys P (2009): Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (2), 97-113
11. Blakqori G, Kochs G, Haller O, Weber F (2003): Functional L polymerase of La Crosse virus allows in vivo reconstitution of recombinant nucleocapsids. *J Gen Virol* 84 (Pt 5), 1207-14
12. Bouloy M, Janzen C, Vialat P, Khun H, Pavlovic J, Huerre M, Haller O (2001): Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J Virol* 75 (3), 1371-7
13. Bowen MD, Kariwa H, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST (1995): Genetic characterization of a human isolate of Puumala hantavirus from France. *Virus Res* 38 (2-3), 279-89
14. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J, Meurs EF (2005): Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* 79 (7), 3969-78
15. Brennan K, Bowie AG (2010): Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol* 13 (4), 503-7
16. Brinton MA, Gavin EI, Lo WK, Pinto AJ, Morahan PS (1993): Characterization of murine Caraparv Bunyavirus liver infection and immunomodulator-mediated antiviral protection. *Antiviral Res* 20 (2), 155-71

17. Brzozka K, Finke S, Conzelmann KK (2005): Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 79 (12), 7673-81
18. Burysek L, Yeow WS, Pitha PM (1999): Unique properties of a second human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor (vIRF-2). *J Hum Virol* 2 (1), 19-32
19. Burysek L, Yeow WS, Lubyova B, Kellum M, Schafer SL, Huang YQ, Pitha PM (1999): Functional analysis of human herpesvirus 8-encoded viral interferon regulatory factor 1 and its association with cellular interferon regulatory factors and p300. *J Virol* 73 (9), 7334-42
20. Calisher CH (1994): Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev* 7 (1), 89-116
21. Colby C, Morgan MJ (1971): Interferon induction and action. *Annu Rev Microbiol* 25 333-60
22. Darnell JE, Jr. (1997): STATs and gene regulation. *Science* 277 (5332), 1630-5
23. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000): Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103 (2), 351-61
24. Diaz MO, Pomykala HM, Bohlander SK, Maltepe E, Malik K, Brownstein B, Olopade OI (1994): Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* 22 (3), 540-52
25. Didcock L, Young DF, Goodbourn S, Randall RE (1999): The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol* 73 (12), 9928-33
26. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303 (5663), 1529-31
27. Elliott RM, Ed. (1996): *The Bunyaviridae*. New York, Plenum Press.
28. Elliott RM (1997): Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med* 3 (9), 572-7
29. Ergonul O (2006): Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 6 (4), 203-14
30. Findlay GM, MacCallum FO (1937): An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses. *J Pathol Bacteriol* 44 (2), 405-424
31. Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, et al. (2005): Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (8), 2986-91
32. Garcia-Sastre A (2001): Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 279 (2), 375-84
33. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000): Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81 (Pt 10), 2341-64
34. Haller O, Kochs G (2002): Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3 (10), 710-7
35. Haller O, Weber F (2009): The interferon response circuit in antiviral host defense. *Verh K Acad Geneesk Belg* 71 (1-2), 73-86
36. Haller O, Kochs G, Weber F (2006): The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344 (1), 119-30

37. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303 (5663), 1526-9
38. Hewlett MJ, Pettersson RF, Baltimore D (1977): Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. *J Virol* 21 (3), 1085-93
39. Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M, Lin R (1999): Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* 19 (1), 1-13
40. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, et al. (2005): IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434 (7034), 772-7
41. Hoskins M (1935): A Protective Action of Neurotropic Against Viscerotropic Yellow Fever Virus in *Macacus Rhesus*. *Am J Trop Med* s1-15 (6), 675-680
42. Isaacs A, Lindenmann J (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147 (927), 258-67
43. Iwamura T, Yoneyama M, Yamaguchi K, Suhara W, Mori W, Shiota K, Okabe Y, Namiki H, Fujita T (2001): Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells* 6 (4), 375-88
44. Iwasaki A, Medzhitov R (2004): Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5 (10), 987-95
45. Jefferies CA, Fitzgerald KA (2005): Interferon gene regulation: not all roads lead to Tolls. *Trends Mol Med* 11 (9), 403-11
46. Kalvakolanu DV, Nallar SC, Kalakonda S (2010): Cytokine-induced tumor suppressors: a GRIM story. *Cytokine* 52 (1-2), 128-42
47. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S (2005): IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6 (10), 981-8
48. Kinney RM, Calisher CH (1981): Antigenic relationships among Simbu serogroup (Bunyaviridae) viruses. *Am J Trop Med Hyg* 30 (6), 1307-18
49. Kolakofsky D, Hacker D (1991): Bunyavirus RNA synthesis: genome transcription and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 169 143-59
50. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP (2003): IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4 (1), 69-77
51. Le May N, Dubaele S, Proietti De Santis L, Billecocq A, Bouloy M, Egly JM (2004): TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell* 116 (4), 541-50
52. Le May N, Mansuroglu Z, Leger P, Josse T, Blot G, Billecocq A, Flick R, Jacob Y, Bonnefoy E, Bouloy M (2008): A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells. *PLoS Pathog* 4 (1), e13
53. Leonard VH, Kohl A, Hart TJ, Elliott RM (2006): Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *J Virol* 80 (19), 9667-75
54. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Jr., Lemon SM (2005): Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage

- of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (8), 2992-7
55. Li M, Lee H, Guo J, Neipel F, Fleckenstein B, Ozato K, Jung JU (1998): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor. *J Virol* 72 (7), 5433-40
  56. Lin R, Genin P, Mamane Y, Hiscott J (2000): Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol* 20 (17), 6342-53
  57. Livonesi MC, De Sousa RL, Badra SJ, Figueiredo LT (2006): In vitro and in vivo studies of ribavirin action on Brazilian Orthobunyavirus. *Am J Trop Med Hyg* 75 (5), 1011-6
  58. Livonesi MC, de Sousa RL, Badra SJ, Figueiredo LT (2007): In vitro and in vivo studies of the Interferon-alpha action on distinct Orthobunyavirus. *Antiviral Res* 75 (2), 121-8
  59. Lubyova B, Pitha PM (2000): Characterization of a novel human herpesvirus 8-encoded protein, vIRF-3, that shows homology to viral and cellular interferon regulatory factors. *J Virol* 74 (17), 8194-201
  60. Lubyova B, Kellum MJ, Frisancho AJ, Pitha PM (2004): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vIRF-3 stimulates the transcriptional activity of cellular IRF-3 and IRF-7. *J Biol Chem* 279 (9), 7643-54
  61. Marie I, Durbin JE, Levy DE (1998): Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* 17 (22), 6660-9
  62. Modrow S, Falke D, Truyen U: *Molekulare Virologie*, 2. Auflage; Spectrum Akademischer Verlag, 2003
  63. Mondini M, Costa S, Sponza S, Gugliesi F, Gariglio M, Landolfo S (2010): The interferon-inducible HIN-200 gene family in apoptosis and inflammation: implication for autoimmunity. *Autoimmunity* 43 (3), 226-31
  64. Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, Smith J, Bouloy M (1995): Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am J Trop Med Hyg* 53 (4), 405-11
  65. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G (2006): Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439 (7073), 208-11
  66. Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM (2003): STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77 (13), 7635-44
  67. Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J (2010): Rift Valley fever virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res* 41 (6), 61
  68. Pestka S (2000): The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 55 (4), 254-87
  69. Pinheiro FP, Travassos da Rosa AP, Travassos da Rosa JF, Ishak R, Freitas RB, Gomes ML, LeDuc JW, Oliva OF (1981): Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *Am J Trop Med Hyg* 30 (1), 149-60
  70. Precious B, Young DF, Andrejeva L, Goodbourn S, Randall RE (2005): In vitro and in vivo specificity of ubiquitination and degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of the paramyxoviruses simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2. *J Gen Virol* 86 (Pt 1), 151-8

71. Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N (1998): Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* 441 (1), 106-10
72. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, et al. (2000): Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13 (4), 539-48
73. Schmaljohn CS, Nichol ST: Bunyaviridae, in: *Fields Virology*, 2; hrsg. v. Knipe DM, Howley PM, Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, 1741-1789
74. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005): Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122 (5), 669-82
75. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, et al. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4 (1), 63-8
76. Silverman RH (1994): Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. *J Interferon Res* 14 (3), 101-4
77. Smith EJ, Marie I, Prakash A, Garcia-Sastre A, Levy DE (2001): IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* 276 (12), 8951-7
78. Smithburn KC, Haddow AJ, Mahaffy AF (1946): A neurotropic virus isolated from Aedes mosquitoes caught in the Semliki forest. *Am J Trop Med Hyg* 26 189-208
79. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998): How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67 227-64
80. Suhara W, Yoneyama M, Kitabayashi I, Fujita T (2002): Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* 277 (25), 22304-13
81. Symons JA, Alcami A, Smith GL (1995): Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81 (4), 551-60
82. Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, Garcia-Sastre A (2000): Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 74 (17), 7989-96
83. tenOever BR, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, Julkunen I, Hemmi H, Yamamoto M, Akira S, Yeh WC, et al. (2004): Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J Virol* 78 (19), 10636-49
84. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH (2005): Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23 307-36
85. Uddin S, Plataniias LC (2004): Mechanisms of type-I interferon signal transduction. *J Biochem Mol Biol* 37 (6), 635-41
86. Ulane CM, Kentsis A, Cruz CD, Parisien JP, Schneider KL, Horvath CM (2005): Composition and assembly of STAT-targeting ubiquitin ligase complexes: paramyxovirus V protein carboxyl terminus is an oligomerization domain. *J Virol* 79 (16), 10180-9
87. Unterstab G, Ludwig S, Anton A, Planz O, Dauber B, Krappmann D, Heins G, Ehrhardt C, Wolff T (2005): Viral targeting of the interferon- $\beta$ -inducing Traf family

- member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase-1. Proc Natl Acad Sci U S A 102 (38), 13640-5
88. Versteeg GA, Garcia-Sastre A (2010): Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. Curr Opin Microbiol 13 (4), 508-16
  89. Vilcek J (2003): Novel interferons. Nat Immunol 4 (1), 8-9
  90. Watts DM, Phillips I, Callahan JD, Griebenow W, Hyams KC, Hayes CG (1997): Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. Am J Trop Med Hyg 56 (2), 148-52
  91. Weber F, Bridgen A, Fazakerley JK, Streitenfeld H, Kessler N, Randall RE, Elliott RM (2002): Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. J Virol 76 (16), 7949-55
  92. Williams BR (1999): PKR; a sentinel kinase for cellular stress. Oncogene 18 (45), 6112-20
  93. Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Miura S, Jimbow K, Fujii N (2004): Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. J Virol 78 (12), 6282-6
  94. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T (2004): The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol 5 (7), 730-7
  95. Zimring JC, Goodbourn S, Offermann MK (1998): Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription. J Virol 72 (1), 701-7

## 7 Anhang

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Sequenzierungen der OROV-ORFs im Vergleich zu den in GenBank publizierten Referenzsequenzen (OROV-L: NC\_005776, OROV-M: NC\_005775, OROV-S: NC\_005777) dargestellt. Abweichungen der ermittelten Sequenzen zu den Referenzsequenzen sind durch Einrahmungen hervorgehoben.

