

Aus der Abteilung Virologie
(Prof. Dr. med. F. Hufert)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Charakterisierung der Eigenschaften der nichtkodierenden
Enden der Genomsegmente des Oropouche-Virus und ihre
Bedeutung für die virale Transkription/Replikation sowie die
Interaktion mit dem Typ-I-Interferon-System**

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

vorgelegt von
Katharina Schnülle
aus
Mannheim-Neckarau

Göttingen 2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichtstatter:	Prof. Dr. med. F. Hufert
II. Berichtstatter/in:	Prof. Dr. rer. nat. L. Walter
III. Berichtstatter/in:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung:	06.08.2013

Veröffentlichungen:

Teile dieser Doktorarbeit wurden als Kongressbeitrag veröffentlicht:

Katharina Schnülle, Tom Essien, Katharina Keisers, Andrea Paluschkiwitz, Meik Dilcher,
Manfred Weidmann, Martin Spiegel and Frank T. Hufert

Dept. of Virology, University Medical Center Goettingen, Germany:

"The NSs protein of Oropouche virus has an interferon antagonistic function."

21st Annual Meeting of the Society for Virology, Freiburg, Germany, 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Oropouche-Virus	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klinik des Oropouche-Fiebers.....	2
1.1.3	Einordnung des Oropouche-Virus in die Familie der Bunyaviren	2
1.1.4	Virale Struktur, Aufbau des Genoms und Replikationsmechanismen	3
1.2	Das Interferon-System.....	6
1.2.1	Interferon-Subtypen.....	6
1.2.2	Induktion des Typ-I-Interferon-Systems	6
1.2.3	Wirkmechanismus von Interferon- α/β	8
1.2.4	IFN-Antagonismus der Bunyaviren	9
1.3	Zielsetzung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Standardmaterialien	11
2.2	Methoden.....	12
2.2.1	Kultivieren von Zellen.....	12
2.2.2	Zellzahlbestimmung	14
2.2.3	Zellaussaat	15
2.2.4	Transformation von Bakterienzellen	16
2.2.5	Anzucht von <i>E.coli</i> -Kulturen.....	17
2.2.6	TA-Klonierung	18
2.2.7	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden.....	20
2.2.8	Ligation von klebrigen und/oder glatten Enden	20
2.2.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	21
2.2.10	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	25
2.2.11	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.2.12	Restriktionsverdau	27
2.2.13	Transfektion von Zellen.....	29
2.2.14	Isolierung von Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen und Zellkulturüberständen	32
2.2.15	DNase-Behandlung.....	33
2.2.16	Konzentrierung und Aufreinigung von RNA	34
2.2.17	Spektrophotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA/DNA	34

2.2.18	Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	35
2.2.19	Plasmidpräparation (Minipräparation)	36
2.2.20	Plasmidpräparation (Midipräparation)	37
2.2.21	RLM-RACE-PCR zur Analyse der nichtkodierenden Enden der OROV- Genomsegmente	38
2.2.21.1	Adapter-Ligation an das 3'-Ende von OROV-RNA	39
2.2.21.2	Adapter-Ligation an das 5'-Ende von OROV-RNA	40
2.2.22	cDNA-Synthese	42
2.2.23	Immunfluoreszenzanalysen in Vero-Zellen.....	43
2.2.24	Bestimmung des Virustiters (TCID ₅₀) in mit IFN- α vorbehandelten, OROV- infizierten Zellen.....	46
2.2.25	Sequenzierung	49
2.2.26	Das Minireplikon-System.....	51
2.2.27	Dual-Luciferase-Reporter-Assay und Minireplikon-System- Kinetikmessungen	53
2.2.28	Statistik	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Interferon-Antagonismus des Oropouche-Virus	57
3.1.1	Struktureller Aufbau des 5'-Endes der Genomsegmente des Oropouche- Virus	57
3.1.2	IFN-Sensitivität des OROV.....	59
3.1.3	Potenzielle Interaktion von Komponenten des RNA-Polymerase-II- Transkriptionskomplexes mit dem OROV-NSs.....	61
3.2	Oropouche-Virus-Minireplikon-System.....	65
3.2.1	Oropouche-Virus-Polymerase	65
3.2.1.1	Überprüfung der OROV-Polymerase.....	65
3.2.1.2	Korrektur des OROV-Polymerase-Expressionsplasmids.....	67
3.2.1.3	OROV-Minireplikon-System unter Verwendung des korrigierten OROV-Polymerase-Expressionsplasmids pTM1-OROV-L_Neu.....	73
3.2.2	Nichtkodierende Enden	75
3.2.2.1	Überprüfung der nichtkodierenden Enden der OROV- Genomsegmente	75
3.2.2.1.1	3'-Ende der OROV-Genomsegmente	76
3.2.2.1.2	5'-Ende der OROV-Genomsegmente	78
3.2.2.2	Korrektur der nichtkodierenden Enden im OROV-Minigenom- Plasmid.....	82
3.2.2.3	Funktionelle Überprüfung des korrigierten Minigenom-Plasmids im OROV-Minireplikon-System.....	85
3.2.2.4	Mutationsanalyse.....	86

4	Diskussion	89
4.1	Die drei viralen OROV-Genom-Segmente selbst stellen starke IFN-Induktoren dar	89
4.2	Das OROV-NSs-Protein hat als spezifisches Ziel die Hemmung der Interferon-Expression	90
4.3	Das OROV-Minireplikon-System	93
4.3.1	Sequenzanalyse der viralen Polymerase.....	93
4.3.2	Neben der Nukleotidsequenz ist auch die abgeleitete Sekundärstruktur der nichtkodierenden Enden elementar für die Initiation der viralen Polymerase	95
4.3.3	Etablierung eines OROV-Minireplikon-Systems.....	98
5	Zusammenfassung	101
6	Anhang: Abbildung 32	102
7	Literaturverzeichnis	110

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Arbo-	<i>arthropode born</i>
AS	Aminosäuren
ATF-2	<i>activating transcription factor-2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
BUNV	Bunyamwera-Virus
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
Cdk 8	<i>cyclin-dependent kinase 8</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CPE	Zytopathischer Effekt
Cy3	Cyanin 3
dd/dNTP	Di-/Desoxynukleosidtriphosphate
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ds	<i>double stranded</i>
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
eIF	<i>eukaryotic initiation factor</i>

et al.	et alii
FF-Luc	Firefly-Luciferase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälber-Serum
for.	<i>forward</i>
g	Gramm
Gal	Galaktosidase
h	Stunde
HD	<i>high definition</i>
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
I κ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
IRF-3	Interferon-regulierender Faktor 3
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
JAK-1	Janus-Kinase 1
kb	Kilobase
L-	<i>large</i>
l	Liter
LACV	La-Crosse-Virus
LB	<i>lysogeny broth</i>
log.	Logarithmus
M	Molar
M-	<i>medium</i>
m	Milli-/Meter
Mda-5	<i>melanoma differentiation-associated gene-5</i>
MED	Mediator-Untereinheit
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCE	<i>non-coding ends</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>

N-Protein	Nukleoprotein
NS-Protein	Nichtstrukturprotein
OAS	2'5'Oligoadenylat-Synthetase
ORF	<i>open reading frame</i>
OROV	Oropouche-Virus
p	Pico-
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKR	Proteinkinase R
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Ren-Luc	Renilla-Luciferase
rev.	<i>reverse</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene-I</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAP II	RNA-Polymerase II
RNP	Ribonukleoprotein
RVFV	Rift-Valley-Fever-Virus
S.	Seite
S-	<i>small</i>
SAP	<i>Sin3A-associated protein</i>
sog.	sogenannt
ss	<i>single stranded</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>Tobacco Acid Pyrophosphatase</i>
Taq	Thermus aquaticus
TCID ₅₀	<i>tissue-culture infectious dose 50 %</i>

TF	Transkriptionsfaktor
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TRAP 25	<i>thrombospondin-related anonymous protein 25</i>
Tyk 2	Tyrosinkinase 2
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VLPs	<i>virus-like particles</i>
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Oropouche-Virus

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 1955 wurde in Trinidad aus dem Blut eines an hohem Fieber leidenden Waldarbeiters das damals noch unbekanntes Oropouche-Virus erstmals isoliert und beschrieben (Anderson et al. 1961). Im Jahr 1961 führte dieses Virus zu einem ersten Ausbruch in Belém (Brasilien), bei dem ungefähr 11000 Menschen an dem sog. Oropouche-Fieber erkrankten (Pinheiro et al. 1962). Seitdem wurden mehr als 30 weitere Ausbrüche des Oropouche-Fiebers innerhalb eines immer größeren Verbreitungsradius (v.a. in Trinidad, Panama, Brasilien und Peru, siehe Abbildung 1) mit über einer halben Million infizierter Menschen registriert, was zweifelsohne das epidemische Potenzial dieses Virus verdeutlicht. Das Oropouche-Fieber stellt mittlerweile nach dem Dengue-Fieber die häufigste Arbovirus-erkrankung Brasiliens dar (Mourao et al. 2009). Aus diesem Verhalten resultiert schließlich die Einstufung des OROV als eine sog. *emerging infectious disease*, die mit einer erheblichen Gefährdung der Gesundheit in den tropischen und subtropischen Gebieten sowohl Zentral- als auch Südamerikas einhergeht (Azevedo et al. 2007, Mourao et al. 2009).

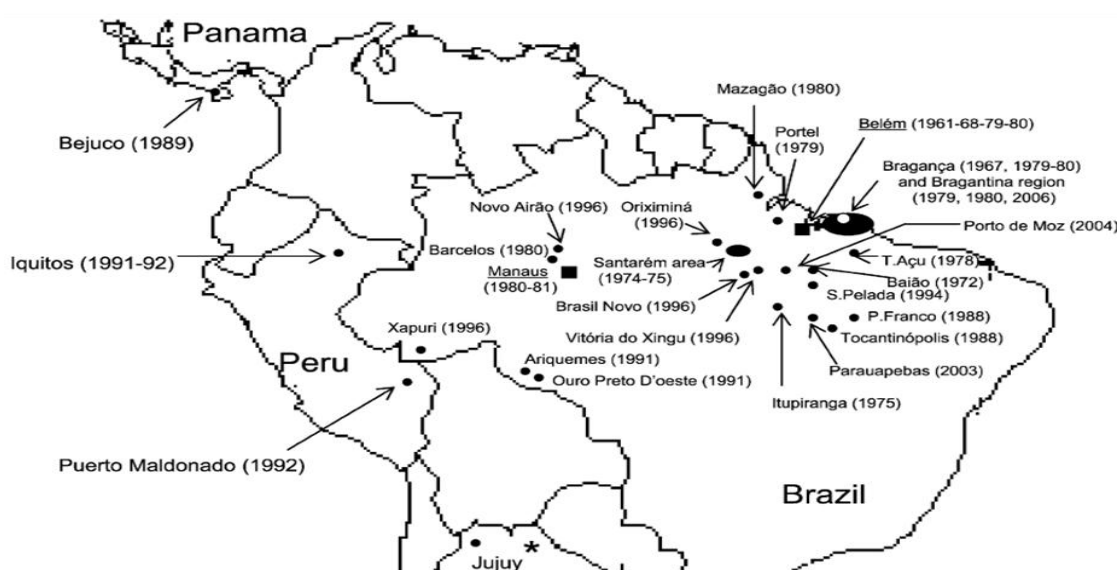


Abbildung 1: Topographische Übersicht über die urbanen Ausbrüche des Oropouche-Fiebers seit 1961: Ausgehend von dem ersten großen Oropouche-Fieber-Ausbruch im brasilianischen Belém 1961 zeigt

sich ein mit den Jahrzehnten zunehmendes Verbreitungsgebiet des Oropouche-Fiebers in die angrenzenden Gebiete Perus, Panama und unlängst sogar bis hin in die nördlichen Gebiete Argentiniens. Karte aus Vasconcelos et al. (2009, S. 130) mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

1.1.2 Klinik des Oropouche-Fiebers

Beim Oropouche-Fieber handelt es sich um eine selten lebensbedrohlich verlaufende, meist selbstlimitierende Infektionskrankheit, die gleichermaßen alle Altersgruppen und Geschlechter betreffen kann. In urbanen Gegenden Zentral- und Südamerikas wird die Erkrankung hauptsächlich durch einen Stich der Gnitze *Culicoides paraensis* auf den Menschen übertragen (Figueiredo 2007). Das Oropouche-Fieber macht sich unter anderen besonders durch grippeähnliche Symptome, wie das namensgebende plötzliche Auftreten von Fieber, das nahezu bei 100 % der Patienten zu verzeichnen ist, Kopfschmerzen (99,1 %), Schüttelfrost (59,3 %), Myalgien (46,9 %), Abgeschlagenheit, Photophobie und Magen-Darm-Beschwerden bemerkbar und kann ungefähr eine Woche andauern und ausheilen oder zu einem erneuten Schub nach zwei bis drei Wochen führen (Vasconcelos et al. 2009).

Vereinzelt wurden auch Fälle aseptischer Meningoenzephalitiden in Zusammenhang mit einer Oropouche-Virus-Infektion beschrieben (Pinheiro et al. 1982).

Derzeit steht trotz der erheblichen Relevanz dieser Erkrankung in Zentral- und Südamerika weder eine spezifische antivirale Therapie, noch ein möglicher Impfstoff zur Primärprävention des Oropouche-Fiebers zur Verfügung (Livonesi et al. 2007).

1.1.3 Einordnung des Oropouche-Virus in die Familie der Bunyaviren

Das Oropouche-Virus gehört zur Familie der Bunyaviren, Genus Orthobunyavirus. Diese Familie umfasst über 300 verschiedene Viren, die zum Großteil zu den sog. Arboviren (Akronym für *arthropod-borne viruses*) gehören. Basierend auf serologischen und biochemischen Charakteristika lassen sich die Bunyaviren in fünf Genera und innerhalb dieser nochmals in verschiedene Serogruppen unterteilen (Elliott 1997). In der folgenden Tabelle 1.1 (siehe S. 3) sind die fünf Genera aufgelistet, wobei beispielhaft nur die Serogruppen und jeweils deren zugehörige Vertreter-Viren namentlich aufgeführt werden, die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind.

Tabelle 1.1: Übersicht über die Familie der Bunyaviren: Modifiziert nach Knipe et al. (2006, S. 1743-1745)

Genus	Serogruppe	Für diese Arbeit relevante Vertreter	Vorkommen
Orthobunyavirus	Bunyamwera	Bunyamwera-Virus	Afrika
	California	La-Crosse-Virus	Nordamerika
		Snowshoe hare-Virus	Nordamerika
	Simbu	Oropouche-Virus	Südamerika
Phlebovirus	Sandfliegenfieber	Rift-Valley-Fever-Virus	Afrika
Nairovirus	<i>im Rahmen dieser Arbeit keine Vertreter genutzt</i>		
Hantavirus			
Tospovirus			

1.1.4 Virale Struktur, Aufbau des Genoms und Replikationsmechanismen

Die sphärischen Viruspartikel des Oropouche-Virus weisen eine Größe von ungefähr 100 nm im Durchmesser auf, welche jeweils von einer Lipiddoppelschicht umhüllt werden. In diese Lipidmembran sind dicht gepackt virale Glykoproteine (Gn und Gc genannt) eingelagert, die primär der Virusadsorption an die Wirtszelle dienen (Elliott 1997). Wie alle Orthobunyaviren besitzt auch das Oropouche-Virus ein einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Polarität, das in drei Segmente (L-, M- und S-Segment) untergliedert ist. Jedes Segment liegt hierbei als Ribonukleoprotein (RNP) vor, d.h. die einzelsträngige RNA wird komplett durch das Nukleoprotein (N) umhüllt. Zusätzlich sind mit dem RNP-Komplex einige Kopien des viralen L-Proteins assoziiert. Beim L-Protein handelt es sich um eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die für Transkription und Replikation der negativ-strängigen Virus-RNA essentiell ist (Elliott und Weber 2009, siehe Abbildung 2, S. 4).

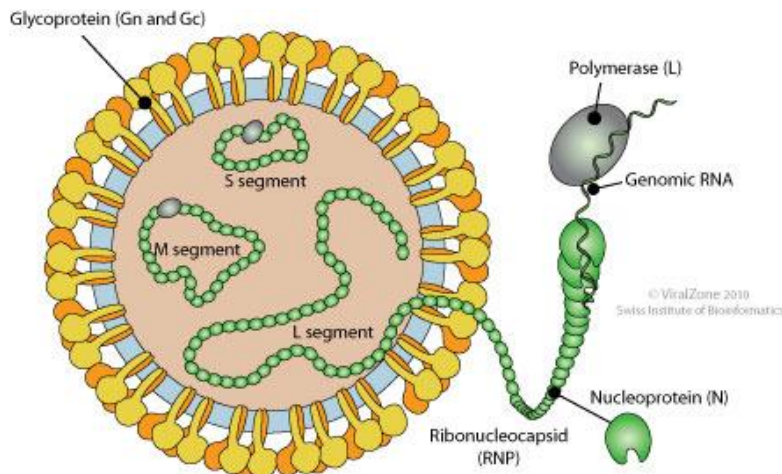


Abbildung 2: Schema zum Aufbau der Orthobunyaviren: Orthobunyaviren sind umhüllte Viren mit einem segmentierten RNA-Genom negativer Polarität, deren einzelsträngiges RNA-Genom in drei, der Größe nach benannte Segmente unterteilt ist. Jedes dieser Segmente liegt als Ribonucleoprotein (RNP) vor, an das einige Kopien der viralen Polymerase gebunden sind.

©Viral Zone 2010 Swiss Institute of Bioinformatics

Das größte der drei Genomsegmente des Oropouche-Virus, das auch als L-Segment (*large*) bezeichnet wird, besteht aus 6852 Nukleotiden und kodiert für die virale Polymerase. Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die laut Literatur aus 2250 Aminosäuren besteht (Aquino et al. 2003). Auf der 4396 Nukleotide langen M-RNA (*medium*) liegt die Information von insgesamt drei viralen Proteinen; zum einen für die beiden Hüllproteine Gc und Gn, zum anderen für das Nichtstrukturprotein NSm mit derzeit weitestgehend unbekannter Funktion. Alle drei entstehen aus einem gemeinsamen Vorläuferpolypeptid, das kotranslational durch die Wirtszelle prozessiert wird, sodass anschließend die beiden Glykoproteine Gc (290 AS) und Gn (939 AS) sowie das Nichtstrukturprotein NSm (175 AS) entstehen (Wang et al. 2001). Das kleinste Genomsegment, das S-Segment (*small*), besteht aus 754 Nukleotiden und kodiert für zwei weitere Proteine; einerseits für das Nucleoprotein N (231 AS) und andererseits für das Interferon-antagonistische Nichtstrukturprotein NSs (91 AS, Saeed et al. 2000). Anders als die Proteine des M-Segments entstehen diese nicht aus einem gemeinsamen Vorläuferpolypeptid, sondern sind in zwei überlappenden, offenen Leserahmen (*open reading frames (ORF)*) kodiert, d.h. innerhalb der S-RNA gibt es zwei verschiedene Startcodons, die durch alternative Initiation der Translation zur Expression von zwei unterschiedlichen Proteinen führen (Elliott 1990, siehe Abbildung 3, S. 5).

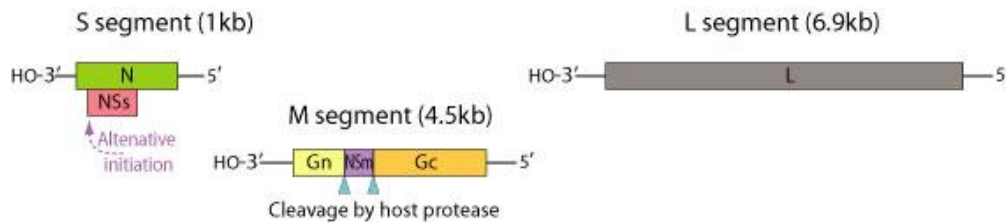


Abbildung 3: Aufbau des RNA-Genoms der Orthobunyaviren: Das virale RNA-Genom kodiert insgesamt für sechs Struktur- und Nichtstrukturproteine auf drei unterschiedlichen Virus-Segmenten. Während das L-Segment lediglich für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase kodiert, kodiert das M-Segment die beiden Oberflächenmoleküle Gn und Gc sowie das Nichtstrukturprotein NSm. Diese drei Proteine entstehen als ein gemeinsames Vorläuferprotein, aus welchem durch intrazelluläre Prozessierung die drei Einzelkomponenten entstehen. Im Gegensatz dazu werden die beiden Proteine des S-Segments, das Nukleoprotein (N) und das Nichtstrukturprotein (NSs) in zwei unterschiedlichen, offenen Leserahmen kodiert und durch alternative Translationsinitiation gebildet.