## 7.1 OROV-L-ORF

	10      20      30      40      50      60      70	
NC_005776	ATGTCACAACCTGTTGCTCAACCAATATCGGAATAGGATATTGCACTGCCGTGAACCTGAGATAGCAAAGGATATA	118
OROV-L_corrected	ATGTCACAACCTGTTGCTCAACCAATATCGGAATAGGATATTGCACTGCCGTGAACCTGAGATAGCAAAGGATATA	75
	80      90      100      110      120      130      140      150	
NC_005776	TGGCGAGATCTATTAATGATCGACACAATTACTTTTCTCGGGAAATTTGCGAGAGCTGCAAACTCTTGAGTACAGA	193
OROV-L_corrected	TGGCGAGATCTATTAATGATCGACACAATTACTTTTCTCGGGAAATTTGCGAGAGCTGCAAACTCTTGAGTACAGA	150
	160      170      180      190      200      210      220	
NC_005776	AATGATGTTCTCTGCTGAGGATATTTGTGCTGAAGTCTTGTGATGGTTATAAAGCAAGGAAAGTTTCGCTTTTGTACA	268
OROV-L_corrected	AATGATGTTCTCTGCTGAGGATATTTGTGCTGAAGTCTTGTGATGGTTATAAAGCAAGGAAAGTTTCGCTTTTGTACA	225
	230      240      250      260      270      280      290      300	
NC_005776	CCTGATAATTACTTACTACATGATGGAAGATGTATATAATAGACTTCAAAGTGTCTGTAGACGACCGATCTTCT	343
OROV-L_corrected	CCTGATAATTACTTACTACATGATGGAAGATGTATATAATAGACTTCAAAGTGTCTGTAGACGACCGATCTTCT	300
	310      320      330      340      350      360      370	
NC_005776	AGAATCACAAAGGGAGAATAATAAGATGATTTTGGAGAGGTATCAATCCAGAAGGTGTAGATTTTGAATTTGTT	418
OROV-L_corrected	AGAATCACAAAGGGAGAATAATAAGATGATTTTGGAGAGGTATCAATCCAGAAGGTGTAGATTTTGAATTTGTT	375
	380      390      400      410      420      430      440      450	
NC_005776	ATTATTAGATTAGATCCTTCAAATATGACGATACATGTGGACTCTCGAGATTTTCGTGAATACAATTTGGGCCGATT	493
OROV-L_corrected	ATTATTAGATTAGATCCTTCAAATATGACGATACATGTGGACTCTCGAGATTTTCGTGAATACAATTTGGGCCGATT	450
	460      470      480      490      500      510      520	
NC_005776	ACATTAACATTAGTATGCAATGGTTTTTGTATGAAAGACTTCTTGTTCGGGAAATTTCCGGGATGATGATAAA	568
OROV-L_corrected	ACATTAACATTAGTATGCAATGGTTTTTGTATGAAAGACTTCTTGTTCGGGAAATTTCCGGGATGATGATAAA	525
	530      540      550      560      570      580      590      600	
NC_005776	TTCCATGCTATAATAAGTCAAGGAGAATTCACAATGACATTGCCATGGATTGAAGAAGACACCCAGAAATGGCTT	643
OROV-L_corrected	TTCCATGCTATAATAAGTCAAGGAGAATTCACAATGACATTGCCATGGATTGAAGAAGACACCCAGAAATGGCTT	600
	610      620      630      640      650      660      670	
NC_005776	ACTCATCCTATATACAATGAATTCATGAGTTCAATGCCAGAGGCAGAACAGGCCCTATTCAAGGAAGCATTGGAA	718
OROV-L_corrected	ACTCATCCTATATACAATGAATTCATGAGTTCAATGCCAGAGGCAGAACAGGCCCTATTCAAGGAAGCATTGGAA	675
	680      690      700      710      720      730      740      750	
NC_005776	TTCAAATCATTGGGGCAGAAAAATGGAATATCTTTTGAAGGGGGTGTATGTCAAAGTATGGTGAATATTATAAA	793
OROV-L_corrected	TTCAAATCATTGGGGCAGAAAAATGGAATATCTTTTGAAGGGGGTGTATGTCAAAGTATGGTGAATATTATAAA	750
	760      770      780      790      800      810      820	
NC_005776	GAATTTACTAAAGGACATGCTCATTCTATATTTCTGACAAACAGGGGACTACCCCAAGCCAGACAAAGACCAAATT	868
OROV-L_corrected	GAATTTACTAAAGGACATGCTCATTCTATATTTCTGACAAACAGGGGACTACCCCAAGCCAGACAAAGACCAAATT	825
	830      840      850      860      870      880      890      900	
NC_005776	TCAGCAGGTTGGAGAGAAATGGTAAACAGAGTAAGCTCTGAACGTGACATGTCAAATGACATAAATCAGGAAAAA	943
OROV-L_corrected	TCAGCAGGTTGGAGAGAAATGGTAAATAGAGTGAAGCTCTGAACGTGACATGTCAAATGACATAAATCAGGAAAAA	900
	910      920      930      940      950      960      970	
NC_005776	CCAAGCATGCATTTTATATGGGCAAGAAATGATTCAAAATAGCAACAATAATATACAAAAGCTAATCAAATATCT	1018
OROV-L_corrected	CCAAGCATGCATTTTATATGGGCAAGAAATGATTCAAAATAGCAACAATAATATACAAAAGCTAATCAAATATCT	975
	980      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050	
NC_005776	AAATCACTGCAAGCTATGAGCGGGACAGGGAGCTATGTAATGCTTTCAAGTCATTAGGGAGATTAAATGGATATA	1093
OROV-L_corrected	AAATCACTGCAAGCTATGAGCGGGACAGGGAGCTATGTAATGCTTTCAAGTCATTAGGGAGATTAAATGGATATA	1050
	1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120	
NC_005776	TCATCAGATGTTAAAAAATATGAATCATTTTGTGGGAAATGAAATCTCTGGCAAGGTCTAGTATAAAAAAATCT	1168
OROV-L_corrected	TCATCAGATGTTAAAAAATATGAATCATTTTGTGGGAAATGAAATCTCTGGCAAGGTCTAGTATAAAAAAATCT	1125
	1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200	
NC_005776	GACAGGAAAAATAGAGCCAATACAAAATGGGACTGCAACTGTCTTATGGGAACAGCAATTTAAACTAGATACAGAT	1243
OROV-L_corrected	GACAGGAAAAATAGAGCCAATTTCAAATGGGACTGCAACTGTCTTATGGGAACAGCAATTTAAACTAGATACAGAT	1200
	1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270	
NC_005776	GTTATAAAAAGAGAAGACAGAATACATTTAATGAAAGATTATCTTGGGATCGGTAAGCACAAATCATTTTCAAAG	1318
OROV-L_corrected	GTTATAAAAAGAGAAGACAGAATACATTTAATGAAAGATTATTTGGGATCGGTAAGCACAAATCATTTTCAAAG	1275
	1280      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350	
NC_005776	AAATTAACAACGACATAAACTGATAAGCCTAAAATATTAATTTCAACAATGATGATATAGTCAGGAAATGC	1393
OROV-L_corrected	AAATTAACAACGACATAAACTGATAAGCCTAAAATATTAATTTCAACAATGATGATATAGTCAGGAAATGC	1350
	1360      1370      1380      1390      1400      1410      1420	
NC_005776	AAAGATAAATATAATCAAGTCATACATAACCTATCCCAAATCAATGAATTAGATAAAGATTGGAAACTACCTAGAG	1468
OROV-L_corrected	AAAGATAAATATAATCAAGTCATACATAACCTATCCCAAATCAATGAATTAGATAAAGATTGGAAACTACCTAGAG	1425