©Viral Zone 2010 Swiss Institute of Bioinformatics

Jedes der drei Genomsegmente besitzt zusätzlich sowohl an seinem 3'- als auch an seinem 5'-Ende eine sog. untranslatierte Region (UTR). Dabei handelt es sich um eine partiell hochkonservierte, nichtkodierende, teilweise komplementäre Nukleotidsequenz, die als Promotor- und Initiationsregion für die virale RNA-Polymerase dient und somit essentiell für die Initiation der Transkription/Replikation ist (Knipe et al. 2006).

Diese nichtkodierenden Enden zeigen in Abhängigkeit des vorliegenden Bunyavirus und innerhalb der jeweiligen RNA-Segmente eine unterschiedliche Struktur im Bezug auf die Nukleotidsequenz, Länge und Komplementarität. Allen Vertretern der Familie der Bunyaviren ist jedoch gemeinsam, dass eine Genus-spezifische Anzahl an Basen hochkonserviert, d.h. absolut identisch, innerhalb des nichtkodierenden 3'- bzw. des 5'-Endes der drei Genomsegmente vorliegt (sog. hochkonservierter Bereich, Elliott et al. 1991). Im Falle des Genus Orthobunyavirus, zu dem auch das Oropouche-Virus gehört, handelt es sich bei dem hochkonservierten Bereich um die ersten 11 Basen der jeweiligen nichtkodierenden Enden, die innerhalb der drei viralen Genomsegmente eine absolut identische Nukleotidsequenz aufweisen.

Die bereits beschriebene partielle Komplementarität der Sequenzen des nichtkodierenden 3'- bzw. 5'-Endes führt innerhalb eines RNA-Segments über die Bildung von Wasserstoffbrücken zur Ausbildung einer sog. Pfannenstielkonformation, woraus sich letztendlich die charakteristische zirkuläre Konformation der RNPs erklären lässt (Kohl et al. 2004).

1.2 Das Interferon-System

Das Interferonsystem als Teil der angeborenen Immunität stellt noch vor der adaptiven Immunantwort ein erstes, höchst effektives Abwehrsystem bei höheren Organismen gegenüber Virusinfektionen dar. Die Wichtigkeit dieses antiviralen Systems für den menschlichen Organismus lässt sich anhand von Beobachtungen an Menschen mit angeborenen Defekten im Interferonsystem zeigen, da bei den Betroffenen eine extreme Anfälligkeit gegenüber viralen Infektionen besteht, die oftmals bereits im frühkindlichen Alter zum Tode führt (Dupuis et al. 2003, Ank und Paludan 2009).

1.2.1 Interferon-Subtypen

Interferone sind definiert als Zytokinmoleküle, deren Hauptaufgabe die Kontrolle bzw. Elimination von Virusinfektionen darstellt. Abhängig von der jeweiligen Aminosäuresequenz und Rezeptorspezifität lassen sich die Interferone in drei verschiedene Subtypen unterteilen:

Als Typ-I-Interferone bezeichnet man verschiedene Interferon- α -Typen, die auf insgesamt 13 IFN- α -Genen kodiert werden, IFN- β , das auf einem IFN- β -Gen kodiert wird (Anzahl der Gene jeweils bezogen auf den menschlichen Organismus), sowie die Interferone IFN- ω , IFN- ϵ und IFN- κ . Allerdings werden als Antwort auf eine Virusinfektion vor allem die Interferone- α/β direkt induziert und scheinen folglich eine oder sogar die entscheidende Rolle in der direkten Virusabwehr des infizierten Organismus zu spielen (Randall und Goodbourn 2008). Die Typ-III-Interferone umfassen insgesamt drei verschiedene Interferontypen (IFN- λ_1 , - λ_2 , und - λ_3), denen ähnliche Aufgaben und Signaltransduktionswege wie den Typ-I-Interferonen im Bezug auf die antivirale Immunantwort zugeschrieben werden, die jedoch einen eigenen Rezeptor besitzen (Ank und Paludan 2009). Aus Gründen der Vollständigkeit sollte an dieser Stelle noch das Interferon Typ II, auch IFN- γ genannt, aufgeführt werden, das von aktivierten Immunzellen sezerniert wird und für die adaptive, zelluläre Immunabwehr essentiell ist (Schroder et al. 2004).

1.2.2 Induktion des Typ-I-Interferon-Systems

Über verschiedene sog. *pattern recognition receptors* (PRR) kann die durch einen Virus infizierte Zelle sog. *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen und mit Hilfe der Produktion von IFN- α/β einen antiviralen Status erzeugen. Die hierbei aktivierten

Signaltransduktionswege hängen zum einen von den Eigenschaften des Virus selbst und zum anderen von der molekularen Ausstattung der jeweiligen Zelle ab (Randall und Goodbourn 2008). Während die Membran-gebundenen *Toll-like-receptors* (TLRs) zelltypspezifisch vorkommen, sind die zytoplasmatisch lokalisierten *RIG-like-receptors* (RLRs) in jedem Zelltyp vorhanden.

Bei den beiden Vertretern dieser zweitgenannten Rezeptorgruppe, RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*) und MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene-5*), handelt es sich um zytoplasmatische RNA-Helikasen, die intrazelluläre virale RNA im Zytoplasma erkennen (Nakhaei et al. 2009). Trotz der engen Verwandtschaft dieser Proteine lassen sich den beiden Molekülen spezifische Erkennungsmoleküle zuordnen. Während RIG-I virale ssRNA vorwiegend anhand eines Triphosphats am 5'-Ende oder kurze dsRNA erkennt (Kato et al. 2008), stellt das Fehlen einer 2'-O-Methylierung an den ersten beiden Riboseresten einer RNA das charakteristische Erkennungsmerkmal und folglich den potenten Induktor für den MDA-5-abhängigen Signalweg dar (Daffis et al. 2010, Zust et al. 2011).

Ziel der durch aktivierte RLRs initiierten Signalkaskade stellt die Aktivierung und die damit verbundene Translokation der Transkriptionsfaktoren IRF-3 (*IFN regulatory factor-3*) und NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) dar (Randall und Goodbourn 2008). Als Folge der Signaltransduktion wird der Transkriptionsfaktor IRF-3 an spezifischen Serinresten phosphoryliert, was innerhalb des Moleküls zu einer Konformationsänderung und Dimerisierung führt und somit die Translokation in den Zellkern ermöglicht (Hiscott et al. 1999). Nach Assoziation mit dem nukleären Faktor CBP/p300 binden die IRF-3-Dimere an den IFN-α/β-Promotor. Im Falle des Moleküls NFκB resultiert aus der intrazellulären Signaltransduktion die Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Degradation des Inhibitormoleküls IκB, das NFκB im dephosphorylierten Zustand normalerweise im Zytoplasma hält und dessen Translokation verhindert (Hayden und Ghosh 2008). Zusätzlich zu diesen beiden Faktoren ist zur Initiation der IFN-Transkription noch ein weiteres Protein nötig; das Heterodimer c-jun/ATF-2 (AP-1). Während ATF-2 konstitutiv exprimiert wird, handelt es sich bei c-jun um ein nach Virusinfektion induziertes Protein. Nach Phosphorylierung translozieren beide ebenfalls in den Zellkern, können aber nur als Heterodimer an die Promotorregion der IFN-α/β-Gene binden (Malmgaard 2004). IRF-3, NFκB und c-jun/ATF-2 bilden am IFN-α/β-

Promotor das sog. Enhanceasom, das die Anlagerung der basalen Transkriptionsmaschinerie und der zellulären RNA-Polymerase II an die Promotorregion vermittelt und somit Transkription und Produktion von IFN- α/β aktiviert (Randall und Goodbourn 2008, siehe Abbildung 4, linke Seite, S. 8).

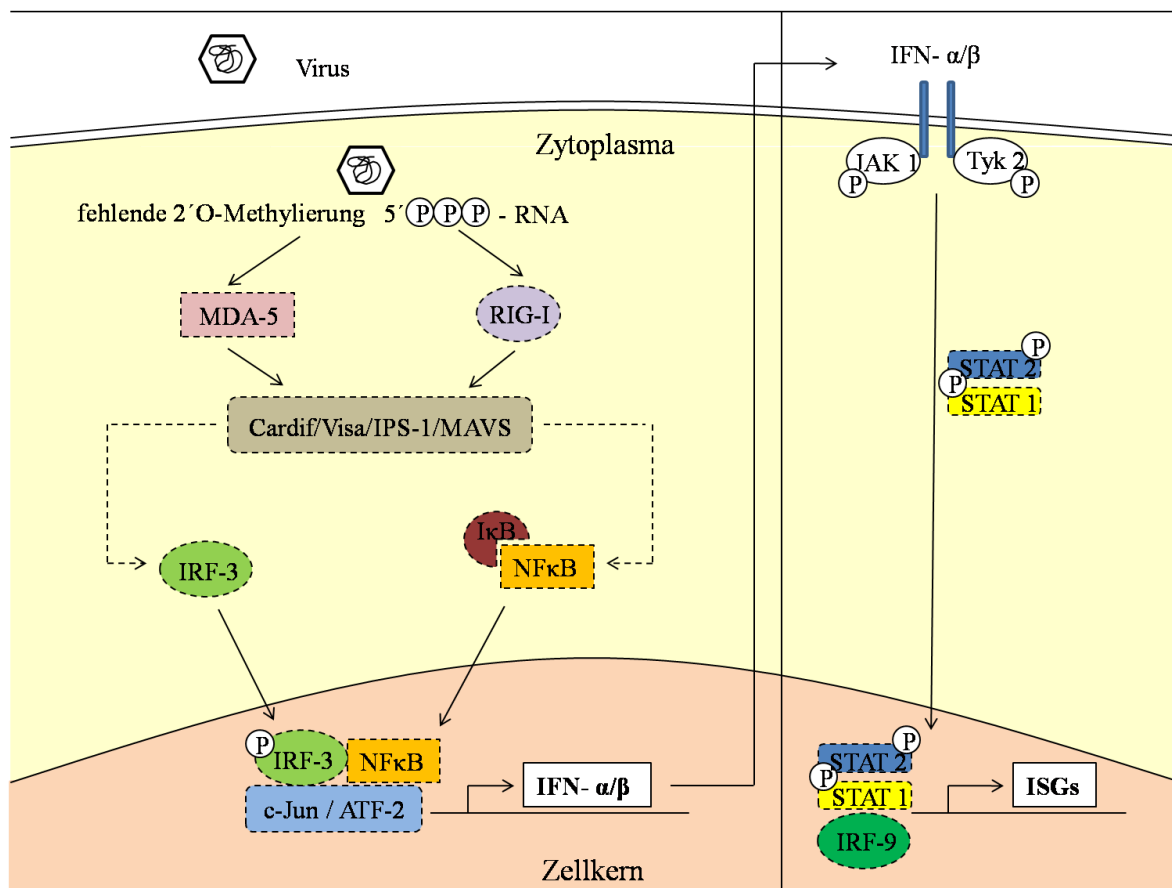


Abbildung 4: Intrazellulärer Induktionsweg des Interferon-Systems: Linke Seite: Abhängig von spezifischen viralen Strukturmerkmalen werden unterschiedliche Moleküle der intrazellulären RIG-I-Rezeptorfamilie aktiviert, welche über mehrere Signaltransduktionsmoleküle die Translokation und Bildung des sog. Enhanceasoms (IRF-3, NFκB und c-jun/ATF-2) vermitteln. Das Enhanceasom bindet an die IFN- α/β -Promotorregion und initiiert dort die Transkription von IFN- α/β . **Rechte Seite:** Das gebildete IFN- α/β induziert in den infizierten Zellen über eine JAK-1-Tyk-2-STAT-1/2-Signalkaskade durch die Expression Interferon-stimulierter Gene einen antiviralen Status. Modifiziert nach Sun et al. (2010, S. 436)

1.2.3 Wirkmechanismus von Interferon- α/β

Interferon- α/β induziert über einen heterodimeren Transmembranrezeptor (IFNAR), der den JAK/STAT-Signalweg aktiviert, die Transkription der Interferon-stimulierten Gene (ISGs, Stark et al. 1998). Dabei handelt es sich um eine Gruppe von mehr als 300 Genen, die direkt durch Interferon induziert werden und deren Expression zur Etablierung eines antiviralen Status in den Zellen führt (Liu et al. 2011, siehe Abbildung 4, rechte Seite, S. 8). Die exprimierten Gene weisen keinerlei Virusspezifität auf und auch die Etablierung

des antiviralen Status kann nicht einem singulären Gen zugeordnet werden. Einige dieser Genprodukte, die insbesondere in der antiviralen Immunantwort eine Rolle spielen, sind inzwischen gut charakterisiert worden, wie z.B. die Proteinkinase R (PKR, Clemens 1997) oder die 2'5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS, Rebouillat und Hovanessian 1999), deren Funktionsweise an dieser Stelle beispielhaft kurz erläutert werden soll.

Bei der PKR handelt es sich um eine dsRNA-abhängige eIF2 α -spezifische Kinase, die durch Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 α die zelluläre und virale Proteinsynthese inhibiert. Darüber hinaus werden diesem Signalweg direkte Fähigkeiten zur Induktion von Apoptose in infizierten Zellen zugeschrieben (Garcia et al. 2006).

Ähnlich der PKR nutzt auch die OAS dsRNA als Kofaktor zur Oligomerisierung von ATP-Molekülen, die ihrerseits die RNase L aktivieren. Jenes Enzym spaltet dann zelluläre und virale RNA, was zum einen zur Hemmung der Expression viraler Genprodukte und zum anderen über die intrazellulären Rezeptoren RIG-I und MDA-5 zur Induktion der Interferonproduktion führt (Sadler und Williams 2008).

1.2.4 IFN-Antagonismus der Bunyaviren

Zahlreiche Virusspezies haben als Pathogenitätsprinzip diverse Mechanismen entwickelt, um das potente, antivirale Typ-I-IFN-System zu unterlaufen (Garcia-Sastre 2001, McInerney und Karlsson Hedestam 2009). So kodieren auch viele Mitglieder der Familie der Bunyaviridae auf dem S-Segment ihres Genoms für ein Nichtstrukturprotein (NSs-Protein), das als IFN-Antagonist wirkt (Bouloy et al. 2001, Weber et al. 2002).

Die bisher charakterisierten NSs-Proteine stellen allesamt Transkriptioninhibitoren dar, die nicht nur die Typ-I-IFN-Expression hemmen, sondern als generelle Inhibitoren der RNA-Polymerase-II-vermittelten Transkription wirken (Thomas et al. 2004, Elliott und Weber 2009). Interessanterweise ist jedoch der Mechanismus der Transkriptionshemmung für jedes NSs-Protein individuell unterschiedlich:

Während beispielsweise das Bunyamwera-Virus (BUNV), als ein Vertreter der Orthobunyaviren direkt auf Transkriptionsebene durch Interaktion mit der MED-8-Untereinheit des Mediatorkomplexes der IFN-Transkription entgegenwirkt (Leonard et al. 2006, van Knippenberg et al. 2010), entfaltet das NSs-Protein des RVFV (Genus: Phlebovirus) ebenfalls auf Transkriptionsebene durch Interaktion mit dem basalen Transkriptionsfaktor TFIID seine interferonantagonistische Wirkung (Billecocq et al. 2004, Le May et al. 2004). Zudem interagiert das RVFV-NSs mit dem zellulären Protein SAP30

und inhibiert über Hemmung des Transkriptionsfaktors YY1 direkt die IFN- β -Promotor-spezifische Transkription (Le May et al. 2008). Auch das NSs-Protein des La-Crosse-Virus, das einen weiteren Vertreter des Genus Orthobunyavirus darstellt, entfaltet seine interferonantagonistische Wirkung durch eine globale Suppression der RNA-Polymerase-II-vermittelten Transkription, jedoch ist die Zielstruktur derzeit noch unbekannt, scheint aber innerhalb der Signaltransduktionskaskade unterhalb des IRF-3 zu liegen (Verbruggen et al. 2011). Im Falle des Oropouche-Virus ist der zelluläre Interaktionspartner des OROV-NSs-Proteins noch weitestgehend unbekannt (Elliott und Weber 2009).

1.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit stellt zum einen die Charakterisierung des OROV-NSs-Proteins insbesondere im Bezug auf sein interferonantagonistisches Potenzial dar. Im Rahmen dessen soll sowohl die Notwendigkeit der Kodierung eines Interferonantagonisten innerhalb des OROV-Genoms untersucht, als auch potentielle, spezifische Interaktionspartner des OROV-NSs-Proteins im Bezug auf die Polymerase-II-vermittelte Transkriptionskaskade identifiziert werden. Darüber hinaus gilt es die IFN-Sensitivität des OROV als Grund für die bereits belegte NSs-vermittelte globale Suppression Polymerase-II-vermittelter Transkriptionsvorgänge zu verifizieren.

Zum anderen soll in einem zweiten Teil der Arbeit ein sog. Minireplikon-System für das Oropouche-Virus etabliert werden. Basierend auf den Ergebnissen einer vorangegangenen Arbeit sollen insbesondere die Sequenzen der viralen Polymerase und der nichtkodierenden 3'- bzw. 5'-Enden der drei OROV-Genomsegmente erneut sequenziert und unter Zuhilfenahme einer zusätzlichen Sequenzierungsmethode auf Korrektheit bzw. potentielle Unstimmigkeiten im Bezug auf die publizierte Referenzsequenz überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Standardmaterialien

In der nachfolgenden Tabelle werden die Materialien aufgelistet, die in der Mehrzahl der Versuche zum Einsatz kamen (sog. Standardmaterialien). Die weiteren, methodenspezifischen Materialien sind ihrerseits nochmals einzeln vor der zugehörigen Methode tabellarisch aufgeführt.

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hannover, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank (5°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Pipetten	Gilson International, Limburg, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland / Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland
Vortexer	Grant Instruments Ltd, Cambridge, Großbritannien
Zentrifuge (5418; 5415 C)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Pipettenspitzen mit/ohne Filter (0,1-10 µl, 1-20 µl, 1-100 µl, 1-200 µl, 101-1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
<i>Safe-Lock</i> -Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Destilliertes Wasser (DNase/RNase-frei)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivieren von Zellen

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Gewebekulturflaschen mit Filter (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten mit Spitzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Medien	Hersteller und Zusammensetzung
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), 500 ml	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
DMEM (gebrauchsfertig), 500 ml	500 ml DMEM, 50 ml FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 526,6 mg/l L-Glutamin
Dulbecco´s Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS (10x)), 500 ml	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland 2 g KCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , 80 g NaCl, 5,76 g N ₂ HPO ₄ in 1 l H ₂ O
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
G 418 (50 mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Enzyme	Bezugsquelle / Hersteller
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

An dieser Stelle sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien zusammenfassend mit jeweiliger Ursprungsquelle, entsprechendem Nährmedium sowie deren Bezugsquelle tabellarisch aufgelistet:

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Nährmedium	Bezugsquelle
BHK	Babyhamster-Nierenzellen	DMEM (gebrauchsfertig)	Institut für Virologie, Göttingen, Deutschland

BSR-T7	Babyhamster-Nierenzellen mit stabiler Expression der T7 RNA-Polymerase	DMEM (gebrauchsfertig) plus G 418	Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland
IFNAR-/-	Murine Zellen, denen beide IFNAR-Gene fehlen und die folglich keine IFN- α/β -Rezeptoren exprimieren	DMEM (gebrauchsfertig)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jovan Pavlovic, Institute of Medical Virology, Zürich, Schweiz
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM (gebrauchsfertig)	Microbix Biosystems Inc., Mississauga, Kanada
Vero E6	Nierenzellen von grünen Meerkatzen (African Green Monkey)	DMEM (gebrauchsfertig)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

Durchführung:

Die oben genannten Zelllinien werden jeweils in einer 75-cm²-Zellkulturflasche in 12 ml gebrauchsfertigem DMEM im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei den Zelllinien handelt es sich um adhärent-wachsende Zellen, d.h. sie haften am Boden des Zellkulturgefäßes an. Aus diesem Grund müssen jene Zelllinien bei konfluentem Zellrasen zweimal pro Woche passagiert werden, um zum einen gleichbleibendes Wachstum zu gewährleisten und zum anderen Zelluntergang zu vermeiden.