	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	
NC_005776	CACTTTTCAGCTAAAATTAGTGCCCTGCAGTGTAGAAAATGTGGGATTTTATATATAATAACAACCAAACTAAATAC								1543
ORÖV-L_corrected	CA[TTTTC]A[CTAA]GATTAGTGCCCTGCAGTGTAGAAAATGTGGGATTTTATATATAATAACAAC[AAAACTAA]GTTAC								1500
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570		
NC_005776	TGGCAATGCATCAATGACTATTCCACCCTAATGAAAAACATGTTAGCTGTCTCTCAATATAATAGACACAATACG								1618
ORÖV-L_corrected	TGGCAATGCATCAATGACTATTCCACCCTAATGAAAAACATGTTAGCTGTCTCTCAATATAATAGACACAATACG								1575
	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	
NC_005776	TTTGAATTGTCTCATGTGCAACAATAATGTATTTGGTCTAGTAATGCCAAGCTCAGATATAAAGACAAAAAA								1693
ORÖV-L_corrected	TTTGAATTGTCTCATGTGCAACAATAATGTATTTGGTCTAGTAATGCCAAGCTCAGATATAAAGACAAAAAA								1650
	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720		
NC_005776	GCAACTTTAGTCTATGCAATAATGGCTCTCCATAATGAGGAGGCAGAAATAGCAGAACTTGGCTCACTCTACTCA								1768
ORÖV-L_corrected	GCAACTTTAGTCTATGCAATAATGGCTCTCCATAATGAGGAGGCAGAAATAGCAGAACTTGGCTCACTCTACTCA								1725
	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	
NC_005776	ACTTTTAAGACAGCAACAGGATATATTTCAATATCAAAAGGCTTTTAGGCTGGATAAAGAAAGATGCCAACGCATA								1843
ORÖV-L_corrected	ACTTTTAAGACAGCAACAGGATATATTTCAATATCAAAAGGCTTTTAGGCTGGATAAAGAAAGATGCCAACGCATA								1800
	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870		
NC_005776	GTATCTCTCCAGGCTTGTTCCTCATGACAAGCTGCCTATTATTCAACGGTAACAAGAGTTTGAATTTGATAAA								1918
ORÖV-L_corrected	GTATCTCTCCAGGCTTGTTCCTCATGACAAGCTGCCTATTATTCAACGGTAACAAGAGTTTGAATTTGATAAA								1875
	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	
NC_005776	TTACTAGGATTTTCATTTTACGTCACATATCAATTACGAAAGCTATGCTTCCCTTACTGAGCCTTCACGTTAT								1993
ORÖV-L_corrected	TTACTAGGATTTTCATTTTACGTCACATATCAATTACGAAAGCTATGCTTCCCTTACTGAGCCTTCACGTTAT								1950
	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020		
NC_005776	ATGATCATGAACTCGTTAGCAGTTTCCAGCCATGTAAGAGAGTATATATCTGAAAAATTCTCCCTTATACAAAA								2068
ORÖV-L_corrected	ATGATCATGAACTCGTTAGCAGTTTCCAGCCATGTAAGAGAGTATATATCTGAAAAATTCTCCCTTATACAAAA								2025
	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	
NC_005776	ACATCATTTTCTGTGGTAATGACAGACTTAATCAAGAAGGGTGTCTATTTCAGCATATGAACAGAGAAAAAAGTA								2143
ORÖV-L_corrected	ACATCATTTTCTGTGGTAATGACAGACTTAATCAAGAAGGGTGTCTATTTCAGCATATGAACAGAGAAAAAAGTA								2100
	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170		
NC_005776	CAAATAAGAGACATAAAATTAACAGATTATGATATAACACAAAAGGGAGTGGATTCCAAAAGAGATCTTAAATCT								2218
ORÖV-L_corrected	CAAATAAGAGACATAAAATTAACAGATTATGATATAACACAAAAGGGAGTGGATTCCAAAAGAGATCTTAAATCT								2175
	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	
NC_005776	ATTTGGTTCCAGGAAAGGTAACCTGAAAGAAATATTTAAACCAATTTATCTACCATTTTATTTAACTCTAAA								2293
ORÖV-L_corrected	ATTTGGTTCCAGGAAAGGTAACCTGAAAGAAATATTTAAACCAATTTATCTACCATTTTATTTAACTCTAAA								2250
	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320		
NC_005776	GGATTACATGAAAAACATCATGCTTGTAGATTTGGCTAAAACAGTACTAGAAATCGAAAAAGAGCAAAGGGAG								2368
ORÖV-L_corrected	GGATTACATGAAAAACATCATGCTTGTAGATTTGGCTAAAACAGTACTAGAAATCGAAAAAGAGCAAAGGGAG								2325
	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400	
NC_005776	TCATTACCTGAGCCATGGTCAGAGATACCTGCTAAGC-GACTGTCACTT--AATGTTTTAATTTACTCA-TTGA								2439
ORÖV-L_corrected	TCA[TTACCTGAGCCATGGTCAGAGATACCTGCTAAGC]GACTGTCA[CTTT]AATGTTTTAATTTA[TTCA]TTTGA								2400
	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470		
NC_005776	GGAA--CTGAATTTAGATACTTCAAGACATAATTTTGAAGAAGCCGGTGGAAAAACGCAAAATAATTTCAACAGA								2512
ORÖV-L_corrected	[GG]AATTTGAATTTAGATACTTCAAGACATAATTTTGAAGAAGCCGGT[GAAAA][GCAAAATAATTTCAACAGA								2475
	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	
NC_005776	TCATAACGACAATATCTACTTTTACCAGCTCAAAATCATGCATTAAGATTGGTGATTTTGAAGAAGAAAAA-G								2586
ORÖV-L_corrected	TCATAACGACAATATCTACTTTTACCAGCTCAAAATCATGCATTAAGATTGGTGATTTTGAAGAAGAAAAA[G								2550
	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620		
NC_005776	AGAAAACTAAGAATGATACAAAAGAACTTGCAAGGATATTTCTAAATTAACCATAGCCCAACCCAGCATCTT								2661
ORÖV-L_corrected	AGAAAACTAAGAATGATACAAAAGAACTTGCAAGGATATTTCTAAATTAACCATAGCCCAACCCAGCATCTT								2624
	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690		
NC_005776	AGATGAGATCACAACGAACATGAGATAAGGCATTCAACTTATGAGGACTTAAAACAATCTATCCCAGATTACAC								2736
ORÖV-L_corrected	AGATGA[AT]CACAACGAACATGAGATAAGGCATTCAACTTATGAGGACTTAAAACAATCTATCCCAGATTACAC								2699
	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	
NC_005776	AGATTATATGCTGTGAAAGTTTTTGACAGATTGTACGAGAAGATTACTACCAATGAAATAAATGATAAGGAAAC								2811
ORÖV-L_corrected	AGATTATATGCTGTGAAAGTTTTTGACAGATTGTACGAGAAGATTACTACCAATGAAATAA[G]GATAAGGAAAC								2774
	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840		
NC_005776	AGTCAAGCTGATTCTAGAGACCATGAAAAACATAAAATATTTTCAATTTGGATTCTTCAATAAAGGCACAAAAAC								2886
ORÖV-L_corrected	AGTCAA[AT]CTGATTCTAGAGACCATGAAAAACATAAAATATTTTCAATTTGG[TT]CTTCAATAAAGGCACAAAAAC								2849