Vor Beginn des eigentlichen Passagiervorgangs, muss das Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) noch mit 50 ml FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 526,6 mg/l L-Glutamin versetzt werden („DMEM gebrauchsfertig“). Zudem müssen alle verwendeten Substanzen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Bei konfluentem Zellrasen entnimmt man im ersten Schritt das gesamte, alte Nährmedium und die Zellen werden nachfolgend mit 5 ml PBS gewaschen. Der Waschvorgang dient dazu, die Zellen möglichst effizient von Rückständen des Mediums zu befreien, da jenes FKS enthält und dieses wiederum das im nächsten Schritt verwendete Trypsin inaktivieren würde. Zum Ablösen der adhärent-wachsenden Zellen vom Boden der Zellkulturflasche werden sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 ml Trypsin inkubiert und durch

leichtes seitliches Anschlagen der Zellkulturflasche vom Flaschenboden abgelöst. Speziell bei Vero-E6-Zellen ist zur Ablösung der Zellen eine zusätzliche Inkubation mit dem Trypsin bei 37 °C erforderlich. Durch die anschließende Zugabe von 4 ml gebrauchsfertigem DMEM wird das Trypsin inaktiviert. Von der insgesamt 5 ml umfassenden Suspension, die nun als Trypsinat bezeichnet wird, werden 0,5 ml in die Gewebekulturflasche zurückpipettiert; der Rest wird verworfen. Somit wird die Zellzahl im Verhältnis 1:10 reduziert und durch Zugabe von 11,5 ml DMEM wieder auf das Gesamtvolumen der Gewebekulturflasche von 12 ml gebracht. Lediglich bei den BSR-T7-Zellen müssen dem Medium anschließend noch 120 µl des Antibiotikums G 418 zugefügt werden.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Mikroskop	Nikon Instruments Europe B.V, Amstelveen, Niederlande
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Einmalzählkammer	Hycor Biomedical Ltd, Edinburgh, Großbritannien
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Durchführung:

Um die Vergleichbarkeit von Experimenten und Ergebnissen mit Zellen zu gewährleisten, muss die Zellzahl genau definiert werden. Die Zellzählung erfolgt mit Hilfe von Trypanblau.

Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff, der nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen werden kann, da diese eine beschädigte Zellmembran aufweisen. Die Aufnahme führt zur Blaufärbung der gesamten Zelle. Für die Zellzahlbestimmung interessiert jedoch ausschließlich die Anzahl vitaler Zellen, welche sich aufgrund der intakten Zellmembran nicht blau färben.

Hierzu werden 10 µl des beim Passagiervorgang gewonnenen Trypsinats in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 90 µl Trypanblau versetzt und gemischt. Anschließend füllt man die Suspension in eine Einmalzählkammer. Unter dem Mikroskop werden die Zellen in drei

von neun Quadraten, die ihrerseits jeweils aus neun kleineren Quadraten bestehen, gezählt und der Mittelwert aus allen drei Quadraten errechnet. Gemäß der unten stehenden Formel lässt sich somit die Zellzahl pro Milliliter Trypsinat bestimmen:

Formel: Mittelwert x 100.000 = Zellen / ml

2.2.3 Zellaussaat

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Mehrkanalpipette (20-200 µl)	CAPP, Odense, Dänemark
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Gewebekulturflaschen mit Filter (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten mit Spitzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6 Kavitäten, 12 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (24 Kavitäten)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten (96 Kavitäten)	NUNC, Roskilde, Dänemark
Zelllinien	
siehe Tab. Zellkultivierung S.12	

Durchführung:

Für manche Experimente, wie z.B. *Reporter Assays* oder Immunfluoreszenztests ist es nötig Zellen in Kavitäten einer Zellkulturplatte jeweils mit der gleichen Anzahl und gleichem Volumen auszusäen, um anschließend die Vergleichbarkeit der einzelnen Kavitäten gewährleisten zu können.

Aus der wie unter 2.2.2 (S. 14) beschriebenen ermittelten Ist-Zellzahl des Trypsinats und der Anzahl an Kavitäten pro Zellkulturplatte resultiert folgende Formel, mit deren Hilfe die einzusetzende Menge an Trypsinat ermittelt werden kann.

Formel: (Zellzahl-Soll pro Kavität x Anzahl der Kavitäten) / (Zellzahl-Ist Trypsinat)
= Menge Trypsinat in ml

Abhängig von der Anzahl an Kavitäten pro Zellkulturplatte und damit dem Volumen der einzelnen Kavitäten wird das Trypsinat mit dem entsprechenden Medium auf das benötigte Gesamtvolumen für die jeweilige Zellkulturplatte aufgefüllt und für 24 h bei 37°C inkubiert (siehe Tabelle).

<u>Anzahl der Kavitäten pro Platte</u>	<u>Volumen pro Kavität</u>
6	2 ml
12	1 ml
96	150 µl

Analog kann die benötigte Zellzahl einer spezifischen Zelllinie auch in Gewebekulturflaschen ausgesät werden. Hierbei bestimmt die Größe der eingesetzten Gewebekulturflasche (25 cm², 75 cm²) das benötigte Gesamtvolumen.

2.2.4 Transformation von Bakterienzellen

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Bunsenbrenner	Campinggaz GmbH, Hungen-Inheiden, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Gewebekulturschalen steril (100 x 20 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
LB-Agar mit Ampicillin	10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extrakt, 10 g NaCl, 1 ml Ampicillin (100 µg/ml), 15 g Bacto Agar in 1 l H ₂ O
Kompetente Bakterien	Genotyp und Bezugsquelle
INVαF'	F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 λ- Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)) Zymo Research, Freiburg, Deutschland

Durchführung:

Ziel der Transformation ist die Aufnahme eines Plasmids in die Bakterienzelle. Im Rahmen dieser Arbeit werden Plasmide in zwei unterschiedliche Bakterienzellarten

transformiert: XL1-Blue-Zellen und INV α F'-kompetente Zellen. Zur Transformation der zweitgenannten Zellen siehe Kapitel TA-Klonierung (S. 18).

Transformation in XL1-Blue-Zellen:

Pro Ligationsansatz wird ein Aliquot (Volumen ca. 50 μ l) der XL1-Blue-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 5 μ l des Ligationsansatzes versetzt und durch vorsichtiges Umrühren gemischt. Zur Inkubation wird die Suspension für 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend komplett auf bereits vorgewärmten LB-Amp.-Platten mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen.

2.2.5 Anzucht von *E.coli*-Kulturen

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Bunsenbrenner	Campingaz GmbH, Hungen-Inheiden, Deutschland
Drigalskispatel	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Inkubationsschüttler	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Schraubdeckelröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Gewebekulturschalen steril (100 x 20 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter (0,1-10 μ l, 1-20 μ l, 1-100 μ l, 1-200 μ l, 101-1000 μ l)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Medien	Hersteller und Zusammensetzung
LB-Agar mit Ampicillin	10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extrakt, 10 g NaCl, 1 ml Ampicillin (100 μ g/ml), 15 g Bacto Agar in 1 l H ₂ O
LB-Medium mit Ampicillin	10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extrakt, 10 g NaCl, 1 ml Ampicillin (100 μ g/ml) in 1 l H ₂ O
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Ampicillin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Durchführung:

Damit sich mit Plasmiden transformierte Bakterien vermehren können, müssen sie in ein Medium überführt werden, das ihnen a) die nötigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung stellt und b) ein Selektionsantibiotikum enthält, das dafür sorgt, dass sich nur die transformierten Bakterien vermehren können. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten:

Anzucht einer *E.coli*-Kultur auf einer LB-Agarplatte:

Die Bakteriensuspension wird mit einem Drigalski-Spatel auf eine LB-Amp.-Agarplatte (Ampicillin-Endkonzentration: 0,1 mg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank bebrütet.

Anzucht einer *E.coli*-LB-Flüssigkultur:

Mit einer sterilen Pipettenspitze wird eine Bakterienkolonie von einer LB-Amp.-Agarplatte vorsichtig abgetragen und in einem 15-ml-Schraubdeckelröhrchen mit 4 ml LB-Amp.-Flüssigmedium (Ampicillin-Endkonzentration: 0,1 mg/ml) bei 37°C und 150 UpM über Nacht kultiviert.

2.2.6 TA-Klonierung**Materialien:**

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Bunsenbrenner	Campingaz GmbH, Hungen-Inheiden, Deutschland
Inkubationsschüttler	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Gewebekulturschalen steril (100 x 20 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
LB-Agar mit Ampicillin	10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extrakt, 10 g NaCl, 1 ml Ampicillin (100 µg/ml), 15 g Bacto Agar in 1 l H ₂ O
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
X-β-Gal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reagenziensätze	Bezugsquelle / Hersteller
Dual Promotor TA Cloning Kit with one Shot INVαF' Chemically Competent <i>E.coli</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Durchführung:

Das Prinzip der TA-Klonierung basiert auf der besonderen Eigenschaft der Taq-Polymerase, unabhängig von dem zu amplifizierenden DNA-Stück ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts (*insert*) anzuhängen. Im Gegensatz dazu weist der linearisierte pCRII-Vektor des Reagenziensatzes an seinem 3'-Ende einen einzelnen Desoxythymidin-Rest auf. Die dadurch entstandene Komplementarität der beiden Enden ermöglicht eine effiziente Klonierung des amplifizierten *Inserts* in den pCRII-Vektor.

Für diesen Versuch wird der *Dual-Promotor-TA-Cloning*-Reagenziensatz der Firma Invitrogen GmbH genutzt. Die Ligation, Transformation des Ligationsansatzes in die kompetenten INV α F'-Zellen und das Ausstreichen auf LB-Amp.-Platten, die vorher mit X- β -Gal beschichtet worden sind, erfolgt gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die zusätzliche Beschichtung mit X- β -Gal dient der späteren Blau-Weiß-Differenzierung der einzelnen Bakterienkolonien. Hintergrund dieser Differenzierung ist der Aufbau des pCRII-Vektors. Neben seinen Resistenzgenen gegen Ampicillin und Kanamycin (die ermöglichen, dass nur Bakterien auf der LB-Amp.-Platte wachsen, die überhaupt das Plasmid aufgenommen haben) besitzt er u.a. auch ein Fragment des lacZ-Gens, welches für eine β -Galaktosidase kodiert. Die zu transformierenden Bakterien enthalten ein weiteres Fragment des lacZ-Gens. Nach Transformation kommt es durch Transkomplementation zur Bildung einer enzymatisch aktiven β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase kann das ausgestrichene X- β -Gal verstoffwechseln, mit der Folge, dass ein blauer Farbstoff entsteht. Da sich nun die Klonierungsstelle für ein *Insert* inmitten des lacZ-Genfragments befindet, führt dies zur Unterbrechung bzw. zum Funktionsverlust des Genfragments und es kann keine enzymatisch aktive β -Galaktosidase mehr durch Transkomplementation entstehen. Folglich besitzen nur Bakterienklone, die das *Insert* **nicht** enthalten, das intakte lacZ-Gen, wodurch sie X- β -Gal verstoffwechseln können und sich somit bläulich anfärben. Im Umkehrschluss besitzen Bakterien, bei denen das *Insert* im Vektor vorhanden ist, kein intaktes lacZ-Gen und damit keine aktive β -Galaktosidase. Sie können kein X- β -Gal verstoffwechseln und erscheinen als weiße Kolonien. Dies sind die gewünschten Klone und können im nächsten Schritt in Flüssigkultur angezüchtet werden (siehe 2.2.5, S. 17).

Im Bezug auf den pCRII-Vektor ist an dieser Stellen kurz die Orientierung des *Inserts* zu definieren: Eine *sense*-Orientierung des *Inserts* innerhalb des Vektors bedeutet die

Transkription des *Inserts* durch den Sp6-Promotor, während *antisense* orientierte *Inserts* vom T7-Promotor ausgehend transkribiert werden.

2.2.7 Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Materialien:

Enzyme	Bezugsquelle / Hersteller
rAPid Alkaline-Phosphatase (1U/ μ l)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Durchführung:

Die Dephosphorylierung dient im Rahmen von Klonierungsarbeiten dazu, die Religation von linearisierten Plasmiden mit kompatiblen Enden zu minimieren bzw. um damit die Wahrscheinlichkeit für die Ligation von *Insert* und Vektor zu erhöhen. Hierzu wird mittels der rAPid Alkaline-Phosphatase der Phosphatrest an DNA-Fragmenten abgedaut, wodurch im Idealfall keine bzw. wenig Religation stattfinden kann.

Das unbehandelte *Insert* besitzt allerdings noch beide Phosphatgruppen am 5'-Ende, über welche es nun in den dephosphorylierten Vektor eingefügt werden kann. Die entstehenden Ligationsprodukte werden also nur an zwei der prinzipiell vier möglichen Bindungsstellen verknüpft. Die verbleibenden Lücken werden nach der Transformation durch bakterielle Enzyme geschlossen.

Zur Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für 500 ng linearisierte Vektor-DNA 1 μ l rAPid Alkaline-Phosphatase (1U/ μ l) eingesetzt und das Reaktionsvolumen auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l gebracht (2 μ l 10 x rAPid Alkaline-Phosphatase-Puffer + x μ l Bidest).

Gemäß den Angaben des Herstellers wird die Dephosphorylierung bei 37°C für 10 Minuten durchgeführt und anschließend bei 75°C für 2 Minuten hitzeinaktiviert.

2.2.8 Ligation von klebrigen und/oder glatten Enden

Materialien:

Reagenziensätze	Bezugsquelle / Hersteller
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Durchführung:

Neben der Klonierung mittels T/A-Überhängen (vgl. 2.2.6, S. 18) können auch *Insert* und Vektor, die zuvor mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut worden sind, über eine Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft werden. Die beim Restriktionsverdau entstandenen Enden sind entweder vom stumpfen (*blunt*) oder klebrigen (*sticky*) Typ und müssen nicht zwangsläufig einen in toto komplementären Aufbau besitzen.

Um jedoch die Effizienz der Ligation des *Inserts* in den Vektor zu gewährleisten, sollte auch bei dieser Methode der Vektor mittels Dephosphorylierung vorbehandelt werden, da bei einem Doppelverdau zum einen unter Umständen kompatible Schnittstellen entstehen können und zum anderen ein gewisser Teil der Plasmide nur einfach verdaut wird und daher ohne das Vorhandensein eines *Inserts* religieren kann. Zur weiteren Optimierung der Ausbeute des Ligationsproduktes wird das *Insert* im Vergleich zum Vektor im Rahmen dieser Arbeit stets im stöchiometrisch dreifachen Überschuss in die Ligationen eingesetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Sonderfall: Bei nicht kompatiblen Enden bedient man sich vor dem Einsatz in die Ligation einer Behandlung mit der T4-DNA-Polymerase von Fermentas GmbH (Durchführung gemäß den Angaben des Herstellers). Diese Polymerase kann mit Hilfe ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität durch Einfügen von Nukleotiden am 5'-Ende bzw. Entfernung von Überhängen am 3'-Ende überhängende Restriktionsschnittstellen in stumpfe umwandeln und somit eine Ligation primär inkompatibler, überhängender Restriktionsschnittstellen ermöglichen.

Hierfür wird der *Rapid-DNA-Ligation*-Reagenziensatz der Firma Fermentas genutzt und gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**Materialien:**

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
PCR-Kabinett	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Thermocycler TProfessional	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml, steril)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
Desoxyribonukleosidtriphosphate als dNTP Mix (100 mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Enzyme	Bezugsquelle / Hersteller
PowerScript DNA-Polymerase	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	5-Prime GmbH, Hamburg, Deutschland

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten *Primer* sind hier als Übersicht dargestellt. Sie stammen überwiegend von dem Hersteller Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), mit Ausnahme derer, die mit (*) bzw. (**) gekennzeichnet sind. (*) werden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland), (**) von Tib Molbiol GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen.

<i>Primer</i>	Sequenz (5' - 3')	Verwendungszweck
5'RACE Outer*	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	Klonierung 5'-Ende in pCRII-Vektor
5'RACE Inner*	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCT GGCTTTGATG	Klonierung 5'-Ende in pCRII-Vektor
5-15-1**	GAGGGATCCAGTTTAGAATCCTCAG AGGTC	Klonierung 3'-Ende in pCRII-Vektor
BtgZI_OROV-L_for_pTM1*	CCAGTGTGCTGGAATTCGCCGCGAT GAGAGCTCTTCCATGTCACAACTGT TGCTCAAC	Klonierung L1_Neu in pCRII-Vektor
Esp3I_OROV_vMpr o_for_new	CGTCTCCTATAGAGTAGTGTGCTAC CAACAACAATTTTTGAC	Klonierung OROV-Minigenom
Esp3I_OROV_vMpr o_vRL_rev_new	CGTCTCCACCCAGTAGTGTACTACC AGCAACAAACAGTGACAATGAC	Klonierung OROV-Minigenom
OROV-L_rev_3end	AGAACTTCAGCACAAATATCCTCAG C	Klonierung 3'-Ende in pCRII-Vektor
OROV-L_rev_5end	TTGCTCGAATGAAAATCTTA	Klonierung 5'-Ende in pCRII-Vektor, cDNA-Synthese 5'-Ende
OROV-L_rev_5end inner*	TTCCTCAAAGACCCAATA	Klonierung 5'-Ende in pCRII-Vektor
OROV-L1_rev	TCATTGATGCATTGCCAGTATTTAGT	Klonierung L1_Neu in

		pCRII-Vektor
OROV-L3_rev	ATCAATTTGTCATCTTCCCCAGTG	Klonierung L3_Neu in pCRII-Vektor
OROV-L3_for_new_Esp3I	GACAGACGTCTCGGAATACTAGAAA GTGATTTATCAACAATTG	Klonierung L3_Neu in pCRII-Vektor
OROV-M_rev_3end	AACACATATTTGCGCCAAGTCCTACA C	Klonierung 3'-Ende in pCRII-Vektor
OROV-M_rev_5end	TTAAGCCATACAATCAGAAGA	Klonierung 5'-Ende in pCRII-Vektor
OROV-M3_for	TATTGAACACAACGAAAGATGC	cDNA Synthese 5'-Ende
OROV-S_rev_3end	CATCTTTGGCCTTCTTTTGG	Klonierung 3'-Ende in pCRII-Vektor
OROV-S_rev_5end	GGCCTTTACCCAGATGC	Klonierung 5'-Ende in pCRII-Vektor, cDNA-Synthese 5'-Ende
OROV-S_rev_5end inner*	ACTTCTTCCCTTTGGTGATT	Klonierung 5'-Ende in pCRII-Vektor / Screenen der S-Klone nach 5'-Ende
OROV-S_rev_sapI	GACAGAGCTCTTCACTATATGTCAA TTCCGAAT	Screenen der S-Klone nach 5'-Ende

Durchführung:

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) lassen sich spezifisch durch einen Vorwärts- und einen Rückwärts-*Primer* definierte DNA-Fragmente *in vitro* exponentiell vermehren.

Voraussetzung für die Polymerase-Ketten-Reaktion ist das Vorhandensein aller grundlegenden Komponenten: Ausgangs-DNA (hier stets Verwendung von 10 ng), die das zu amplifizierende DNA-Stück enthält (Matrize, *template*), einen Vorwärts- und einen Rückwärts-*Primer* (jeweils 10 µM), die das zu amplifizierende DNA-Stück definieren, Desoxyribonukleotid-Mix (10 mM), der die Bausteine für die Synthese des neugenerierten Tochterstrangs liefert, Mg²⁺ als wichtigen Kofaktor für die DNA-Polymerase, hitzestabile DNA-Polymerase sowie der spezifische Puffer.

Der Reaktionsansatz wird gemäß dem mitgelieferten Protokoll der verwendeten DNA-Polymerase bzw. in der in Klammern stehenden Konzentration in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und in den Thermocycler gestellt, in dem die PCR in mehreren Reaktionszyklen (i.d.R. 30-35x) abläuft, wobei jeder Zyklus nach dem gleichen Schema aufgebaut ist:

Denaturierung:

Bei einer Temperatur von 95°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des DNA-Doppelstranges aufgebrochen, wodurch zwei Einzelstränge entstehen.

Zu Beginn der eigentlichen PCR-Zyklen schaltet man einmalig eine zweiminütige Denaturierungsphase von 95°C vor (sog. Initialisierung) um zu gewährleisten, dass initial die komplette doppelsträngige Ausgangs-DNA, sowie die *Primer* voneinander getrennt als Einzelstränge vorliegen.

Annealing:

Das Absenken der Temperatur ermöglicht die Anlagerung der beiden *Primer* an ihre spezifische Nukleotidsequenz innerhalb der beiden Einzelstränge. Die sog. *Annealing*-Temperatur basiert auf der Höhe des Schmelzpunktes des *Primers* und variiert folglich abhängig von den vorliegenden *Primereigenschaften* (Länge, Sequenz). Aus diesem Grund muss jene von *Primer* zu *Primer* spezifisch gewählt werden.

Sonderfall: Bei manchen Experimenten bevorzugt man eine Modifikation der standardmäßigen PCR, die sog. *Touch-Down-PCR*. Sie dient der Steigerung der Amplifikationseffizienz ohne die Rate von *Primer*-Fehlpaarungen zu erhöhen. Bei dieser PCR-Variante senkt man ausgehend von einer hohen Ausgangstemperatur durch Temperatureduktion von 0,5°C pro Zyklus schrittweise die *Annealing*-Temperatur ab. Vorteil dieser Vorgehensweise stellt die erhöhte Spezifität der Bindung des *Primer*-Paares an ihre Zielsequenz in den ersten Zyklen (auf Kosten der Effizienz) dar. Dagegen erfolgt das *Annealing* in den späteren Zyklen sehr effizient (dafür weniger spezifisch). Da in den ersten Zyklen aber die Bindung der *Primer* sehr spezifisch war, sollten primär die richtigen Amplifikationsprodukte entstanden sein, sodass die Gefahr einer Fehlpaarung in den späteren Zyklen (unter weniger stringenten Bedingungen) minimiert ist.

Elongation:

Die Elongationsphase dient der eigentlichen Synthese des komplementären DNA-Stranges.

Abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase besitzt jede ihr individuelles Temperaturoptimum (Pan-Powerscript-Polymerase 68°C, Taq-DNA-Polymerase 72°C).

Standard-PCR-Programm:

Heizdeckeltemperatur:	95°C		
Initialisierung:	<u>95°C</u>	<u>2 min</u>	} 35 x
Denaturierung:	95°C	30 s	
Annealing:	56°C	30 s	
Elongation:	<u>68/72°C</u>	<u>1 min</u>	
Terminierung:	68°C	5 min	

2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Chemidoc XRS System mit Software Quantity One	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoresekammer Horizon 58, 11·14	Life Technologies, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	AFK Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Zellkulturplatten (96 Kavitäten)	NUNC, Roskilde, Dänemark
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
Agarosegele (1%) groß	100 ml 1x TAE , 1 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration: 0,5 µg/ml)
Agarosegele (1%) klein	30 ml 1x TAE, 0,3 g Agarose, 1,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration: 0,5 µg/ml)
6x Orange Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
TAE (50x)	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml EDTA pH 8,0 (0,5 M)
TAE (1x)	40 ml TAE (50 x) in 1960 ml H ₂ O
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
DNA-Längenstandards (100 bp, 1 kb)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland als Lösung: 10 mg/ml in H ₂ O
----------------	---

Durchführung:

Die Gelelektrophorese dient dazu, mit Hilfe eines elektrischen Feldes ein Gemisch aus verschieden-großen DNA-Fragmenten der Größe nach aufzutrennen. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats der Nukleinsäuren wandern diese im elektrischen Feld Richtung Anode, wobei die Geschwindigkeit der Bewegung durch das Agarosegel abhängig von der jeweiligen Fragmentgröße ist; d.h. kleine, negativ-geladene Fragmente wandern wesentlich schneller Richtung Anode als große.

Abhängig von den erwarteten Größen der aufzutrennenden Fragmente wird ein x%-iges (meist 0,8- oder 1 %ig) Agarose-Gel angefertigt, wobei sich zur besseren Auflösung bei sehr kleinen Fragmenten ein höherprozentiges Gel empfiehlt. Die aufzutragende Probe wird mit 6x Orange Loading Dye versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um später eine Aussage über die Größe der DNA-Fragmente treffen zu können, werden zusätzlich 2 µl eines spezifischen Längenstandards aufgetragen. Anschließend wird das Gel mittels des Chemidoc XRS Systems unter UV-Exposition fotografiert. Die Menge des Fragments lässt sich über die Intensität des in die DNA-Doppelstränge eingelagerten Ethidiumbromids grob abschätzen.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Verwendungszwecke der Gelelektrophorese unterschieden:

- Rein analytisch: Auftragen von 5 µl Probe und 1 µl 6x Orange Loading Dye; Spannung von 110 V
- Präparativ, d.h. mit Hilfe eines sterilen Skalpell kann aus dem DNA-Fragment-Gemisch für weitere Experimente ein DNA-Fragment spezifischer Größe ausgeschnitten werden. Zu diesem Zweck werden 50 µl Probe mit 10 µl 6x Orange Loading Dye versetzt und aufgetragen; Spannung von 80 V

2.2.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Materialien:

Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Ethanol (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Reagenziensätze	Bezugsquelle / Hersteller
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg, Deutschland

Durchführung:

Nach der präparativen Gelelektrophorese muss zur weiteren Verwendung die DNA aus dem Agarose-Gelstück isoliert werden. Zu diesem Zweck muss das Agarose-Gelstück, welches die zu isolierende DNA enthält, zunächst mit Hilfe eines chaotropen Puffers solubilisiert werden. Anschließend erfolgt nach dem Prinzip der selektiven Bindefähigkeit von DNA-Molekülen an eine Silika-Membran die Reinigung der DNA, während Reagenzienrückstände die Silika-Membran problemlos passieren. Verwendet wird hierzu der *Zymoclean-Gel-DNA-Recovery*-Reagenziensatz der Firma Zymo Research. Die Gelextraktion der DNA wird gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.12 Restriktionsverdau**Materialien:**

Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA, 10 mg/ml)	New England Biolabs, Bad Schwalbach, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien
Enzyme	Bezugsquelle / Hersteller
FastDigest BamHI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest Bpu10I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest BsmBI (Esp3I)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest EcoRV	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest NcoI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest NotI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest SalI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest ScaI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest XbaI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
FastDigest XhoI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
BstAP1	SibEnzyme Ltd., Nowosibirsk, Russland

BtgZI	New England Biolabs, Bad Schwalbach, Deutschland
CfrI (EaeI)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DpnI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Esp3I (BsmBI)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
HindIII	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
LguI (SapI)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
PstI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
SacI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
StuI	New England Biolabs, Bad Schwalbach, Deutschland

Durchführung:

Der Restriktionsverdau wird mittels Restriktionsendonukleasen des Typs II durchgeführt. Dabei handelt es sich um bakterielle Enzyme ohne Methyltransferaseaktivität, die ATP-unabhängig innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer spezifischen Erkennungssequenz die DNA hydrolytisch spalten. Die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme sind meist palindromische Sequenzen. Abhängig vom jeweiligen Enzym können Fragmente mit glatten Schnittstellen (*blunt ends*) oder mit komplementären Überhängen am 3'- bzw. 5'-Ende (*sticky ends*) entstehen.

Der Restriktionsverdau wird in dieser Arbeit in zwei unterschiedlichen Anwendungen verwendet:

Kontrollverdau:

Zur Erfolgskontrolle einer durchgeführten Klonierung eines spezifischen DNA-Stücks (*insert*) in einen gewünschten Vektor bedient man sich eines einfachen Kontrollverdaus, der anschließend zur Visualisierung auf ein analytisches Gel aufgetragen wird (siehe 2.2.10, S. 25).

Protokoll eines Standard-Kontrollverdaus: 300 ng Plasmid-DNA

1 µl 10x mitgelieferter Puffer

1 µl Restriktionsenzym

x µl Bidest

10 µl Gesamtvolumen

Präparativer Verdau:







Um ein bestimmtes DNA-Stück in einen speziellen Vektor klonieren zu können, werden beide einem präparativen Verdau zugeführt, bei dem zum einen zur Optimierung der Ausbeute große Mengen an jeweiliger Plasmid-DNA (jeweils 3 µg auf 30-40 µl Gesamtvolumen) eingesetzt werden und zum anderen im Idealfall für die nachfolgende Klonierung komplementäre Restriktionsschnittstellen entstehen sollten. Die gewünschten, durch den Verdau entstandenen Fragmente können nachfolgend direkt aus einem präparativen Gel extrahiert und in die Klonierungsreaktion eingesetzt werden (siehe 2.2.10, S. 25).

Bei einem analytischen bzw. präparativen Doppelverdau muss das Gesamtvolumen auf die doppelte Menge erhöht und die Puffermenge bzw. die Pufferauswahl entsprechend angepasst werden. Gemäß der Anleitung des jeweiligen Herstellers werden die Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur, zusätzlich DTT, BSA etc.) gewählt und gegebenenfalls eine Hitzeinaktivierung durchgeführt.

2.2.13 Transfektion von Zellen**Materialien:**

Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
OptiMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reagenziensätze	Hersteller / Bezugsquelle
Fugene 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Fugene HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNA	Hersteller / Bezugsquelle
OROV-RNA	Abteilung Virologie, UMG
Vero-RNA	Abteilung Virologie, UMG
VSV-RNA	Abteilung Virologie, UMG
Zelllinien	Verwendungszweck
BSR-T7	Minireplikon-System-Kinetik
HEK 293	<i>Reporter Assay</i>
Vero E6	Immunfluoreszenztests

Je nach Versuchsaufbau, z.B. im Rahmen eines *Reporter Assays* oder einer Kinetikbestimmung werden die ausgesäten Zellen mit verschiedenen Plasmiden kotransfiziert, welche im Folgenden als Übersicht mit jeweiligem molekularem Aufbau und individueller Bezugsquelle aufgelistet sind.

Plasmide	Beschreibung	Bezugsquelle / Hersteller
pTM1-LACV-L	Vektor enthält die LACV-Polymerase-cDNA, die unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird 	Prof. Dr. Friedemann Weber, Universitätsklinikum Freiburg, Deutschland
pTM1-LACV-N	Vektor enthält die LACV-Nukleoprotein-cDNA, die unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird 	Prof. Dr. Friedemann Weber, Universitätsklinikum Freiburg, Deutschland
pTM1-OROV-cS	Vektor enthält die OROV-Nukleoprotein- und die OROV-NSs-Protein-cDNA, die unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert werden 	Abteilung Virologie, UMG
pTM1-OROV-cSmut	Vektor enthält durch Einfügen einer Mutation nur den ORF des OROV-Nukleoproteins, der unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird 	Abteilung Virologie, UMG
pTM1-OROV-L	Vektor enthält die OROV-Polymerase-cDNA, die unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird 	Abteilung Virologie, UMG
pTM1-OROV-L_Neu	Vektor enthält die korrigierte OROV-Polymerase cDNA, die unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird 	Diese Arbeit
pT7-ribo-SM2	Ausgangsvektor zur Herstellung sog. Rescueplasmide	Abteilung Virologie, UMG
pUC19	Leervektor	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland

Durchführung:

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von zellfremder Nukleinsäure (virale RNA, Plasmide) in eine eukaryotische Zelle. Hierzu werden im Verlauf der experimentellen Arbeit drei verschiedene Reagenzien genutzt: Lipofectamine 2000, FuGENE-6- und FuGENE-HD-Transfektionsreagenz.

Bei allen drei Reagenzien handelt es sich um ein Gemisch aus neutralen und kationischen Lipiden, die nach dem gleichen Funktionsprinzip die Transfektion von Plasmid-DNA ermöglichen:

Aufgrund der zellulären Lipiddoppelschicht kann polare Plasmid-DNA die unpolare Zellmembran nicht passieren. Nach Komplexierung der einzuschleusenden, anionischen Plasmid-DNA mit den kationischen Lipiden entstehen zusammen mit den neutralen Lipiden Liposomen, die mit der zellulären Doppellipidschicht fusionieren und folglich die eingeschlossene DNA in das Zellinnere abgeben können.

Transfektion mit Lipofectamine 2000:

Vor der Transfektion mit Lipofectamine 2000 muss ein sog. Lipomix erstellt werden, in dem das Lipofectamine 2000 mit OptiMEM versetzt wird. Dieses Gemisch muss vor der eigentlichen Transfektion für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Menge an benötigtem Transfektionsreagenz bzw. das Gesamtvolumen ist abhängig vom Zelltyp, von der Zellzahl und der Menge an zu transfizierender Nukleinsäure:

Anzahl der Kavitäten pro Platte:Ansatz Lipomix pro Kavität:

6	4 µl Lipofectamine 2000 in 100 µl OptiMEM
12	2 µl Lipofectamine 2000 in 50 µl OptiMEM
24	1 µl Lipofectamine 2000 in 25 µl OptiMEM

Anschließend wird das zu transfizierende Material vorsichtig mit dem Lipomix versetzt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erst dann kann der gesamte Ansatz auf die zu transfizierenden Zellen verteilt werden.

Transfektion mit FuGENE-HD / -6-Transfektionsreagenz:

Im Gegensatz zu Lipofectamine 2000, kann FuGENE HD/6 gleich zum Transfektionsmix hinzugefügt werden. Dabei wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Reagenz meist im Verhältnis 3:2 zur Plasmid-DNA (in µg) eingesetzt und der komplette Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des Ansatzes zu den zu transfizierenden Zellen.

2.2.14 Isolierung von Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen und Zellkulturüberständen

Materialien:

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Schraubdeckelröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
10x NTE (200 ml)	20 ml 1 M Tris (pH 6,5), 4 ml 500 mM EDTA, 40 ml 5 M NaCl, 134 ml H ₂ O
5 M NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (75 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glykogen (35mg/ml)	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PEG 8000	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD TriFast FL	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
10 mM Tris, pH 6,5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zelllinien	Bezugsquelle
BHK	Abteilung Virologie, UMG
IFNAR -/-	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jovan Pavlovic, Institute of Medical Virology, Zürich, Schweiz
Vero E6	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland
Viren	Bezugsquelle / Hersteller
Oropouche-Virus	Abteilung Virologie, UMG

Durchführung:

Der RNA-Isolierung liegt das Prinzip der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation zugrunde, das sich die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften zellulärer Bestandteile zu Nutzen macht. PeqGOLD TriFast (FL) enthält zwei wichtige Komponenten: Phenol und Guanidinisothiocyanat. Durch das Guanidinisothiocyanat werden die Zellen lysiert, sowie zelluläre Bestandteile (Enzyme wie z.B. RNasen, etc.) degradiert, während das enthaltene Phenol seinerseits als Lösungsmittel fungiert. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation erfolgt gemäß den jeweiligen chemischen Eigenschaften die Auftrennung der zellulären Bestandteile in drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroformphase, eine dazwischen liegende Interphase und eine obere wässrige Phase. Während sich zelluläre Proteine hauptsächlich in der Phenol-Chloroform-Phase und DNA sich großteils in der Interphase anreichern, findet sich die zu isolierende RNA aufgrund ihrer Polarität ausschließlich in der oberen wässrigen Phase wieder. Nach vorsichtiger Abnahme der wässrigen Phase und anschließender Fällung mittels Isopropanol erhält man letztendlich die gewünschte RNA.

Ausgangsmaterial für die virale RNA-Isolation stellen im Rahmen dieser Arbeit sowohl infizierte Zellen verschiedener Zellreihen als auch deren virushaltige Zellüberstände dar.

Die Durchführung erfolgt gemäß dem Protokoll der Firma PEQLAB Biotechnologies GmbH.

Aufgrund möglicher Verschleppungen von DNA während der RNA-Isolation empfiehlt sich anschließend ein zusätzlicher DNase-Verdau zur Generierung möglichst „reiner“ RNA-Proben.

Die gewonnene RNA kann für weitere Experimente bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.15 DNase-Behandlung**Materialien:**

Reagenziensätze	Bezugsquelle / Hersteller
Ambion Turbo DNA-free-Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Durchführung:

Bei der Isolation von RNA mit Hilfe der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation kann es methodenbedingt zur Verschleppung von DNA kommen. Um jedoch möglichst reine,

DNA-freie RNA-Proben zu erhalten, schließt sich der RNA-Isolation in aller Regel eine zusätzliche DNase-Behandlung an.

DNasen (Desoxyribonukleasen) katalysieren als Endonukleasen die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen innerhalb eines DNA-Moleküls und spalten mit einer hohen Affinität die vorhandene DNA in kleinere Fragmente.

Hierzu wird der *Ambion-Turbo-DNA-free*-Reagenziensatz der Firma Applied Biosystems verwendet und die Behandlung gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.16 Konzentrierung und Aufreinigung von RNA

Materialien:

Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Ethanol (100%, 80%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Reagenziensätze	Bezugsquelle / Hersteller
RNeasy MinElute Cleanup	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Durchführung:

Um potenziellen Wechselwirkungen zwischen Reagenzienresten aufeinander folgender Experimente entgegenzuwirken, kann es von erheblicher Relevanz sein, RNA-Proben von Enzym- und Pufferrückständen zu reinigen.

Das Verfahren basiert auf, unter spezifischen Bedingungen erzeugter, selektiver Bindefähigkeit von RNA-Molekülen an die Silika-Membran der im Reagenziensatz enthaltenen RNeasy-MinElute-Säulen. Somit können die Reagenzienrückstände oder verdaute DNA-Polynukleotide problemlos entfernt werden, da diese nicht an die Silika-Membran binden und jene passieren.

Hierzu wird der RNeasy-MinElute-Cleanup-Reagenziensatz der Firma Qiagen GmbH verwendet. Die Aufreinigung wird gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.17 Spektrophotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA/DNA

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Nano Drop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG,

Spektralphotometer mit Software	Bonn, Deutschland
ND-1000 V3.3.0 one channel	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland

Durchführung:

Die spektrophotometrische Bestimmung mit Hilfe des Nano-Drop-ND-1000-Spektralphotometers basiert auf der Verwendung von emittiertem UV-Licht unterschiedlicher Wellenlängen.

Unter UV-Licht-Exposition wird abhängig von der zu analysierenden Probe eine spezifische Wellenlänge mit spezifischer Intensität absorbiert und das Ergebnis graphisch dargestellt. Anhand des so ermittelten Grades der Absorption kann auf die Konzentration des lichtabsorbierenden Bestandteils innerhalb der Probe rückgeschlossen werden. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, während jenes mancher kontaminierender Stoffe beispielsweise bei 280 nm (z.B. Proteine, Phenol) oder 230 nm (z.B. Phenolate, Thiocyanate) liegt.

Durch Ermittlung verschiedener Quotienten wie z.B. 260 nm/280 nm oder 260 nm/230 nm lässt sich somit eine Aussage über die Reinheit der Probe treffen. Als „rein“ geltende Proben besitzen einen Wert von ca. 1,8 für den Quotienten aus 260 nm / 280 nm und für den Quotienten aus 260 nm / 230 nm einen Wert von ca. 2,0-2,2. Darunter liegende Werte sprechen somit für Kontamination der gemessenen Probe, welche folglich in erhöhter Intensität eine Wellenlänge von 280 nm bzw. 230 nm absorbieren.

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung werden 1,5 µl Probe eingesetzt. Vor der eigentlichen Messung muss das Spektrophotometer mit der jeweiligen Elutionslösung (Elutionspuffer, Bidest etc.) geeicht werden.

2.2.18 Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von RNA**Materialien:**

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
FLUOstar Optima Microplate Fluorometer mit FLUOstar Reader Control and Data Analysis Software	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Fluotrac 600 96-Kavitäten-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Reagensatz	Bezugsquelle / Hersteller
Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Durchführung:

Dieses Verfahren ist eine weitere Möglichkeit die Konzentration von RNA-Proben zu bestimmen. Hierzu wird der Fluoreszenzfarbstoff Quant-iT-RiboGreen genutzt, welcher spezifisch an RNA-Moleküle bindet. Erst jene Bindung erzeugt nach Anregung ein starkes Fluoreszenzsignal, das mit Hilfe eines Fluorometers detektiert werden kann.

Die somit erzeugte Spezifität im Bindungsverhalten ermöglicht, dass der Einfluss von Kontaminanten (z.B. Einzel-Nukleotide, die ein ähnliches Absorptionsverhalten bei der spektrometrischen Konzentrationsbestimmung besitzen) minimiert bzw. beinahe ausgeschlossen werden kann.

Durch den FLUOstar-Optima-Microplate-Fluorometer wird das an die RNA-Moleküle gebundene Quant-iT-RiboGreen-Reagenz bei einer Wellenlänge von 500 nm angeregt und die Fluoreszenz der Moleküle gemessen. Das zu erwartende Fluoreszenzmaximum für den Komplex aus RNA und Quant-iT-RiboGreen-Reagenz liegt bei ca. 525 nm.

Anhand einer Standardkurve, bei der einer definierten RNA-Konzentration (1 µg/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 20 ng/ml) bei einer Wellenlänge von 525 nm ein bestimmter Fluoreszenzwert zugeordnet wird, kann auf die tatsächliche RNA-Konzentration in der Probe rückgeschlossen werden.