	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2910	2920	
NC_005776	AGCCAAAGATAGAGAAATATTTTTAGGTGAATTTGAAGCAAAAATGTGTCTGTACCTTGTGCGAAAGAAATAGCTAA								2961
ORÖV-L_corrected	AGCCAAAGATAGAGAAATATTTTTAGGTGAATTTGAAGCAAAAATGTGTCTGTACCTTGTGCGAAAGAAATAGCTAA								2924
	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990		
NC_005776	AGAGAGGTGCAAATTAACCCCTGAAGAAATGATAAGTGAACCGGACTCGAAACTAAGGGTATTAGAGAAGCA								3036
ORÖV-L_corrected	AGAGAGGTGCAAATTAACCCCTGAAGAAATGATAAGTGAACCGGACTCGAAACTAAGGGTATTAGAGAAGCA								2999
	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	
NC_005776	ATCAGAAGACGAAATCAGGTATATTAGCAATACAATAAGACATTAGGGAATGCCATAGAGAAGCTTGCATCTGG								3111
ORÖV-L_corrected	ATCAGAAGACGAAATCAGGTATATTAGCAATACAATAAGACATTAGGGAATGCCATAGAGAAGCTTGCATCTGG								3074
	3080	3090	3100	3110	3120	3130	3140		
NC_005776	ATCTTTAAATTTGGGCAGATATATGCGAAAACAAAGCAAGAGGACTTAAGATAGAAAATAAATGCTGATATGTCCAA								3186
ORÖV-L_corrected	ATCTTTAAATTTGGGCAGATATATGCGAAAACAAAGCAAGAGGACTTAAGATAGAAAATAAATGCTGATATGTCCAA								3149
	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	
NC_005776	ATGGAGTGCCCAAGATGTACTTTTTAAATTTTTGGTTGATAGTGTCTTATATCCCTGCTGAGAG								3261
ORÖV-L_corrected	ATGGAGTGCCCAAGATGTACTTTTTAAATTTTTGGTTGATAGTGTCTTATATCCCTGCTGAGAG								3224
	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290		
NC_005776	GAAAAGGATAATTTATTCCTCTGTAATTATATGCAGAAAAGGCTTATAATGCCGATGAATGCTCACTACTAT								3336
ORÖV-L_corrected	GAAAAGGATAATTTATTCCTCTGTAATTATATGCAGAAAAGGCTTATAATGCCGATGAATGCTCACTACTAT								3299
	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	
NC_005776	ATTGGATCAAAGAGTTCCCTTATTCAAATGACATAATTGGATTAATGACAAACAATTATAGGCTAATACAGTAGA								3411
ORÖV-L_corrected	ATTGGATCAAAGAGTTCCCTTATTCAAATGACATAATTGGATTAATGACAAACAATTATAGGCTAATACAGTAGA								3374
	3380	3390	3400	3410	3420	3430	3440		
NC_005776	AATAAAGCGTAACCTGGCTTCAAGGCAACTTAAATTATACAAGCAGTTACTTACACAGCTGTAGTATGCTGTGTA								3486
ORÖV-L_corrected	AATAAAGCGTAACCTGGCTTCAAGGCAACTTAAATTATACAAGCAGTTACTTACACAGCTGTAGTATGCTGTGTA								3449
	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510	3520	
NC_005776	CAAAGATATAATAAGAGAAGCAGCAATATTATTAGAAGGAGAAGCCCTTGTGAACCTCAATGGTACATTCTGATGA								3561
ORÖV-L_corrected	CAAAGATATAATAAGAGAAGCAGCAATATTATTAGAAGGAGAAGCCCTTGTGAACCTCAATGGTACATTCTGATGA								3524
	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590		
NC_005776	TAATCAAACATCTATATGTATGGTGCAGAAATAAATTACCAGATGACAAATAAATGAATTTTGCATTAAGATATT								3636
ORÖV-L_corrected	TAATCAAACATCTATATGTATGGTGCAGAAATAAATTACCAGATGACAAATAAATGAATTTTGCATTAAGATATT								3599
	3600	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	
NC_005776	CGAGAAGATATGCTTAACTTTTGGCAATCAGGCAAAATATGAAGAAGACATATCTAACTAACTCATCAAAGAGTT								3711
ORÖV-L_corrected	CGAGAAGATATGCTTAACTTTTGGCAATCAGGCAAAATATGAAGAAGACATATCTAACTAACTCATCAAAGAGTT								3674
	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740		
NC_005776	TGTTTCTTTATTTAATATACATGGAGAACCATTTTCTATATATGGGAGATTCTACTCACAGCAGTAGGAGACTG								3786
ORÖV-L_corrected	TGTTTCTTTATTTAATATACATGGAGAACCATTTTCTATATATGGGAGATTCTACTCACAGCAGTAGGAGACTG								3749
	3750	3760	3770	3780	3790	3800	3810	3820	
NC_005776	TGCCATCTAGGGCCTTATGAAGATTTAGCAAGTAGGCTATCTGCAACACAAACTGCTATAAAGCATGGTTGCC								3861
ORÖV-L_corrected	TGCCATCTAGGGCCTTATGAAGATTTAGCAAGTAGGCTATCTGCAACACAAACTGCTATAAAGCATGGTTGCC								3824
	3830	3840	3850	3860	3870	3880	3890		
NC_005776	ACCATCACTTGCATGGGTATCTATCGCTCTAAATCACTGGATAACCCACACTACATATAAATATGTTGCCCTGGCCA								3936
ORÖV-L_corrected	ACCATCACTTGCATGGGTATCTATCGCTCTAAATCACTGGATAACCCACACTACATATAAATATGTTGCCCTGGCCA								3899
	3900	3910	3920	3930	3940	3950	3960	3970	
NC_005776	AAATAATGACCCGTTACCATTCTTCCCTACTAACAATAGAAGTGAATAACCAGTAGAGATGTGCGGAATACTAGA								4011
ORÖV-L_corrected	AAATAATGACCCGTTACCATTCTTCCCTACTAACAATAGAAGTGAATAACCAGTAGAGATGTGCGGAATACTAGA								3974
	3980	3990	4000	4010	4020	4030	4040		
NC_005776	AAGTGATTTATCAACAATTGCACTAACTGGTTTGAAGCAGGGAAATGTCACGTTTCTAACAATAATAGCAAGGAA								4086
ORÖV-L_corrected	AAGTGATTTATCAACAATTGCACTAACTGGTTTGAAGCAGGGAAATGTCACGTTTCTAACAATAATAGCAAGGAA								4049
	4050	4060	4070	4080	4090	4100	4110	4120	
NC_005776	GTTATCATCCCCAATCTTACAAGAGAAAGTATTCAAGATCAATACAATTCTATAGAAAAGTGGGATCTGAGCAA								4161
ORÖV-L_corrected	GTTATCATCCCCAATCTTACAAGAGAAAGTATTCAAGATCAATAAATTCTATAGAAAAGTGGGATCTGAGCAA								4124
	4130	4140	4150	4160	4170	4180	4190		
NC_005776	ATTATCACAGATCGACATTCTAAGGCTTAAAAATGCTCAGGTATATATCTTGTATAGTTTCAGTCACATCTGATGA								4236
ORÖV-L_corrected	ATTATCACAGATCGACATTCTAAGGCTTAAAAATGCTCAGGTATATATCTTGTATAGTTTCAGTCACATCTGATGA								4199
	4200	4210	4220	4230	4240	4250	4260	4270	
NC_005776	TGGTATGGGGGAGACTAGTGAATGAGATCTCGATCACTTTTAAACCTCGTAAATTCACAACAAGTGGGTCCT								4311
ORÖV-L_corrected	TGGTATGGGGGAGACTAGTGAATGAGATCTCGATCACTTTTAAACCTCGTAAATTCACAACAAGTGGGTCCT								4274