Hierzu wird der *Quant-iT-RiboGreen-RNA-Assay-Reagensatz* der Firma Invitrogen GmbH verwendet und die Konzentrationsbestimmung gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.19 Plasmidpräparation (Minipräparation)

Materialien:

Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Ethanol (100%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Reagensätze	Bezugsquelle / Hersteller
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland

Durchführung:

Um aus zuvor transformierten und anschließend vermehrten Bakterien die eingeschleuste Plasmid-DNA zu isolieren, bedient man sich der Minipräparation. Dieser Methode liegt das Prinzip der alkalischen Lyse zugrunde. In Kombination mit einer anschließenden Reinigung unter Ausnutzung der selektiven Bindefähigkeit der Reagenzien an einer Silika-Membran kann so reine Plasmid-DNA gewonnen werden.

Durch die Behandlung der abzentrifugierten Bakterien mit Resuspensionspuffer wird die Stabilität der Bakterienzellwand aufgehoben. Zusätzlich beinhaltet der verwendete Resuspensionspuffer eine RNase A, wodurch die bakterielle RNA bereits großteils zersetzt wird. Daran schließt sich die vollständige Lyse der Bakterienzellen an, bei der sowohl die chromosomale bakterielle DNA, bakterielle Proteine, als auch die Plasmid-DNA degradiert werden. Durch das Versetzen dieser Suspension mit Neutralisationspuffer renaturiert zum einen die Plasmid-DNA, zum anderen bilden die denaturierten Bakterienbestandteile (Proteine, chromosomale DNA und RNA) unlösliche Komplexe und fallen in der Lösung aus. Durch Zentrifugation werden die renaturierte Plasmid-DNA, die im Überstand gelöst bleibt, und die ausgefallenen bakteriellen Bestandteile voneinander getrennt. Der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA wird zur effizienten Reinigung auf eine Silika-Membran überführt. Hierbei wird die DNA durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Silikagel gebunden, gewaschen und anschließend unter Niedrigsalzbedingungen (Wasser) eluiert.

Zur Minipräparation wird der *peqGOLD-Plasmid-Miniprep*-Reagenziensatz der Firma PEQLAB Biotechnologies GmbH genutzt und jene gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.20 Plasmidpräparation (Midipräparation)**Materialien:**

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Sorvall RC 26 Plus Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller

Schraubdeckelröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten mit Spitzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Ethanol (70%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reagenziensätze	Bezugsquelle / Hersteller
NucleoBond PC 100	Macherey-Nagel GmbH+Co. KG, Düren, Deutschland

Durchführung:

Ziel der Midipräparation ist es, größere Mengen an Plasmid-DNA aus zuvor transformierten Bakterien zu isolieren. Sie folgt einem ähnlichen Funktionsprinzip (alkalische Lyse und anschließende Reinigung der Plasmid-DNA) wie bereits für die Minipräparation beschrieben, mit dem Unterschied, dass die DNA nicht an Silikagel (hydrophobe Wechselwirkung), sondern an eine Anionenaustauschersäule bindet. Anschließend muss die selektiv-gebundene, negativ-geladene Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen von der Anionenaustauschersäule eluiert und zur Eliminierung des Salzes zusätzlich gefällt werden. Als Ausgangsmenge wird im Vergleich zur Minipräparation eine erheblich größere Menge transformierter Bakterienkultur eingesetzt (Kultivierung von 50 ml Bakterienkultur in LB-Amp. über Nacht bei 37°C und 150 UpM). Hierzu wird der Reagenziensatz NucleoBond PC 100 der Firma Macherey-Nagel GmbH+Co. KG genutzt und gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.21 RLM-RACE-PCR zur Analyse der nichtkodierenden Enden der OROV-Genomsegmente

Die RLM-RACE-PCR (*RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA-ends with PCR*) stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe es möglich ist, auch die Enden von RNA zu amplifizieren und deren Nukleotidsequenz zu entschlüsseln. Im ersten Schritt wird hierbei ein Nukleotidstück (Adapter) bekannter Sequenz an das jeweilige, nichtkodierende Ende ligiert, wovon in einem zweiten Schritt im Falle des 3'-Endes direkt und im Rahmen des 5'-Endes durch Verwendung eines im bereits bekannten, kodierenden Bereichs anlagernden

Primers jeweils cDNA des gewünschten nichtkodierenden Endes synthetisiert werden kann. In der sich anschließenden PCR können nun unter Verwendung eines der jeweiligen der Ankersequenz-entsprechenden *Primers* und eines *Primers* basierend auf einer bekannten Nukleotidsequenz innerhalb des kodierenden Bereichs (im Falle des 5'Endes muss der verwendete *Primer* stromabwärts des im Rahmen der cDNA-Synthese verwendeten *Primers* liegen) die vollständigen nichtkodierenden Enden amplifiziert werden.

2.2.21.1 Adapter-Ligation an das 3'-Ende von OROV-RNA

Materialien:

Enzyme	Bezugsquelle / Hersteller
T4-RNA-Ligase 1 (20 U/μl)	New England Biolabs, Bad Schwalbach, Deutschland
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
RNA	Bezugsquelle / Hersteller
OROV-RNA	Abteilung Virologie, UMG
Adapter	Sequenz (5' - 3') und Hersteller
iSP9-Anchor-Adapter	PH-GACCTCTGAGGATTCTAAACXTCCAGTTTA GAATCC Tib Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland

Durchführung:

Um die 3'-untranslatierten Regionen (UTR) des Oropouche-Virus entschlüsseln zu können, wird an das 3'-Ende eine Adapter-cDNA ligiert, damit die Reverse Transkriptase bei der folgenden cDNA-Synthese das komplette Ende ablesen kann. Zu diesem Zweck wird der iSP9-Anchor-Adapter mittels der T4-RNA-Ligase 1 an das 3'-Ende der RNA ligiert.

Aufbau und Funktionsprinzip des Adapters: (Maan et al. 2007)

Der iSP9-Anchor-Adapter ist so konstruiert, dass er selbstkomplementär ist und somit gleichzeitig als Adapter für die Ligation, sowie als *Primer* für die folgende cDNA-Synthese fungiert, wodurch die Vollständigkeit der generierten cDNA im Bezug auf die UTR gewährleistet werden kann (siehe Abbildung 5, S.40).

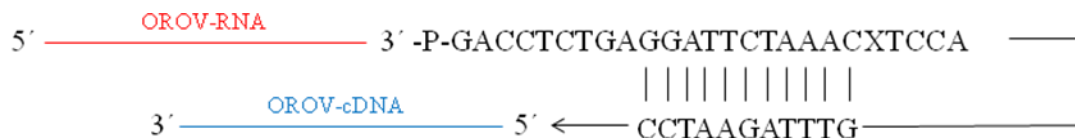


Abbildung 5: iSP9-Anchor-Adapter: Aus 35 Nukleotiden bestehender DNA-Adapter, der an seinem 5'-Ende eine freie Monophosphatgruppe zur Ligation an das freie 3'-OH-Ende der viralen RNA aufweist. Innerhalb der *Primer*-Sequenz zeigen 11 Nukleotide einen absolut komplementären Aufbau. Jener bedingt die intramolekulare Eigenanlagerung und die Bildung eines kurzen DNA-Doppelstrangs als Initiationssequenz für die folgende cDNA-Synthese. X steht hierbei für einen sog. Phosphoramidit-*Spacer*, der als eine Art Platzhalter zwischen den zwei komplementären *Primer*-Hälften fungiert.

Ligationsansatz: 500 ng OROV-RNA
 1 µl iSP9-Anchor-Adapter (Konz. 500 ng/µl)
 2 µl 10x T4-RNA-Ligase-Puffer
 1 µl T4-RNA-Ligase 1 (20 U/µl)
 1 µl RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor
 x µl Bidest

20 µl Gesamtvolumen

Der Ligationsansatz wird bei 4°C über Nacht inkubiert und am Folgetag mit Hilfe des *RNeasy-MinEluteCleanup*-Reagenziensatzes der Firma Qiagen GmbH von Enzym- und Pufferrückständen gereinigt mit dem Ziel der Isolierung möglichst reiner mit Adapterversehener OROV-RNA.

2.2.21.2 Adapter-Ligation an das 5'-Ende von OROV-RNA

Materialien:

Enzyme	Bezugsquelle / Hersteller
T4-RNA-Ligase 1 (20 U/µl)	New England Biolabs, Bad Schwalbach, Deutschland
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
RNA 5' Polyphosphatase (20 U/µl)	Epicentre Biotechnologies, Madison, Vereinigte Staaten
Tobacco Acid Pyrophosphatase (10 U/µl)	Epicentre Biotechnologies, Madison, Vereinigte Staaten
RNA	Bezugsquelle / Hersteller
OROV-RNA	Abteilung Virologie, UMG

Adapter	Sequenz (5' - 3') und Hersteller
5' RACE	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUU GCUGGCUUUGAUGAAA Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Durchführung:

Analog dem 3'-Ende muss zur vollständigen Transkription der 5'-UTR ebenfalls eine Adapterligation erfolgen, um den sonst durch *Primer-Annealing* erzeugten Teilverlust der Anfangssequenz zu vermeiden.

Zur Adapterligation an das 5'-Ende viraler RNA-Segmente wird hier aufgrund der in der Literatur beschriebenen Effizienzsteigerung bei Verwendung eines RNA-Adapters (5' RACE-Adapter) ein solcher verwendet (Maruyama und Sugano 1994).

Die T4-RNA-Ligase 1 katalysiert hierbei die Ligation des RNA-Adapters über dessen freie OH-Gruppe am 3'-Ende an den Monophosphatrest des 5'-Endes der Oropouche-RNA. Da jedoch die 5'-Enden des segmentierten RNA-Genoms möglicherweise polyphosphoryliert vorliegen, bedarf es zusätzlich einer Vorbehandlung viraler RNA, um aus Triphosphat-Enden Monophosphate zu generieren. Hierzu kommen zwei Enzyme (TAP und RNA 5' Polyphosphatase) in Betracht. Beide Enzyme sind imstande, das β - und γ -Phosphat als Pyrophosphat abzuspalten, wodurch letztendlich solitär das α -Phosphat als Monophosphat übrig bleibt.

Unter Verwendung des mitgelieferten Standardprotokolls zur Vorbehandlung viraler RNA mit TAP werden 25 pmol Oropouche-Virus-RNA in die Reaktion eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers bei 37°C für 90 Minuten inkubiert.

Im Rahmen der Vorbehandlung viraler RNA mit der RNA 5' Polyphosphatase wird ebenfalls gemäß dem mitgelieferten Standardprotokolls unter zusätzlicher Verwendung von 0,5 μ l RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor und den angegebenen Reaktionsbedingungen von 37°C für 30 Minuten verfahren (eingesetzte Menge Oropouche- Virus-RNA: 2 μ g).

Nach der Inkubation werden beide Ansätze unter Verwendung des *RNeasy-MinElute-Cleanup*-Reagenziensatzes der Firma Qiagen GmbH von Enzym- und Pufferrückständen gereinigt, um möglichen Störfaktoren bei der anschließenden Adapterligation vorzubeugen. Bei der Adapterligation an das vorbehandelte 5'-Ende wird im Folgenden

unter Verwendung von 500 ng des 5'-Race-Adapters analog der des 3'-Endes verfahren mit der Ausnahme, dass in diesem Fall ein Gesamtvolumen der Reaktion von 25 μ l angesetzt wird. Der Ligationsansatz wird bei 37°C für eine Stunde inkubiert und abermals einer Reinigung mittels des *RNeasy-MinElute-Cleanup*-Reagenziensatzes der Firma Qiagen GmbH unterzogen um möglichst eine reine Probe des Ligationsprodukts für Folgeexperimente zu gewinnen.

2.2.22 cDNA-Synthese

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Thermocycler TPersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml, steril)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
Desoxyribonukleosidtriphosphate als dNTP Mix 100 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien
Enzyme	Hersteller / Bezugsquelle
SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Primer	Sequenz (5' - 3') und Hersteller
OROV-M3_for	TATTGAACACAACGAAAGATGC Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
OROV-L_rev_5end	TTGCTCGAATGAAAATCTTA Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
OROV-S_rev_5end	GGCCTTTACCCAGATGC Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Random Hexamer Primer	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

RNA	Bezugsquelle / Hersteller
OROV-RNA	Abteilung Virologie, UMG

Durchführung:




Grundlage dieser Methode stellt die Reverse Transkription dar, bei der ausgehend von einem RNA-Strang ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird. Das hierfür benötigte Enzym ist die reverse Transkriptase, bei der es sich molekularbiologisch um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase handelt. Die meisten reversen Transkriptasen besitzen zusätzlich eine RNase-H-Aktivität zur posttranskriptionellen Degradierung der RNA-Matrize. Im Falle der verwendeten reversen Transkriptase SuperScript III ist jene Aktivität nicht vorhanden. Dies ist insbesondere bei der Synthese langer cDNA von Vorteil, da hierbei längere Reaktionszeiten notwendig sind, in denen eine frühzeitige Degradation des RNA-Templates durch eine aktive RNase H hinderlich wäre. Zudem zeichnet sie sich durch eine ausgeprägte Hitzestabilität aus. Im Verlauf der Synthese wird somit abhängig von einem RNA-Strang zunächst ein RNA-DNA-Hybridstrang generiert, wobei der RNA-Strang durch die fehlende RNase-H-Aktivität primär nicht degradiert wird und aus ihm am Ende ein einzelsträngiger, komplementärer cDNA-Strang (*copy*) entsteht. Native reverse Transkriptasen dagegen generieren pro RNA-Molekül nur ein DNA-Doppelstrang-Molekül.

Unter Verwendung von 125 ng RNA und 2 pmol sequenzspezifischem *Primer* wird nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers verfahren.

2.2.23 Immunfluoreszenzanalysen in Vero-Zellen

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Konfokales-Laser-Skanning-Mikroskop (Leica TCS SP2)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Deckgläser rund (12 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturplatten (6 Kavitäten, 12 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (24 Kavitäten)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

Objektträger	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland	
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung	
0,5% Triton X-100	250 µl Triton x-100 in 50 ml 1x PBS Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
1% FKS/PBS	1 ml FKS in 99 ml 1x PBS c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland	
Dulbecco´s PBS (1x)	100 ml PBS (10x) in 900 ml H ₂ O c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland	
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller	
FluorSafe-Reagent	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	
3,7 % Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	
Reagenssätze	Bezugsquelle / Hersteller	
Fugene HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	
Zelllinien	Bezugsquelle	
Vero E6	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland	
Plasmide	Bezugsquelle / Hersteller	
pI.18-FAMx 	Prof. Dr. Friedemann Weber, Universitätsklinikum Freiburg, Deutschland	
pI.18-OROV-NSs-Flag 	Abteilung Virologie, UMG	
pI.18-RVSV-NSs-ZF5 	Abteilung Virologie, UMG	

Im Folgenden werden zusammenfassend die während dieser Arbeit verwendeten Antikörper tabellarisch gemäß ihrer Klonalität, biologischen Herkunft, Verwendungszweck (Primär- oder Sekundärantikörper) und der Bezugsquelle dargestellt.

Antikörper	Beschreibung	Bezugsquelle / Hersteller
anti – Flag M2	Primärantikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

	Monoklonal Herkunft: Maus	
anti – Cdk 8	Primärantikörper Polyklonal gegen Cdk 8 Herkunft: Kaninchen	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti – MED 30 / TRAP 25	Primärantikörper Polyklonal gegen MED30/ TRAP 25 Herkunft: Kaninchen	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Cy3-konjugierter anti-Maus Antikörper	Sekundärantikörper Herkunft: Affe	Dianova, Hamburg, Deutschland
FITC-konjugierter anti- Kaninchen Antikörper	Sekundärantikörper Herkunft: Ziege	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Durchführung:

Bei Immunfluoreszenztests wird die Möglichkeit genutzt, mit spezifischen Antikörpern bestimmte subzelluläre Zielstrukturen sichtbar machen zu können. Die Methodik der Immunfluoreszenz lässt sich allgemein in direkte und indirekte Immunfluoreszenz untergliedern. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenz zum Einsatz kommt, wird nur diese im Folgenden beschrieben.

Der primäre Antikörper muss so gewählt werden, dass er an die zu detektierende Zielstruktur in der Zelle binden kann. Um den primären Antikörper sichtbar zu machen und damit das Vorhandensein der fraglichen Struktur nachzuweisen, wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist. An den sekundären Antikörper ist wiederum ein Fluorochrom gekoppelt, das unter Anregung durch Licht in einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Unter Verwendung eines Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskops kann diese Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Besonders bei Mehrfachfärbungen ist es von großer Bedeutung sicherzustellen, dass der jeweilige Sekundärantikörper ausschließlich an seinen entsprechenden Primärantikörper bindet und nicht mit anderen Antikörpern kreuzreagiert. Hierzu nutzt man den unterschiedlichen Herkunftsort der Primärantikörper (Maus, Kaninchen), denn von diesem hängt die Konformation des Fc-Teils des Primärantikörpers ab, gegen den sich dann spezifische Sekundärantikörper erzeugen lassen.

Für den Immunfluoreszenztest werden Vero-E6-Zellen verwendet, die mit der gewünschten Zelldichte von 1×10^5 Zellen pro Kavität auf Deckgläschen in einer 6-Kavitäten-Platte angezüchtet werden (siehe 2.2.3, S. 15). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ werden die Zellen mit 2 µg des zu transfizierenden Konstrukts pro Kavität mit Hilfe von FuGENE-HD-Transfektionsreagenz transfiziert (siehe 2.2.13, S. 29). An die Transfektion schließt sich wiederum eine Inkubation über 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ an. Zur Fixierung werden die Deckgläschen in eine 24-Kavitäten-Platte umgesetzt und mit 500 µl 3%igem Paraformaldehyd pro Kavität durch Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es folgen 3 Waschschrte mit 1x PBS. Damit der Primärantikörper in die Zellen gelangen kann, muss die Zellmembran permeabilisiert werden. Dazu werden die Deckgläschen in eine 12-Kavitäten-Platte umgesetzt mit 500 µl 0,5% Triton X-100 in 1x PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit 1% FKS/PBS gewaschen. Nun folgt die eigentliche Inkubation mit dem Primärantikörper, der zuvor in einem definierten Verhältnis in 1% FKS/PBS vorverdünnt und in einem Volumen von 40 µl auf die jeweiligen Deckgläschen pipettiert wird (Ansatz: Anti-Flag M2 1:200, Anti-Cdk 8 1:100, Anti-Med 30 1:100 in 40 µl pro Kavität). In einer feuchten Kammer werden die Deckgläschen mit dem Primärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wird durch dreimaliges Waschen mit 1% FKS/PBS entfernt, woran sich schließlich zum Sichtbarmachen die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (Ansatz: Antirabbit FITC 1:100, Antimouse Cy3 1:100 in 40 µl pro Kavität) für 1 Stunde bei Raumtemperatur anschließt. Nach erneutem Waschvorgang werden die Deckgläschen aus der 12-Kavitäten-Platte entnommen, in Bideist eingetaucht, vorsichtig alle Flüssigkeitsreste entfernt und mit *Fluorsafe* auf einen Objektträger eingebettet. Zum Trocknen und bis zur weiteren Verwendung werden die Präparate unter Lichtabschluss bei 4°C gelagert.

2.2.24 Bestimmung des Virustiters (TCID₅₀) in mit IFN-α vorbehandelten, OROV-infizierten Zellen

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Mehrkanalpipette (20-200 µl)	CAPP, Odense, Dänemark

Mikroskop	Nikon Instruments Europe B.V, Amstelveen, Niederlande
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
Gewebekulturflaschen mit Filter (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (96 Kavitäten)	NUNC, Roskilde, Dänemark
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), 500 ml	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Humanes IFN Alpha	Pestka Biomedical Laboratories, New Jersey, Vereinigte Staaten
5 % Trichloressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<u>Kristallviolett-Lösung:</u>	
1 % Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3,6 % Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
1 % Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
20 % Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zelllinien	Bezugsquelle
Vero E6	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland
HEK 293	Microbix Biosystems Inc., Mississauga, Kanada
Viren	Bezugsquelle / Hersteller
Oropouche-Virus	Abteilung Virologie, UMG

Durchführung:

Der Kultur-infektiöse-Dosis-50%-Test (*tissue-culture infectious dose 50 %*) stellt eine Möglichkeit dar, Virustiter zu bestimmen.

Zu diesem Zweck werden in eine 96-Kavitäten-Platte 1×10^4 Vero-E6-Zellen in 150 µl DMEM pro Kavität ausgesät und für 24 Std. bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert (siehe 2.2.3, S. 15). Mit den gewonnenen Virusüberständen werden serielle Verdünnungsreihen

beginnend mit einer Verdünnungsstufe von 10^1 bis 10^{11} in 1:10 Verdünnungsschritten mit dem Medium DMEM angefertigt und diese in einem 4-fachen Parallelansatz auf die in einer 96-Kavitäten-Platte kultivierten Zellen gegeben. Zusätzlich wird als Negativkontrolle eine Spalte der Vero E6-Zellen nicht infiziert (Mock). Nach fünftägiger Inkubation werden die infizierten Zellen im Vergleich zu den Mock-infizierten Zellen hinsichtlich des CPEs (zytopathischer Effekt) unter dem Mikroskop beurteilt. Zur Erleichterung der Unterscheidung zwischen CPE und unbeschädigtem Zellrasen werden die Zellen zusätzlich fixiert und gefärbt. Hierzu wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 200 μ l 5 % Trichloressigsäure je Kavität für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Zellen einmal mit 200 μ l Wasser je Kavität gewaschen. Zur Färbung werden 200 μ l Kristallviolettlösung je Kavität zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Farbstoff entfernt und die gefärbten Zellen dreimal mit Wasser gewaschen. Abschließend lässt man die fixierten und gefärbten Zellen vollständig trocknen. Liegt nun bei 50 % der Kavitäten einer Verdünnungsstufe ein zytopathischer Effekt vor, kann man vom Erreichen der Kultur-infektiösen-Dosis-50% für diese Virusverdünnung sprechen. In der Praxis treten oft Abweichungen von dieser 50%-Regel auf, die bei der Berechnung des Virustiters berücksichtigt wird (siehe unten stehende Formel).

Sonderfall: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit interessiert insbesondere der möglicherweise protektive Effekt einer IFN- α -Vorbehandlung der zu infizierenden Zellen. Zu diesem Zwecke werden HEK-293-Zellen in einem Dreifachansatz in jeweils einer 25-cm²-Gewebekulturflasche mit einer Dichte von 5×10^5 ausgesät (siehe 2.2.3, S. 15), 24 Stunden nach Aussaat, mit Erreichen der zellulären Konfluenz mit 0 U (Negativkontrolle), 1000 U bzw. 5000 U IFN- α pro 25-cm²-Zellkulturflasche vorbehandelt und anschließend mit der MOI 1 (*multiplicity of infection*), d.h. gleicher Menge an Viruspartikeln wie Zellen infiziert.

Zur Ermittlung der TCID₅₀ wird die höchste Verdünnungsstufe aus allen vier Parallelansätzen, bei welcher noch mikroskopisch ein zytopathischer Effekt nachweisbar ist, ermittelt, deren Mittelwert berechnet und mit Hilfe der Formel von Spearman und Kärber der Virustiter errechnet:

$$\begin{aligned} \text{Formel: } \log_{\text{TCID}_{50}} &= \log D - ((\log D_0)/2) + \log D_0 \times (\sum(n/p)) \\ &= \log D + \log D_0 \times (\sum(n/p)) - (\log D_0/2) \\ \text{TCID}_{50} &= D \times (D_0 \times 10^{\sum(n/p)}) / (D_0 \times 10^{1/2}) \end{aligned}$$

$$= D \times 10^{\sum(n/p)} / 10^{1/2}$$

$$= D \times 10^{\sum(n/p)-1/2}$$

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = (D \times 10^{\sum(n/p)-1/2}) / V$$

D = Verdünnungsfaktor

D₀ = Verdünnungsintervall

n = Anzahl der Kavitäten mit sichtbarem CPE in der Zellkulturplatte

p = Anzahl der Parallelbestimmungen auf der Zellkulturplatte

$\sum(n/p)$ = Summe der n/p-Quotienten beginnend mit der letzten Verdünnungsstufe mit n/p = 1 und endend mit der letzten Verdünnungsstufe mit n/p > 0

V = eingesetztes Volumen in ml

2.2.25 Sequenzierung

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
PCR-Kabinett	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml, steril)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Nachfolgend werden alle zur Sequenzierung verwendeten *Primer* (Bezugsquelle: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) tabellarisch aufgeführt, wobei die erste der beiden Tabellen diejenigen Sequenzierungs-*Primer* enthält, deren Sequenz auf Abschnitten der entsprechend verwendeten Vektoren in der Nähe der Insertionsstelle basieren und somit unabhängig von der eigentlichen *Insert*-Sequenz sind.

<i>Primer</i>	Sequenz (5' - 3')	Zugehöriger Vektor
M 13-20_for 1	GTAAAACGACGGCCAG	pCRII
M 13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	pCRII
pI.18 for	TCCATGGGTCTTTTCTGCAG	pI.18
pI.18 rev	CAGGCGTGACACGTTTATTG	pI.18
T7_forward_short	TAATACGACTCACTATAG	pT7-ribo-SM2 / pTM1
T7_rev	TATGCTAGTTATTGCTCAG	pT7-ribo-SM2 / pTM1

Im Falle der Sequenzierung eines DNA-Fragments, das größer als 1 kb ist, muss jenes in Etappen sequenziert werden, da man mit Hilfe der verwendeten Sequenzierungsmethode nach Sanger nur maximal 1 kb große DNA-Stränge fehlerfrei sequenzieren kann. Zur Sequenzierung des > 6 kb großen L-Proteins des Oropouche-Virus werden daher zusätzlich folgende *Primer* mit *Insert*-spezifischen Sequenzen eingesetzt.

Primer	Sequenz (5' - 3')
OROV-L_PW for1	AGCAGTTTCCAGCCATGTAAGAGA
OROV-L_PW for2	CATGCATTAAGATTGGTGATTTTG
OROV-L_PW rev1	TTCGTTTGTCTTGTCCATCATCTGC
OROV-L_PW rev2	TCCAGTGATTTAGAGCGATAGATA
OROV-L1_rev	TCATTGATGCATTGCCAGTATTTAGT
OROV-L2_for	AGATAAGATTGGAAACTACCTA
OROV-L2_rev	TATTCGCGACATCTCTACTGG
OROV-L3_for	TTGCATGGGTATCTATCGCTCTAA
OROV-L3_rev	ATCAATTTGTCATCTTCCCCAGTG
OROV-L4_for	TGCCATACAAAGTTTTTCACATCAA
OROV-L4_rev mut	TGAAAATGTGCTCGTCTCGTGATGG
OROV-L5_for mut	GCCATCACGAGACGAGCACATTTT
OROV-Smut-F1_for	GGGGGAAACGCCTGGTAT

Durchführung:

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger, bei der mittels radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphate die Nukleotidsequenz von DNA ermittelt wird. Ausgehend von einem Oligonukleotid bekannter Sequenz, welches als *Primer* fungiert, katalysiert eine spezifische DNA-Polymerase die Neusynthese eines komplementären Tochterstranges.

Dem *Cycle Sequencing* liegt ein ähnlicher Mechanismus zugrunde wie der PCR, da auch hier mit einer thermostabilen DNA-Polymerase gearbeitet wird. Weitere Reaktionskomponenten sind der Reaktionspuffer, *Primer*, Nukleotide und die zu sequenzierende DNA. Außer den in einer PCR verwendeten dNTPs sind zusätzlich Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs) enthalten. Diese bewirken nach ihrem Einbau den

Abbruch der Strangsynthese. Da der Zufall entscheidet, wann ein ddNTP statt eines dNTPs eingebaut wird, entstehen unterschiedliche Fragmente, die jeweils mit der *Primer*-Sequenz 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.

Gemäß dem unten aufgeführten Protokoll werden von jeder Probe jeweils zwei Ansätze zum Sequenzieren vorbereitet. Jeder Ansatz enthält einen *Primer*, der an das 5'-Ende eines der beiden DNA-Stränge der zu sequenzierenden DNA bindet. Die Sequenzierung beider DNA-Stränge erlaubt die Unterscheidung von Sequenzierfehlern (Abweichung an einer Position nur in der Sequenz einer der beiden Stränge) und Mutationen (Abweichung an derselben Position in beiden Strängen). Durchgeführt wird die Sequenzierung von der Firma SeqLab-Sequence Laboratories GmbH in Göttingen.

Standardprotokoll zur Vorbereitung einer Probe:

600 ng DNA

2 μ l *Primer* (10 pmol/ μ l)

x μ l Bidest

7 μ l Gesamtvolumen

2.2.26 Das Minireplikon-System

Das Minireplikon-System stellt ein wichtiges Instrument sowohl für die Aufschlüsselung viraler Transkriptionsvorgänge als auch für die Charakterisierung viraler Pathogenitätsmechanismen in virusfreien Bedingungen dar. Für einige Vertreter der Bunyaviren, wie beispielsweise für das Bunyamwera-Virus (Weber et al. 2001) oder das Rift-Valley-Fever-Virus (Habjan et al. 2008), wurden bereits erfolgreich Minireplikon-Systeme bzw. Reverse-Genetik-Systeme etabliert.

Beim Minireplikon-System handelt es sich um ein Plasmid-basiertes System, das sich aus mindestens drei Expressionsplasmiden zusammensetzt, die unter Kontrolle verschiedener Promotoren (abhängig vom gewählten System) für essentielle Bestandteile der viralen Replikation/Transkription kodieren (virale RNA-Polymerase, Nukleoprotein und „virales Genom“ mit den flankierenden UTR). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit einem T7-Polymerase-abhängigen System gearbeitet.

Das Minigenom-Expressionsplasmid, das unter Kontrolle des T7-Polymerase-Promotors transkribiert wird, simuliert das virale Genom, wobei ein virales Gen durch ein in genomischer Orientierung in das Plasmid kloniertes Reporter-gen (hier: Renilla-Luciferase) ersetzt wird. Flankiert wird das Reporter-gen durch die regulatorischen, viralen 3'- und 5'-nichtkodierenden Enden des M-Segments, die im natürlichen viralen Replikationszyklus als Promotorregion bzw. Replikationsstartpunkt für die virale RNA-Polymerase fungieren (siehe 1.1.4, S. 3). Die Menge des translatierten Reporter-gens korreliert direkt mit der Transkriptionsaktivität der viralen Polymerase. Die beiden anderen Expressionsplasmide beinhalten, ebenfalls T7-Promotor-abhängig, jedoch in antigenomischer Orientierung in die Expressionsplasmide kloniert, die Nukleotidsequenz der Virus-Polymerase (OROV-L) und des viralen Nukleoproteins (OROV-N).

Alle drei Plasmide werden simultan in eine T7-Polymerase-exprimierende Zelllinie (in dieser Arbeit: BSR-T7) transfiziert, durch welche die T7-Promotor-abhängigen Expressionsplasmide transkribiert werden. Während aus denen in antigenomischer Orientierung vorliegenden Sequenzen für das OROV-L-Protein und das OROV-N-Protein nach Transkription jeweils eine positivsträngige mRNA entsteht und diese durch die Zelle problemlos und konstitutiv T7-Promotor-abhängig in die OROV-Polymerase bzw. in das OROV-Nukleoprotein translatiert werden kann, liegt das Minigenom nach zellulärer Transkription durch die T7-Polymerase als einzelsträngige RNA mit negativer Polarität vor, die durch Enzyme des zellulären Translationsapparats nicht translatiert werden kann. Erst die Transkription dieser negativsträngigen Minigenom-RNA durch die bereits translatierte Oropouche-Polymerase zusammen mit dem OROV-Nukleoprotein unter Bildung eines RNP-Komplexes in positivsträngige mRNA ermöglicht die Translation des Minigenom-Reporter-Gens (hier: Renilla Luciferase).

Das Reporterprotein kann nun im Zelllysate (nach Zugabe von Substrat) anhand des Substratumsatzes quantifiziert werden und ermöglicht so eine Aussage über die virale Transkriptions- bzw. Replikationsaktivität durch die direkte Korrelation zwischen produzierter Renilla-Luciferase und Transkriptionsaktivität der rekombinanten Virusbestandteile.

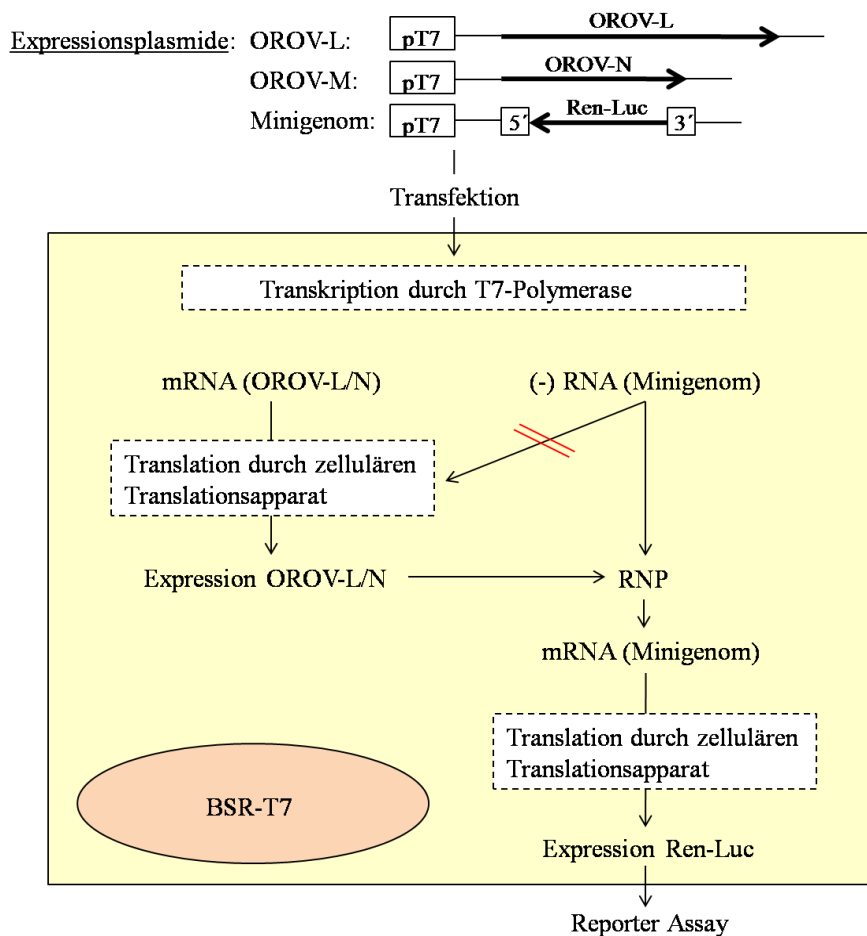


Abbildung 6: Aufbau und Prinzip des plasmidbasierten, T7-Polymerase-abhängigen OROV-Minireplikon-Systems: Alle drei Expressionsplasmide werden intrazellulär durch die innerhalb der BSR-T7-Zellen kontinuierlich exprimierte T7-Polymerase transkribiert. Aufgrund der antigenomischen Orientierung der viralen Proteine OROV-L und -M innerhalb ihrer Expressionsplasmide, entsprechen deren Transkripte positivsträngiger mRNA, die problemlos durch den zellulären Translationsapparat translatiert und exprimiert werden kann. Im Gegensatz dazu liegt das Minigenom innerhalb seines Expressionsplasmids in genomischer Orientierung vor, woraus nach zellulärer Transkription eine negativsträngige RNA entsteht, die durch den zellulären Translationsapparat nicht translatiert werden kann. In einem Zwischenschritt muss daher das negativsträngige Minigenom-RNA durch die bereits translatierten viralen Proteine OROV-L und -M unter Bildung eines RNP-Komplexes in positivsträngige, translatierbare mRNA umgeschrieben werden.

2.2.27 Dual-Luciferase-Reporter-Assay und Minireplikon-System-Kinetikmessungen

Materialien:

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
FLUOstar Optima Microplate Fluorometer mit FLUOstar Reader Control and Data Analysis Software	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle / Hersteller

Lumitrac 200 96-Kavitäten-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6 Kavitäten, 12 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Medien, Lösungen	Hersteller und Zusammensetzung
10x PBS	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
1x PLB	10 ml PLB (5x) in 40 ml H ₂ O Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
Reagenziensätze	Bezugsquelle / Hersteller
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
Reporterplasmide	Beschreibung
p125-Luc (Takashi Fujita, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan)	Vektor enthält das Firefly-Luciferase-Reporter-Gen, das unter Kontrolle des induktiv aktiven IFN- β Promotors exprimiert wird
pI.18-RL (Abteilung Virologie, UMG)	Vektor enthält das Renilla-Luciferase-Reporter-Gen, das unter Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors exprimiert wird. $\boxed{P_{CMV}}$ - $\boxed{Ren-Luc}$ - $\boxed{pA_{CMV}}$
pTM1-FF-Luc (Prof. Dr. Friedemann Weber, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Deutschland)	Vektor enthält das Firefly-Luciferase-Reporter-Gen, das unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird $\boxed{P_{T7}}$ - \boxed{IRES} - $\boxed{FF-Luc}$ - \boxed{pA}
pT7-ribo-SM2-LACV-vM (Prof. Dr. Friedemann Weber, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Deutschland)	Vektor enthält das LACV-Minigenom = Renilla-Luciferase-Gen, flankiert durch die 3'-5'UTRs des LACV-M-Segments, das unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird $\boxed{P_{T7}}$ - $\boxed{LACV-cMpro}$ - $\boxed{vRenLuc}$ - $\boxed{T_{T7}}$ - $\boxed{H\delta rib}$
pT7-ribo-SM2-OROV-vMpro-vRL (Abteilung Virologie, UMG)	Vektor enthält das OROV-Minigenom = Renilla-Luciferase-Gen, flankiert durch die 3' und 5'UTRs des OROV-M-Segments, das unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird $\boxed{P_{T7}}$ - $\boxed{OROV-cMpro}$ - $\boxed{vRenLuc}$ - $\boxed{T_{T7}}$ - $\boxed{H\delta rib}$
pT7-ribo-SM2-OROV-vMproNEW-vRL*	Vektor enthält das OROV-Minigenom = Renilla-Luciferase-Gen, flankiert durch die korrigierten 3' und

(Diese Arbeit)

5'UTRs des OROV-M-Segments, das unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird

P _{T7}	OROV-cMproNEW	vRenLuc	T _{T7}	Hδrib
-----------------	---------------	---------	-----------------	-------

Durchführung:

Anhand der Expression von Reportergenen lässt sich die Aktivität eines spezifischen Promotors messen bzw. eine Kinetik des Minireplikonsystems erstellen. Als Reportergene werden Gene bezeichnet, die für Enzyme kodieren, deren enzymatische Aktivität leicht quantifiziert werden kann. In diesem Fall werden die beiden Enzyme Firefly-Luciferase (aus *Photinus pyralis*) und Renilla-Luciferase (aus *Renilla reniformis*) verwendet. Bei einem *Dual Luciferase Reporter Assay* können beide Reportergene in einem Testansatz kombiniert werden. Die Bedingung für die Kombination stellt die unterschiedliche Abstammung der Luciferasen aus verschiedenen Organismen, sowie die Verstoffwechslung unterschiedlicher Substrate dar.

Im Rahmen des *Dual-Luciferase-Reporter-Assay-Systems* wird die cDNA der Firefly-Luciferase (FF-Luc) in einem Plasmid dem zu messenden Promotor nachgeschaltet und so nach transienter Transfektion von eukaryontischen Zellen in Abhängigkeit von der Aktivität des Promotors exprimiert. In einem weiteren, kotransfizierten Plasmid befindet sich die cDNA der Renilla-Luciferase (Ren-Luc), die unter der Kontrolle eines konstitutiv-aktiven Promotors steht. Nach Lyse der transfizierten Zellen und Zugabe des Firefly-Luciferase-Substrats kann die Luciferaseaktivität mittels eines Luminometers gemessen werden, da bei Substratumsatz Licht entsteht. Aufgrund der promotorabhängigen Expression der Firefly-Luciferase entspricht die Luciferaseaktivität der Lichtemission und aufgrund der Proportionalität beider Aktivitäten, kann auf die spezifische Aktivität des Promotors rückgeschlossen werden. Nach demselben Prinzip wird die Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen. Jene gilt allerdings als Produkt kontinuierlicher Expression als ein Maß für die Transfektionseffizienz bzw. die Viabilität der transfizierten Zellen.

Im Falle des Minireplikonsystems (vgl. 2.2.26, S. 51) wird die FF-Luc unter Kontrolle eines T7-Polymerase-abhängigen Promotors exprimiert und dient so innerhalb T7-Polymerase produzierenden Zellen als interne Transfektionskontrolle. Die Ren-Luc-cDNA fungiert in diesem speziellen Falle als kodierende Sequenz eines viralen Minigenoms (= Reporter-cDNA in genomischer Orientierung mit flankierenden viralen untranslatierten Regionen). Die Renilla-Luciferase-Aktivität gibt im Minireplikon-System Aufschluss über

die Effizienz der viralen Transkription/Replikation. Für diese Methodik werden in einer 12-Kavitätenplatte gemäß Kapitel 2.2.3 Zellen der gewünschten Zelllinie ausgesät, mit den notwendigen Plasmiden transfiziert und inkubiert (siehe 2.2.13). Für die eigentliche Lumineszenzmessung müssen die ausgesäten Zellen zuerst mit 100 µl 1x PLB pro Kavität lysiert werden. Anschließend wird der Reagenziensatz *Dual Luciferase Reporter Assay System* gemäß den Angaben des Herstellers Promega GmbH verwendet.