	4280	4290	4300	4310	4320	4330	4340	
NC_005776	TAATAGGTTGAAATCATATAAAGACTTTCAAGATATAATAGCAGATGAGGACAAGACAAACGAACTATTTGAGAA							4386
OROV-L_corrected	TAATAGGTTGAAATCATAAAGAAATTTCAAGATATAATAGCAGATGAGGACAAGACAAACGAACTATTTGAGAA							4349
	4350	4360	4370	4380	4390	4400	4410	4420
NC_005776	TTTCATTAGACACCCAGAGTTACTGGTTACAAAAGCGCAAACATTTGAAGAATTTGTTAATACGATATTATTTAG							4461
OROV-L_corrected	TTTCATTAGACACCCAGAGTTACTGGTTACAAAAGCGCAAACATTTGAGAATTTGTTAATACGATATTATTTAG							4424
	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	
NC_005776	GTACAATTCAAAGAAATTCAAAGAATCTTTGTCAATACAAAACCCAGCACAGCTTTTATTGAGCAAAATATTATT							4536
OROV-L_corrected	GTACAATTCAAAGAAATTCAAAGAATCTTTGTCAATACAAAACCCAGCACAGCTTTTATTGAGCAAAATATTATT							4499
	4500	4510	4520	4530	4540	4550	4560	4570
NC_005776	TTCCAATAAACCCAGTAATTTGACTACACTAGCATACATGACAAGATTTTGGATTACAAGACATGCCAGGAATTGA							4611
OROV-L_corrected	TTCCAATAAACCCAGTAATTTGACTACACTAGCATACATGACAAGATTTTGGATTACAAGACATGCCAGGAATTGA							4574
	4580	4590	4600	4610	4620	4630	4640	
NC_005776	AGAACTAGATACAATTATAGGTCGCAAAACATTTGTTGAGAGTTATGTTCAAAATCGTAGATGACTTAAGCAATTT							4686
OROV-L_corrected	AGAACTAGATACAATTATAGGTCGCAAAACATTTGTTGAGAGTTATGTTCAAAATCGTAGATGACTTAAGCAATTT							4649
	4650	4660	4670	4680	4690	4700	4710	4720
NC_005776	AACATTGGATATAAACGATGTCAAGACTATATTTGCTTTTGTCTTATGAATGACCCACTACTGATCACATCTGC							4761
OROV-L_corrected	AACATTGGATATAAACGATGTCAAGACTATATTTGCTTTTGTCTTATGAATGACCCACTACTGATCACATCTGC							4724
	4730	4740	4750	4760	4770	4780	4790	
NC_005776	TAACAATATAAATAATGTCTGTTAAGGGACATAGTCAAGAAAGAATAGGTCAAATCAGCATGCAAAATGCCAGAGGT							4836
OROV-L_corrected	TAACAATATAAATAATGTCTGTTAAGGGACATAGTCAAGAAAGAATAGGTCAAATCAGCATGCAAAATGCCAGAGGT							4799
	4800	4810	4820	4830	4840	4850	4860	4870
NC_005776	CCGAAGTCTAAAACCTCATACATTATCCAGCAGTTGTTTTGAGAGCCTATGTGAGAGGGCCAACAATGTACC							4911
OROV-L_corrected	CCGAAGTCTAAAACCTCATACATTATCCAGCAGTTGTTTTGAGAGCCTATGTGAGAGGGCCAACAATGTACC							4874
	4880	4890	4900	4910	4920	4930	4940	
NC_005776	GAATGTAGATATAGATGAACCTGCAAGGGATCTATCTCATTAGAAAGACTTCATACAAAGTACAAAACCTCAGAGA							4986
OROV-L_corrected	GAATGTAGATATAGATGAACCTGCAAGGGATCTATCTCATTAGAAAGACTTCATACAAAGTACAAAACCTCAGAGA							4949
	4950	4960	4970	4980	4990	5000	5010	5020
NC_005776	AAATATGAGAGAGAGAATAGAAAATAATGAGAAGCGGCCTTAGGAAGGGATTTCAAATTTGAAATCAAAGAACT							5061
OROV-L_corrected	AAATATGAGAGAGAGAATAGAAAATAATGAGAAGCGGCCTTAGGAAGGGATTTCAAATTTGAAATCAAAGAACT							5024
	5030	5040	5050	5060	5070	5080	5090	
NC_005776	AACTAGATTTTACCAAGTGTGTTATGATTACATAAAGTCTACAGAACATAAAGTCAAGGTATTCATATTGCCATA							5136
OROV-L_corrected	AACTAGATTTTACCAAGTGTGTTATGATTACATAAAGTCTACAGAACATAAAGTCAAGGTATTCATATTGCCATA							5099
	5100	5110	5120	5130	5140	5150	5160	5170
NC_005776	CAAAGTTTTACATCAATAGAATTCTGCGGGGCACTGACAGGTAACCTTGATAAATGACAAAATATGGTACATAAC							5211
OROV-L_corrected	CAAAGTTTTACATCAATAGAATTCTGCGGGGCACTGACAGGTAACCTTGATAAATGACAAAATATGGTACATAAC							5174
	5180	5190	5200	5210	5220	5230	5240	
NC_005776	GCATTATCTGAAAAATATAGTGTCTACTACACATAAGGCACAAATTTCTTCTTCCACTGAATTTGGAATTTGCAAT							5286
OROV-L_corrected	GCATTATCTGAAAAATATAGTGTCTACTACACATAAGGCACAAATTTCTTCTTCCACTGAATTTGGAATTTGCAAT							5249
	5250	5260	5270	5280	5290	5300	5310	5320
NC_005776	TGCTGATGAGGCACTAAGACTAGTAGCACATTTTGTGATCTTTCTTGGCATCAGAATCAAGAATACAATTTCT							5361
OROV-L_corrected	TGCTGATGAGGCACTAAGACTAGTAGCACATTTTGTGATCTTTCTTGGCATCAGAATCAAGAATACAATTTCT							5324
	5330	5340	5350	5360	5370	5380	5390	
NC_005776	GAAGAAAATTTATGAAGAATTCACATACAAAAGGGATACCTGTAAAACATTTATACTCAAAAATAAAGAACTCCAA							5436
OROV-L_corrected	GAAGAAAATTTATGAAGAATTCACATACAAAAGGGATACCTGTAAAACATTTATACTCAAAAATAAAGAACTCCAA							5399
	5400	5410	5420	5430	5440	5450	5460	5470
NC_005776	GTTGAGGGTTAAATTTCTAGGGATTCTTTTATGGTTAGATGATCTAACACAGAATGATCTGGATAAATTTGATGC							5511
OROV-L_corrected	GTTGAGGGTTAAATTTCTAGGGATTCTTTTATGGTTAGATGATCTAACACAGAATGATCTGGATAAATTTGATGC							5474
	5480	5490	5500	5510	5520	5530	5540	
NC_005776	AGATAAATCAGATGAAAAGATTATATGGAATAACTGGCAAGTGTCAAGAGATATGAATACTGGACCAATAGACTT							5586
OROV-L_corrected	AGATAAATCAGATGAAAAGATTATATGGAATAACTGGCAAGTGTCAAGAGATATGAATACTGGACCAATAGACTT							5549
	5550	5560	5570	5580	5590	5600	5610	5620
NC_005776	AATGATAAGCGGTTACTCTAGACAGTGCAGGATCACTGGGGAAGATGACAAAATGATTGCTGCTGAATTTGCAGGT							5661
OROV-L_corrected	AATGATAAGCGGTTACTCTAGACAGTGCAGGATCACTGGGGAAGATGACAAAATGATTGCTGCTGAATTTGCAGGT							5624
	5630	5640	5650	5660	5670	5680	5690	
NC_005776	TACTAGATTGTCAGAAGATTTAATTTATAGACACGGTCAGGCAATGTTGAATAAGCCACACGGCTTAAAGCTTGA							5736
OROV-L_corrected	TACTAGATTGTCAGAAGATTTAATTTATAGACACGGTCAGGCAATGTTGAATAAGCCACACGGCTTAAAGCTTGA							5699