2.2.28 Statistik

Materialien:

Computerprogramme	Bezugsquelle / Hersteller
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten

Durchführung:

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden mehrere, unabhängige Versuchsreihen gemäß dem beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt. Innerhalb jeder Versuchsreihe wurden die erhaltenen Rohdaten auf den jeweiligen Mock-Wert normiert. Die Firefly-Luciferase-Aktivität wurde ihrerseits wieder zur Renilla-Luciferase-Aktivität, die als Maß für die jeweilige, untereinander variierende Transfektionseffizienz pro Kavität gilt, ins Verhältnis gesetzt. Damit wurden der Einfluss von Schwankungen innerhalb der Kavitäten durch unterschiedliche Transfektionseffizienz, schwankende Ausgangszellzahl oder Zytotoxizität der Stimulanzien aufgehoben und die Vergleichbarkeit der gemessenen Firefly-Aktivitäten hergestellt. Aus allen so ermittelten Endwerten der Versuchsreihen wurde der Mittelwert errechnet und anhand eines Zweistichproben-t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen analysiert. Als statistisch signifikant werden Unterschiede zwischen Messwerten mit p-Werten $\leq 0,05$ gewertet.

Sonderfall Minireplikonsystem: Hier wurde analog verfahren, mit dem Unterschied, dass die Rohdaten in diesem System auf einen ausgewählten Wert normiert wurden und die FF-Luciferase-Aktivität hierbei als Maß für die Kavitäten-individuelle Transfektionseffizienz steht.

3 Ergebnisse

3.1 Interferon-Antagonismus des Oropouche-Virus

3.1.1 Struktureller Aufbau des 5'-Endes der Genomsegmente des Oropouche-Virus

Für alle Orthobunyaviren mit bekannten Genom-Sequenzen ist für das S-Segment die Existenz eines zweiten ORFs, der innerhalb des Nukleoprotein-ORFs liegt, beschrieben. Dieser ORF kodiert für ein Nichtstrukturprotein, das die Induktion von IFN- β inhibiert und somit die Etablierung eines antiviralen Zustandes verhindert. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass Orthobunyaviren strukturelle Eigenschaften besitzen, die von der infizierten Zelle als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkannt werden und zu einer Aktivierung der angeborenen Immunität führen können. Bei vielen RNA-Viren stellt das virale Genom selbst ein PAMP dar, da viralen genomischen RNAs oftmals Modifikationen fehlen, die für zelluläre RNAs charakteristisch sind. So besitzt beispielsweise das RNA-Genom von VSV am 5'-Ende einen unmodifizierten Triphosphatrest, während bei zellulären mRNAs dieser Triphosphatrest mit einem m7G-Cap versehen ist (Elliott und Weber 2009).

Um zu klären, ob die OROV-RNA-Genomsegmente IFN-induzierende Triphosphatreste am 5'-Ende tragen, wurde im Folgenden die molekulare Struktur der 5'-Enden der RNA-Segmente und deren potenzielle, induktive Eigenschaften analysiert.

Hierzu wurden HEK-293-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen pro Kavität in 12-Kavitäten-Platten ausgesät (siehe 2.2.3, S. 15) und mit den beiden Reporterkonstrukten pI.18-RenLuc (0,0125 $\mu\text{g}/\text{Kavität}$) und p125-Luc (0,25 $\mu\text{g}/\text{Kavität}$) transfiziert (siehe 2.2.13, S. 29, Lipofectamine 2000). Hierbei fungiert die Expression der Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des induzierbaren Interferon- β -Promotors als indirektes Maß für die IFN- β -Promotoraktivität, während die Expression der Renilla-Luciferase einem konstitutiv aktiven CMV-Promotor unterliegt und somit ein indirektes Maß für die Transfektionseffizienz darstellt.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Stimulation der Zellen mit jeweils 2 $\mu\text{g}/\text{Kavität}$ verschiedener viraler RNA-Typen (VSV-RNA, OROV-RNA gewonnen aus IFNAR^{-/-}, BHK- und Vero-E6-Zelllysaten). Zur Kontrolle wurde eine

Kavität mit 2 µg Gesamt-RNA aus nicht infizierten Vero-E6-Zellen transfiziert und eine unstimuliert belassen (Negativkontrolle). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Ansätze lysiert und wie unter Punkt 2.2.27 (S. 53) beschrieben, vermessen und ausgewertet (siehe 2.2.28, S. 56).

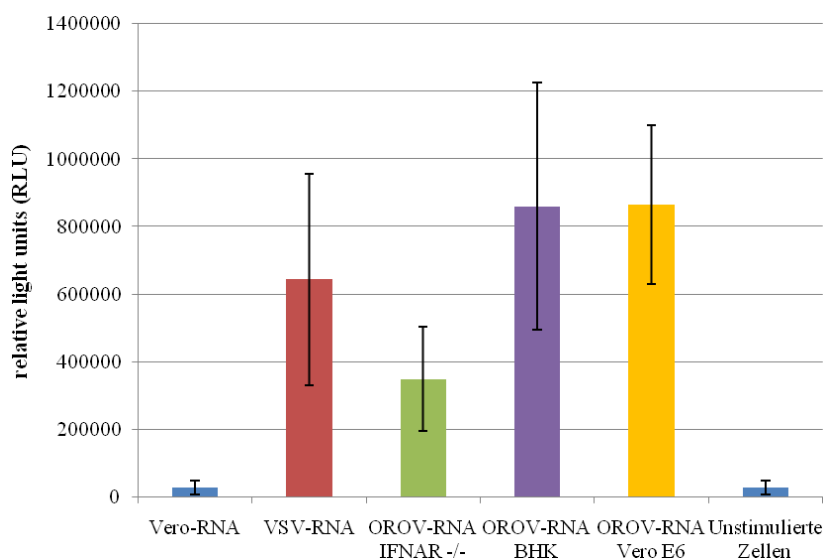


Abbildung 7: Dual Luciferase Reporter Assay zur Charakterisierung des aktivierenden Potentials der OROV-RNA auf den Interferon-β-Promotor: Als Negativkontrolle dienen sowohl die zelleigene Vero-RNA als auch unstimulierte Zellen. Als Positivkontrolle wird VSV-RNA mit gesichertem aktivierendem Potential auf den Interferon-β-Promotor eingesetzt. Im Vergleich zu Vero-RNA zeigt die Transfektion von OROV-RNA unabhängig ihres Zellursprungs einen signifikanten Aktivitätsanstieg des IFN-β-Promotors (Aktivitätsanstieg OROV-RNA im Vgl. zu Vero-RNA/unbehandelten Zellen in IFNAR $p=0,024$, in BHK $p=0,020$, in Vero E6 $p=0,006$). Dargestellt sind die Mittelwerte vier unabhängiger Experimente.

Die so generierten Mittelwerte für die Firefly-Luciferase-Aktivität zeigen sowohl im Falle der Positivkontrolle (VSV-RNA) verglichen mit der Vero-RNA-Stimulation bzw. mit unstimulierten Zellen (jeweils $p=0,029$) als auch bei der Verwendung von OROV-RNA unterschiedlichen Zellursprungs als Stimulanz im Vergleich zur Stimulation mit Vero-RNA (= zelluläre RNA, $p_{\text{IFNAR-/-}}=0,024$, $p_{\text{BHK}}=0,020$, $p_{\text{Vero E6}}=0,006$) bzw. mit unstimulierten Zellen ($p_{\text{IFNAR-/-}}=0,024$, $p_{\text{BHK}}=0,020$, $p_{\text{Vero E6}}=0,006$) eine signifikante Aktivitätszunahme des Interferon-β-Promotors (siehe Abbildung 7).

In einem zweiten, sehr ähnlichen Experiment sollte nun eine mögliche Rolle von unmodifizierten 5'-Triphosphatresten bei der IFN-β-Promotor-Aktivierung durch OROV-RNA untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde bei analogem Versuchsaufbau im 24-Kavitäten-Format (Konzentration der Reporter-Plasmide: pI.18-RenLuc 0,0063 µg/Kavität, p125-Luc 0,13 µg/Kavität) neben der nativen OROV-RNA als Positivkontrolle, OROV-RNA (1 µg/Kavität) transfiziert, die mit verschiedenen Enzymen vorbehandelt wurde,

welche die Abspaltung eines Triphosphats (rAPID Alkaline-Phosphatase) bzw. eines Pyrophosphatrests (TAP, RNA-5' Polyphosphatase) katalysieren (siehe 2.2.7, S. 20, 2.2.21.2, S. 40).

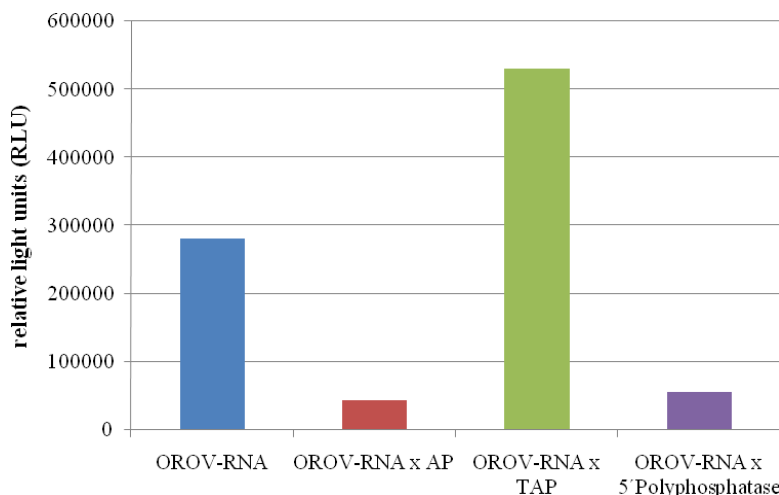


Abbildung 8: Dual Luciferase Reporter Assay zur Charakterisierung des induktiven Potentials zuvor dephosphorylierter OROV-5'-Enden auf den Interferon- β -Promotor: Im Vergleich zur Induktion des Interferon- β -Promotors mit unbehandelter OROV-RNA auf 281483 RLUs zeigt sich eine deutliche, 5-7-fach reduzierte Aktivität des IFN-Promotors bei Verwendung von mit AP bzw. 5' Polyphosphatase dephosphorylierter OROV-RNA (mit AP: 43248 RLUs, mit 5' Polyphosphatase: 55565 RLUs). Die Dephosphorylierung mit der TAP erzielt allerdings keine Reduktion der Aktivität des Interferonpromotors.

Durch die vorherige Dephosphorylierung bzw. Abspaltung eines Pyrophosphats zeigte sich im Vergleich zur Positivkontrolle eine 5-7-fach niedrigere Aktivierung des Interferon- β -Promotors nach Stimulation mit enzymatisch-vorbehandelter RNA (siehe Abbildung 8). Zudem ergab sich für Folgeexperimente eine interessante methodische Beobachtung: Obwohl beiden Enzymen (TAP und RNA-5' Polyphosphatase) die gleiche Pyrophosphat-abspaltende, katalytische Aktivität zugesprochen wird, konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass lediglich durch Behandlung mit der RNA-5' Polyphosphatase eine signifikante Reduktion der IFN- β -Promotor-Induktion verzeichnet werden konnte.

3.1.2 IFN-Sensitivität des OROV

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das virale NSs-Protein des OROV die Polymerase-II-vermittelte Transkription über einen bis jetzt unbekanntem intrazellulären Signalweg hemmt. Folge der Suppression ist u.a. die fehlende Induktion der Typ-I-Interferone. Allerdings konnte derzeit noch nicht gezeigt werden, dass die beschriebene interferonantagonistische Wirkung tatsächlich das spezifische Ziel der generalisierten

Minderung der RNA-Polymerase-II-vermittelten Transkription darstellt. Ein Indiz für diese Annahme wäre der Nachweis, dass Typ-I-Interferone in der Lage sind, die OROV-Replikation zu hemmen.

Zu diesem Zweck wurde, wie unter Punkt 2.2.24 (S. 46) beschrieben, der OROV-Titer von Zellkulturüberständen von mit unterschiedlichen IFN- α -Konzentrationen (0 U, 1000 U, 5000 U) vorbehandelten sowie OROV-infizierten HEK-293-Zellen bestimmt (siehe 2.2.24, S. 46 Sonderfall). Zur Verifizierung des Ergebnisses wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Virustiter jeweils in einem vierfachen Ansatz mittels TCID₅₀ (siehe 2.2.24, S. 46) ermittelt. Zudem wurde der Zustand der OROV-infizierten Zellen 72 h nach Infektion mikroskopisch untersucht.

Es konnte ein deutlicher Unterschied im Bezug auf Vitalität und Integrität des Zellverbandes zwischen IFN- α -vorbehandelten und unbehandelten Zellen nach Oropouche-Virus-Infektion beobachtet werden. Während bei den unbehandelten Zellen aufgrund der Virusinfektion die Konfluenz und Integrität des Zellrasens beeinträchtigt und damit ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) sichtbar war, war bei den mit 1000 U IFN- α vorbehandelten HEK-293-Zellen der CPE vermindert. Nach Vorbehandlung mit 5000 U IFN- α blieb der Zellrasen trotz Oropouche-Virus-Infektion vollständig intakt (siehe Abbildung 9).

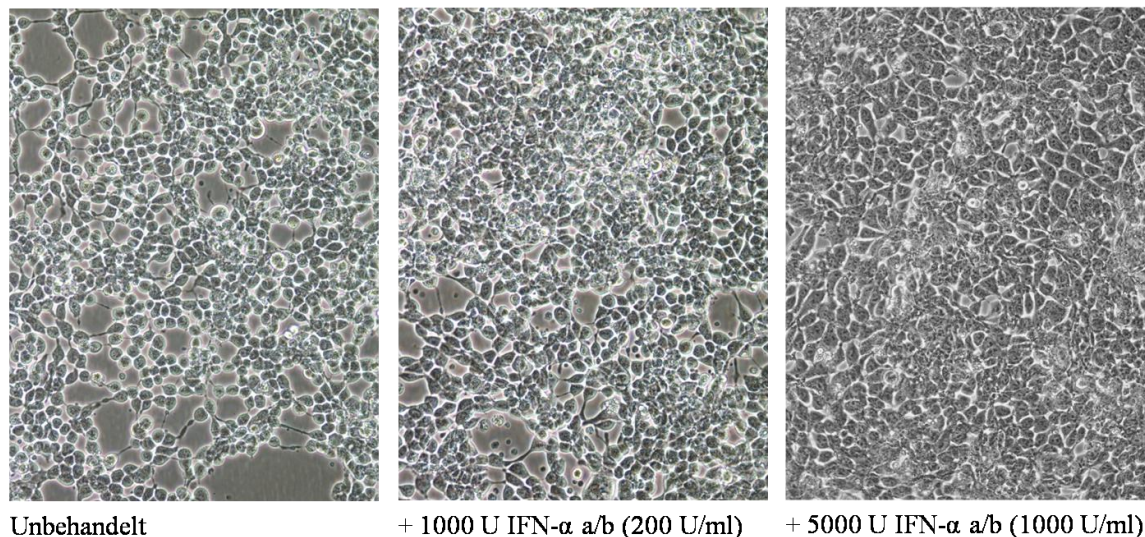


Abbildung 9: Mikroskopisches Bild OROV-infizierter HEK-293-Zellen mit und ohne IFN- α -Vorbehandlung: Unbehandelte, infizierte HEK-293-Zellen zeigten eindeutig einen Verlust der Integrität und Vitalität, während mit zunehmender IFN- α -a/b-Konzentration die Integrität und Vitalität der infizierten Zellen erhalten werden konnte.

Der mikroskopische Eindruck im Bezug auf die Vitalität der infizierten Zellen fand auch in der Höhe der Virustiter der drei Versuchsansätze sein Korrelat.

Während bei den Zellüberständen nicht IFN- α -vorbehandelter HEK-293-Zellen Virustiter im Bereich von ca. 2×10^{11} TCID₅₀/ml erreicht wurden, zeigten die Überstände der mit 1000 U IFN- α vorbehandelten Zellen mit einem Titer von ca. 2×10^{10} TCID₅₀/ml eine leichte Reduktion von ca. 1 log-Stufe. Dagegen war bei den Überständen der unbehandelten (ca. 2×10^{11} TCID₅₀/ml) und mit 5000 U IFN- α -vorbehandelten Zellen (ca. 3×10^6 TCID₅₀/ml) ein Titerunterschied von ungefähr 5 log-Stufen zu beobachten.

3.1.3 Potenzielle Interaktion von Komponenten des RNA-Polymerase-II-Transkriptionskomplexes mit dem OROV-NSs

Während für einige enge Verwandte des Oropouche-Virus die intrazellulären Interaktionspartner für das virale NSs-Protein und damit ihr zellulärer Pathogenitätsmechanismus aufgedeckt wurden, ist für das OROV-NSs noch kein zellulärer Interaktionspartner bekannt, der für die Hemmung der Polymerase-II-abhängigen Transkription nach OROV-Infektion verantwortlich ist.

Unter Berücksichtigung der Verwandtschaft des OROV zum Bunyamwera-Virus und vor dem Hintergrund, dass für dieses Virus bereits Bestandteile des Mediatorkomplexes, die MED-8-Untereinheit als Zielmoleküle für das virale NSs-Protein identifiziert wurden (Leonard et al. 2006), sollten im Rahmen des folgenden Immunfluoreszenztests mit OROV-NSs transfizierten Vero-E6-Zellen analog Bestandteile des Mediatorkomplexes (Cdk8 und MED 30) als mögliche Interaktionspartner des OROV-NSs-Proteins getestet werden.

Die Immunfluoreszenzanalyse wurde wie unter Punkt 2.2.23 (S. 43) detailliert beschrieben, durchgeführt. Insgesamt wurden sechs Ansätze mit unterschiedlichen Konstrukten und Primärantikörpern erstellt:

	<u>Verwendetes Konstrukt</u>	<u>Primärantikörper</u>
I.	pI.18-OROV-NSs-Flag	Anti-Flag M2, Anti-Cdk 8
II.	pI.18-OROV-NSs-Flag	Anti-Flag M2, Anti-MED 30
III.	pI.18-FAMx	Anti-Flag M2, Anti-Cdk 8
IV.	pI.18-FAMx	Anti-Flag M2, Anti-MED 30
V.	pI.18-RVfV-NSs-ZF 5	Anti-Flag M2, Anti-Cdk 8
VI.	pI.18-RVfV-NSs-ZF 5	Anti-Flag M2, Anti-MED 30

Als Sekundärantikörper wurden in allen sechs Ansätzen Anti-Kaninchen-FITC und Anti-Maus-Cy3 verwendet.

Durch die Farbe rot werden im Folgenden stets die markierten viralen Nichtstrukturproteine bzw. die Negativkontrolle FAMx repräsentiert, wohingegen sich die unterschiedlichen Komponenten des Mediator Komplexes (Cdk 8, MED 30) als grünes Fluoreszenzsignal darstellten.

Aufgrund der starken Selbstinhibition der RNA-Polymerase-II-abhängigen Expression des viralen NSs-Proteins war nur in relativ wenigen Zellen das NSs-Protein nachweisbar. In diesen war jenes weitgehend im Kern lokalisiert, wobei teilweise eine Konzentration in subnukleären Strukturen zu beobachten war (siehe Abbildung 10 IB, IIB, S. 63). Auch die beiden untersuchten Untereinheiten des Mediator Komplexes als Teil des Initiationskomplexes der zellulären Transkription waren im Zellkern lokalisiert (siehe Abbildung 10 IA, IIA, S. 63). Zur Beurteilung möglicher Interaktionen der Proteine wurden die beiden Bilder IA und IB bzw. IIA und IIB überlagert (siehe Abbildung 10 IC, IIC, S. 63). Im Falle einer absoluten Kolo-kalisation des OROV-NSs mit einem Teil des Mediator Komplexes sollte in dieser Ansicht ein gelbes Fluoreszenzsignal, als Überlagerung des roten und grünen Ursprungssignals, entstehen. Sowohl für die Untereinheit Cdk 8 als auch für die Untereinheit MED 30 des Mediator Komplexes mit dem OROV-NSs-Protein konnte keine Kolo-kalisation, wie es bei Interaktionspartnern zu erwarten wäre, gezeigt werden (siehe Abbildung 10 IIC, IIIC, S. 63).