	5700	5710	5720	5730	5740	5750	5760	5770	
NC 005776	AAAAATGCAACCTGTGACTGAGATGTCTAAACGATTACATTATATCGTTTTCCAGCAAAGATCACGGAAACGATA								5811
ORÖV-L_corrected	AAAAATGCAACCTGTGACTGAGATGTCTAAACGATTACATTATATCGTTTTCCAGCAAGAGATCACGGAAACGATA								5774
	5780	5790	5800	5810	5820	5830	5840		
NC 005776	CTTCTATTCTATATTACCCACCCAAAGTAATTGAGGACCATAAATCTAGAGTTGAATCATCTAGGCTAAGCAGAGA								5886
ORÖV-L_corrected	CTTCTATTCTATATTACCAACCCAAAGTAATTGAGGACCATAAATCTAGAGTTGAATCATCTAGGCTAAGCAGAGA								5849
	5850	5860	5870	5880	5890	5900	5910	5920	
NC 005776	TTCAAAATGGGTTCCCTGTATGCCCTGTTGCAATATCAAAACTCTACCAACAAGGACGGCCTATACTTCCAAAAGT								5961
ORÖV-L_corrected	TTCAAAATGGGTTCCCTGTATGCCCTGTTGCAATATCAAAACTCTACCAACAAGGACGGCCTATACTTCCAAAAGT								5924
	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990		
NC 005776	TAGAAATCTGAATATGCAGACTCATTTCGCTTCCAGAATACAAGTTAATGTAGATGAATATGCCATCACGAGAAG								6036
ORÖV-L_corrected	TAGAAATCTGAATATGCAGACTCATTTCGCTTCCAGAATACAAGTTAATGTAGATGAATATGCCATCACGAGAAG								5999
	6000	6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	
NC 005776	AGCACATTTTCAGAAAATGCCTTTCTTGAAGGACCATCAATCCCTTCTGGTGGTATGGATTTGTCTGAGTTGAT								6111
ORÖV-L_corrected	AGCACATTTTCAGAAAATGCCTTTCTTGAAGGACCCTCAATCCCTTCTGGTGGTATGGATTTGTCTGAGTTGAT								6074
	6080	6090	6100	6110	6120	6130	6140		
NC 005776	GAAATCTACATCCCTATTAAGCTTGAATTATGATAACATAAAAAATGCATCCTTATGGACATGCTAGGGTATT								6186
ORÖV-L_corrected	GAAATCTACATCCCTATTAAGCTTGAATTATGATAACATAAAAATGCATCCTTATGGACATGCTAGGGTATT								6149
	6150	6160	6170	6180	6190	6200	6210	6220	
NC 005776	TAAGTGAATGGCAGTGGAGATGACCAAAATGGCTTTCGAATTTCTATCGGACGAAATTTGGAGCAAGATGTAGT								6261
ORÖV-L_corrected	TAAGTGAATGGCAGTGAAGATGACCAAAATGGCTTTCGAATTTCTATCGGACGAAATTTGGAGCAAGATGTAGT								6224
	6230	6240	6250	6260	6270	6280	6290		
NC 005776	TGAAGAAATAGAATGCAACCCTATATTTCTATTAGTTATACAAAAAGAGGAGAATCCAATATGACTTATAAAAA								6336
ORÖV-L_corrected	TGAAGAAATAGAATGCAACCCTATATTTCTATTAGTTATACAAAAAGAGGAGAATCCAATATGACTTATAAAAA								6299
	6300	6310	6320	6330	6340	6350	6360	6370	
NC 005776	TGCTTCCACAAAGCCTTAATCTCAGAATGTGACAAAATTTGAAGAAGCATTGACTTCCTCGACATGGGATTTTG								6411
ORÖV-L_corrected	TGCTTCCACAAAGCCTTAATCTCAGAATGTGACAAAATTTGAAGAAGCATTGACTTCCTCGACATGGGATTTTG								6374
	6380	6390	6400	6410	6420	6430	6440		
NC 005776	CTCGAATGAAAATCTTAGTATTCTGGAGGAAATACATTGGATAATCAGTTATTTAAAAACAAATCAATGGTCTAC								6486
ORÖV-L_corrected	CTCGAATGAAAATCTTAGGATTCTGGAGGAAATACATTGGATAATCAGTTATTTGAAAACAAATCAATGGTCTAC								6449
	6450	6460	6470	6480	6490	6500	6510	6520	
NC 005776	GGAAC TAGACAATTGTATTACATGTGCATGTACAGGAATGGATATGATGCAGAATATCATAAATTTGATATACC								6561
ORÖV-L_corrected	GGAAC TAGAATAATTGTATTACATGTGCATGTACAGGAATGGATTATGATGCAGAATATCATAAATTTGATATACC								6524
	6530	6540	6550	6560	6570	6580	6590		
NC 005776	CTCTAAATTCCTCAAAGACCCAATAAACCGAACAATAAATGGACTGAAATTCATTGAATTTATATTTAATTTGA								6636
ORÖV-L_corrected	CTCTAAATTCCTCAAAGACCCAATAAACCGAACAATAAATGGACTGAAATTCATTGAATTTATATTTAATTTGA								6599
	6600	6610	6620	6630	6640	6650	6660	6670	
NC 005776	AGATTCCAAACAAAAATGAGCCATGGTCTAGTATGAAGTCACACTTCTGTTCAAAGCACACAGTGTAGCACT								6711
ORÖV-L_corrected	AGATTCCAAACAAAAATGAGCCATGGTCTAGTATGAAGTCACACTTCTGTTCAAAGCACACAGTGTAGCACT								6674
	6680	6690	6700	6710	6720	6730	6740		
NC 005776	AGAGTGTATGAAAAATGAGAAAAGATCATTGGCAGAATTTGTAGACAAAAGTAAGAAAAGTGGCAATCCAAATT								6786
ORÖV-L_corrected	AGAGTGTATGAAAAATGAGAAAAGATCATTGGCAGAATTTGTAGACAAGTAAGAAAAGTGGCAATCCAAATT								6749
	6750								
NC 005776	TGACTTCTAA								6796
ORÖV-L_corrected	TGACTTCTAA								6759

Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from NC\_005776.

**7.2 OROV-M-ORF**





### 7.3 OROV-S-ORF

	50      60      70      80      90      100      110	
NC_005777	ATGTCAGAGTTCATTTTCAACGATGTACCACAACGGACTACATCTACATTTGATCCGGAGGCAGCATATGTGGCA	119
OROV-S_consensus	ATGTCAGAGTTCATTTTCAACGATGTACCACAACGGACTACATCTACATTTGATCCGGAA[GCAGCATATGTGGCA	75
	120      130      140      150      160      170      180      190	
NC_005777	TTTGAAGCTAGATACGGACAAGTGCTCAATGCTGGTGTGTTAGAGTCTTCTTCCCAACCAAAAGAAGGCCAAA	194
OROV-S_consensus	TTTGAAGCTAGATACGGACAAGTGCTCAATGCTGGTGTGTTAGAGTCTTCTTCCCAACCAAAAGAAGGCCAAA	150
	200      210      220      230      240      250      260	
NC_005777	GATGCTTACGTAAGACATCGAGGCCATGGTTGACCTTACTTTTGGTGGGGTCCAATTTGCAATGGTTAATAAC	269
OROV-S_consensus	GATGCTTACGTAAGACATCGAGGCCATGGTTGACCTTACTTTTGGTGGGGTCCAATTTGCAATGGTTAATAAC	225
	270      280      290      300      310      320      330      340	
NC_005777	CATTTCCACAGTTCAGTTCGAATCCAGTGCCGGACAACGGTCTTACCTGCACCGTCTGTGAGGATACCTAGCG	344
OROV-S_consensus	CATTTCCACAGTTCCA[TCGAATCCAGTGCCGGACAACGGTCTTACC[GTGACCGTCTGTGAGGATACCTAGCG	300
	350      360      370      380      390      400      410	
NC_005777	CGCTGGGCCTTTACCCAGATGCGATCACCAATTAAGCAAGCTGAGTTCAGAGCCACTGTAGTAGTGCCTTTGGCT	419
OROV-S_consensus	CGCTGGGCCTTTAC[CGATGCGATCACCAATTAAGCAAGCTGAGTTCAGAGC[ACTGTAGTAGTGCCTTTGGCT	375
	420      430      440      450      460      470      480      490	
NC_005777	GAGGTAAGGGCTGTACTTGGAAATGATGGTGACGCAATGTACCTGGGGTTTGTCTGGTGGTCTGAGATGTTCCCTG	494
OROV-S_consensus	GAGGTAAG[GGCTGTACTTGGAAATGATGGTGA[GCAATGTACCTGGGGTTTGTCTGGTGGTCTGAGATGTTCCCTG	450
	500      510      520      530      540      550      560	
NC_005777	CAAACATTCACCTTTCTCCCTTTGGTGATTGAGATGCATAGGGTTCTCAAGGATGGCATGGATGTCAACTTTATG	569
OROV-S_consensus	CA[AC[TTTCACCTTTCTCCCTTTGGTGATTGAGATGCATAGGGTTCTCAAGGATGGCATGGATGTCAACTTTATG	525
	570      580      590      600      610      620      630      640	
NC_005777	AAGAAAGTCCTCCGGCAGAGGTATGGTCAAAAGACTGCCGAGCAATGGATGCGTGAAGAAATAGTTGCTGTAAGA	644
OROV-S_consensus	AAGAAAGTCCTCCGGCA[CGGTATGG[CAAAA[ACTGCCGAGCAATGGATGCGTGAAGAAATAGTTGCTGTAAGA	600
	650      660      670      680      690      700      710	
NC_005777	GCAGCTTTTGAAGCTGTAGGCACTCTGGCCTGGGCCAGAAGTGGATTCTCCCAGCAGCAAGAGACTTCTTGCGC	719
OROV-S_consensus	GCAGCTTTTGAAGCTGTAGGCACTCTGGCCTGGGCCAGAAGTGGATTCTCCCAGCAGCAAGAGACTTCTTGCGC	675
	720      730      740	
NC_005777	CAATTCGGAATTGACATATAG	740
OROV-S_consensus	CAATTCGGAATTGACATATAG	696

Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from NC\_005777.

## 8 Lebenslauf

Am 11.08.1976 wurde ich als erstes Kind meiner Eltern, des Architekten und Ägyptologen Prof. Dr. Jürgen Brinks und der Versicherungskauffrau Barbara Helene Brinks geb. Hinz in Göttingen geboren. Im Jahr 1978 zog meine Familie nach Tübingen, wo meine Geschwister, Tilman und Christina, geboren wurden. In Blomberg absolvierte ich die ersten beiden Grundschuljahre. Von 1985-1987 besuchte ich die „Höltyschule“ (Grundschule) und im Anschluss bis 1989 Jahre die Orientierungsstufe der „Lutherschule“ in Göttingen. Die 7. Klasse absolvierte ich auf dem altsprachlichen „Friedrichsgymnasium“ in Kassel, im Anschluss bis zur 13. Klasse besuchte ich die Europaschule „Theodor-Heuss-Gymnasium“ in Göttingen. Meine Schulausbildung schloss ich 1997 mit dem Abitur ab. Ich nahm 1998 ein Studium der Lateinischen Philologie und der Philosophie an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Nach einjähriger Unterbrechung, in der ich die häusliche Pflege eines Familienmitgliedes übernahm, begann ich dann ein Studium für Humanmedizin zum Wintersemester 2002/03 an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im März 2005 legte ich die Vorärztliche Prüfung ab. Während des klinischen Abschnittes arbeitete ich 2005 bis 2006 als studentische Aushilfe in der Pathologie der Universität Göttingen. Im März 2006 begann ich dann in der Abteilung Virologie im Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. F. Hufert die vorliegende experimentelle Dissertationsarbeit zum Thema „Die Interferon-antagonistische Aktivität des Nichtstrukturproteins NSs und die Klonierung der Gensegmente des Oropouche-Virus“.

Mein Studium habe ich 2010 mit dem Staatsexamen abgeschlossen. Im Januar 2011 begann ich meine fachärztliche Ausbildung in der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsmedizin in Göttingen.