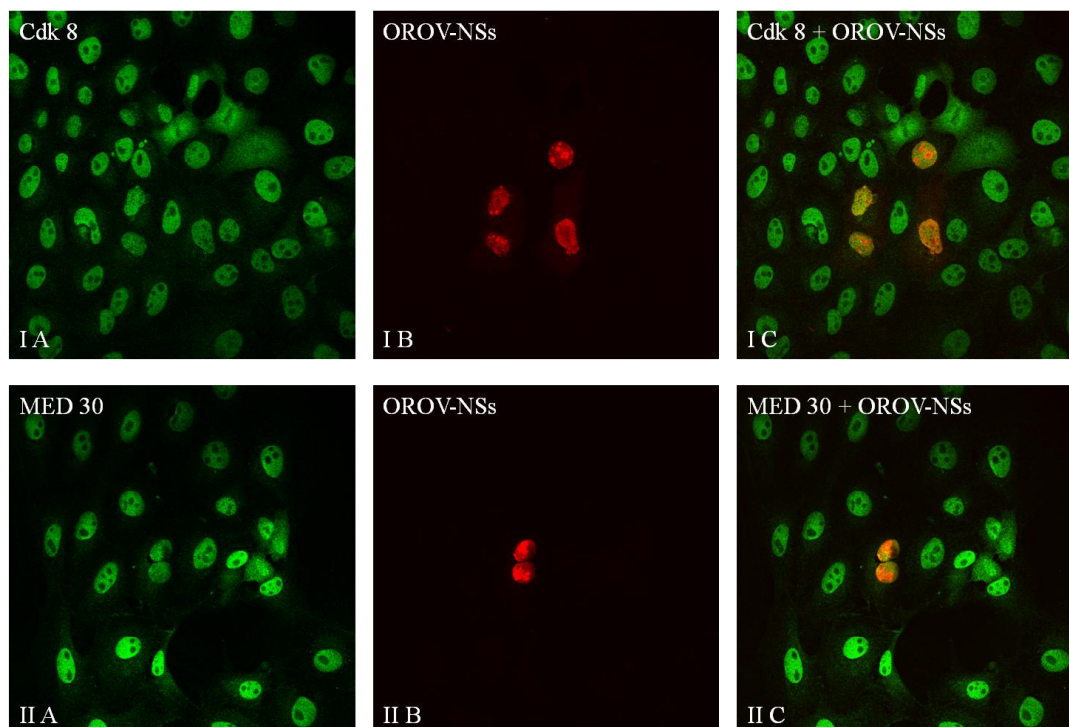


Abbildung 10: Immunfluoreszenzanalyse potentieller Interaktionspartner des OROV-NSs: In allen 6 Abbildungen wird das OROV-NSs-Protein rot dargestellt, wohingegen die Mediator-Komponenten Cdk 8 in Serie I bzw. MED 30 in Serie II grün dargestellt sind. Sowohl in Bildausschnitt I C als auch in II C waren beide Strukturen im Zellkern lokalisiert, jedoch schienen jene aufgrund des Fehlens eines deutlichen gelben Kolokalisationssignals auf unterschiedliche subzelluläre Kompartimente verteilt zu sein.

Sowohl die Ansätze mit dem Konstrukt pI.18-F Δ Mx (siehe Abbildung 11 III, IV, S. 64) als auch pI.18-RV-FV-ZF 5 (siehe Abbildung 11 V, VI, S. 64) dienen als Negativkontrolle für die Kolokalisationsstudie. Während sich F Δ Mx diffus im Zytoplasma anreicherte, bildete das RV-FV-NSs die charakteristischen filamentösen Strukturen innerhalb des Zellkerns (Struthers und Swanepoel 1982, Yadani et al. 1999). Im Falle des RV-FV-NSs war erwartungsgemäß keine Kolokalisation mit Cdk 8 und MED 30 zu beobachten, da das RV-FV-NSs bekanntermaßen mit der TFIIF-Untereinheit p 44 bzw. SAP 30 interagiert (Le May et al. 2004). Interessanterweise scheint F Δ Mx trotz seiner beschriebenen intrazytoplasmatischen Lokalisation im Rahmen dieser Immunfluoreszenzanalyse gemeinsam mit dem Mediator-Komplex MED 30 intranukleär lokalisiert zu sein (siehe Abbildung 11 IVB, S. 64) und eine zumindest partielle Kolokalisation in der Überlagerung mit MED 30 aufzuweisen (siehe Abbildung 11, IVC, S. 64), wohingegen der Immunfluoreszenztest mit dem Mediator-Komplex Cdk 8 und F Δ Mx eine deutliche Trennung der beiden gefärbten Proteine durch Anreicherung in unterschiedlichen Zellkompartimenten aufweist (siehe Abbildung 11 IIIC, S. 64).

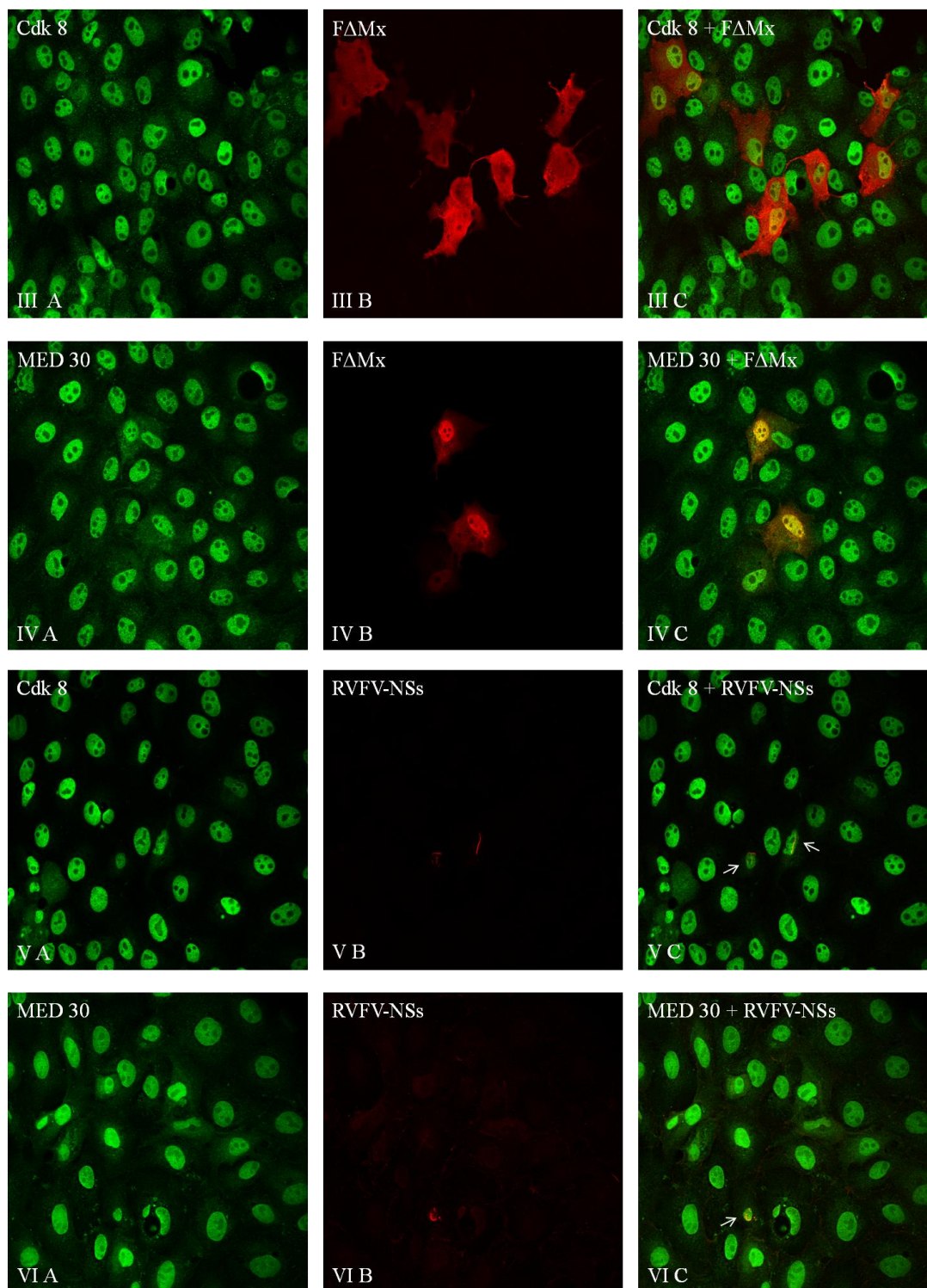


Abbildung 11: Immunfluoreszenzanalyse der Negativkontrollen FAMx (Serie III, IV) und RVFV (Serie V, VI): In Serie III zeigte sich eine zytoplasmatische Lokalisation des trunkierten MxA-Proteins, während sich die markierten Mediatorbestandteile intranukleär anreicherten und somit jegliche Kolo­kalisierung aufgrund räumlicher Distanz ausgeschlossen werden konnte. Erstaunlicherweise zeigte Serie IV jedoch eine vorwiegend intranukleäre Lokalisation von FAMx mit scheinbarer Kolo­kalisierung. Im Falle des RVFV-NSs, das die charakteristischen intranukleären Filamente bildete, konnte erwartungsgemäß jegliche Kolo­kalisierung mit den markierten Mediatoruntereinheiten ausgeschlossen werden (V, VI).

3.2 Oropouche-Virus-Minireplikon-System

Als Ausgangssituation für die vorliegende Arbeit lag bereits ein komplett kloniertes, T7-Polymerase-abhängiges Minireplikon-System für das Oropouche-Virus vor. Allerdings zeigte sich in mehreren vorherigen Versuchen keine Aktivität dieses OROV-Minireplikon-Systems, wohingegen bei der Positivkontrolle, dem bereits etablierten T7-Polymerase-basierten La-Crosse-Virus-Minireplikon-System deutliche Aktivität nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise konnte im Rahmen weiterer Versuche auch Aktivität in einem gemischten LACV-Minireplikon-System, bestehend aus LACV-Polymerase, LACV-Nukleoprotein und OROV-Minigenom verzeichnet werden.

Daraus ließ sich schlussfolgern, dass als Ursache für die fehlende Aktivität im OROV-Minireplikon-System ein systematischer methodisch-technischer Fehler während der Tests ausgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus kamen zwei grundlegende Fehlerquellen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Arbeitshypothese angenommen wurden, in Betracht. Zum einen könnte die fehlende Aktivität des OROV-Minireplikon-Systems auf mögliche Punktmutationen innerhalb der OROV-Polymerase-Sequenz und daraus resultierendem Funktionsverlust basieren, zum anderen könnten auch Fehler innerhalb des Reporter-Minigenom-Expressionsplasmids, besonders innerhalb der regulatorischen, nichtkodierenden Enden, die die Promotorregion für die virale RNA-Polymerase darstellen, die fehlende Aktivität des OROV-Minireplikon-Systems erklären.

Die folgenden Experimente zielten somit in einem ersten Schritt auf die Identifikation möglicher Fehler innerhalb der klonierten DNA-Sequenzen ab, die zum Aktivitätsverlust des Oropouche-Virus-Minireplikon-Systems beitragen könnten. In einem zweiten Schritt wurden die Fehlersequenzen gegebenenfalls korrigiert und mit den korrigierten Sequenzen erneut Minireplikon-Testläufe durchgeführt.

3.2.1 Oropouche-Virus-Polymerase

3.2.1.1 Überprüfung der OROV-Polymerase

In einer vorangegangenen Arbeit waren im Rahmen der Sequenzierung des klonierten ORFs der Oropouche-Polymerase bereits einige Mutationen beim Abgleich mit der publizierten Referenzsequenz (siehe NCBI Reference Sequence: NC_005776.1) aufgefallen und näher beschrieben bzw. analysiert worden, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig eruiert

werden, ob es sich bei den Punktmutationen um tatsächliche Fehler in der klonierten Sequenz oder um Variationen im Vergleich zur Referenzsequenz handelte (Keisers 2013). Mittlerweile wurde jedoch das gesamte Oropouche-Virus-Genom mit Hilfe einer weiteren Sequenzierungsmethode, der Pyrosequenzierung, sequenziert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Meik Dilcher) und konnte somit im Rahmen dieser Arbeit neben der publizierten Referenzsequenz als zusätzliche Vergleichsequenz zur Verifizierung tatsächlicher Punktmutationen im eigenen Expressionsplasmid herangezogen werden.

Vergleich der drei Sequenzierungsergebnisse des L-ORFs:

(vollständige Sequenzen siehe Anhang, S. 102)

Zusammenfassung:

Beim zusätzlichen Abgleich der eigenen Sequenz und der Referenzsequenz mit der Pyrosequenzierung ließen sich die meisten beschriebenen Punktmutationen als stumme Mutationen einordnen, die nicht zu einem Austausch auf Aminosäureebene und damit zu keinerlei strukturellen Veränderung innerhalb der OROV-Polymerase führen. Einige Abweichungen der Ausgangssequenz gegenüber der Referenzsequenz konnten durch die zusätzliche Pyrosequenzierung verifiziert und als richtig deklariert werden. Allerdings zeigte sich an insgesamt vier Stellen eine Abweichung der eigenen Sequenz im Vergleich zur Pyrosequenzierung und der publizierten Referenzsequenz, die Veränderung auf AS-Ebene nach sich ziehen und somit durch potenzielle Strukturänderung innerhalb des OROV-L-Proteins dessen Funktionsverlust im Minireplikon-System erklären könnten:

I. Position 761:

Guanin (Referenzsequenz, Pyrosequenzierung), **A** (eigene Sequenz)

→ Aminosäureaustausch von Glycin nach Serin

II. Position 1389:

Adenin (Referenzsequenz, Pyrosequenzierung), **Guanin** (eigene Sequenz)

→ Aminosäureaustausch von Lysin nach Arginin

III. Position 4434:

Adenin (Referenzsequenz, Pyrosequenzierung), **Guanin** (eigene Sequenz)

→ Aminosäureaustausch von Glutaminsäure nach Glycin

IV. Position 4962:

Thymin (Referenzsequenz, Pyrosequenzierung), Cytosin (eigene Sequenz)

→ Aminosäureaustausch von Phenylalanin nach Serin

3.2.1.2 **Korrektur des OROV-Polymerase-Expressionsplasmids**

Da der kodierende Bereich des OROV-L-Segments (L-ORF) 6759 bp umfasst, war es aus methodischen Gründen nicht möglich die komplette Sequenz fehlerfrei in einem Stück mittels PCR-Amplifikation zu generieren.

Aufgrund dessen wurde in einer vorangegangenen Arbeit die OROV-Polymerase nicht als Ganzes, sondern mit Hilfe von spezifischen *Primern* in fünf überlappende Teilfragmente untergliedert und diese jeweils zur Minimierung PCR-bedingter Punktmutationen einzeln amplifiziert. Im Zuge dessen wurden die *Primer* so konstruiert, dass zwischen den einzelnen Fragmenten durch Überlappung der jeweiligen Enden Restriktionsschnittstellen entstanden bzw. einzelne Restriktionsschnittstellen angefügt wurden, mit deren Hilfe die fünf Fragmente (L1 bis L5) im Anschluss an die Amplifikation zum kompletten viralen L-ORF ligiert werden konnten (siehe Abbildung 12).

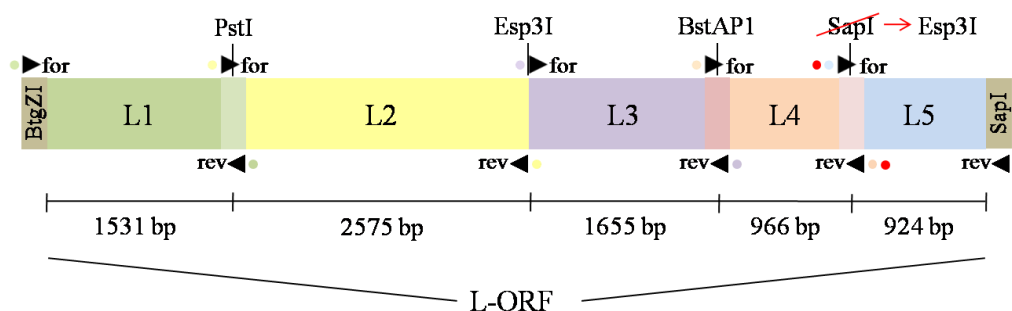


Abbildung 12: Untergliederung des viralen L-ORFs in 5 Fragmente: Zur fehlerfreien Herstellung des gesamten OROV-Polymerase-ORFs wurde jener im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit in 5 Teilstücke untergliedert. Während es sich bei den Schnittstellen PstI und BstAPI um natürlich-vorkommende Schnittstellen innerhalb der überlappenden Bereiche der Fragmente handelt, gibt es zwischen L2 und L3 keine Überlappung, sondern jeweils eine künstlich angehängte Esp3I-Schnittstelle. Diese werden beim Verdau wieder entfernt und somit L2 und L3 in der folgenden Ligation „basengenau“ zusammengefügt. Im überlappenden Bereich zwischen L4 und L5 ist natürlicherweise eine SapI-Schnittstelle vorhanden, die allerdings im Rahmen der späteren Umklonierung ungünstig wäre. Daher wurde diese Schnittstelle mit Hilfe einer *pimer*-induzierten Punktmutation, die keinen Einfluss auf die AS-Sequenz der OROV-Polymerase hat (sog. stille Mutation), in eine Esp3I-Schnittstelle umgewandelt. An das 5'-Ende des L1- und das 3'-Ende des L5-Fragments wurde zur nachfolgenden Umklonierung zusätzlich die Sequenz einer BtgZI- bzw. SapI-Schnittstelle angefügt.
Modifiziert nach Keisers 2013

Bei Orientierung an dieser Untergliederung des L-ORFs treten die vier gefundenen Punktmutationen (siehe 3.2.1.1, S. 65) in den beiden Fragmenten L1 und L3 auf,

wohingegen die Fragmente L2, L4 und L5 fehlerfrei sind und somit zur Generierung einer neuen, korrigierten OROV-Polymerase-ORFs auf jene zurückgegriffen werden konnte.

Korrektur OROV-L3-Fragment:

Für die Korrektur der beiden Punktmutationen innerhalb des L3-Fragments musste in einem ersten Schritt mit Hilfe von *Random Hexamer Primern* (0,1 µg/µl) ausgehend von RNA, die aus OROV-Partikeln isoliert wurde, eine neue cDNA synthetisiert werden (siehe 2.2.22, S. 42). Die generierte cDNA diente als Matrize für eine *Touchdown-PCR* mit dem *Primerpaar* OROV-L3_for_new_Esp3I und OROV-L3_rev (siehe 2.2.9, S. 21). Das erhaltene Amplifikationsprodukt wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung extrahiert (erwartete Bandengröße: 1,7 kb, siehe Abbildung 13) und für eine TA-Klonierung in den pCRII-Vektor eingesetzt (siehe 2.2.6, S. 18).

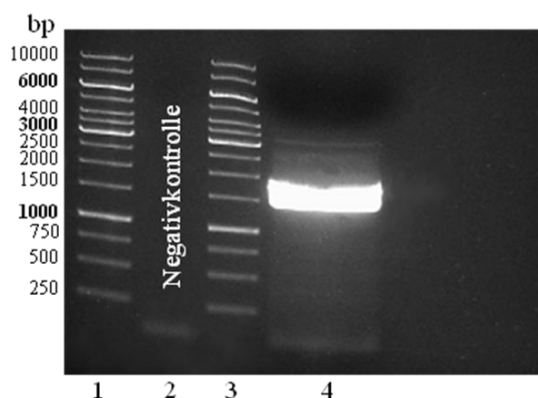


Abbildung 13: Gelbild nach präparativer Agarosegelelektrophorese des L3_Neu-Fragments: Spur 1+3: 1-kb-DNA-Längenstandard (2 µl), **Spur 2:** Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne cDNA), **Spur 4:** PCR mit cDNA des OROV-L3_Neu-Fragments mit erwarteter Größe von 1,7 kb (eingesetzte Menge: 50 µl)

Zur Bestätigung des Ligationserfolges im TA-Klonierungsverfahren (siehe 2.2.6, S. 18) schloss sich ein Kontrollverdau (siehe 2.2.12, S. 27) des durch Minipräparation (siehe 2.2.19, S. 36) isolierten Konstrukts pCRII-L3_Neu mit den beiden Restriktionsenzymen Esp3I und XhoI an. Im Falle einer *sense*-Orientierung des DNA-Fragments wurden zwei Banden der Größe 3,9 kb und 1,7 kb erwartet, wohingegen bei *antisense*-Orientierung des *Inserts* nur eine Bande (5,6 kb) sichtbar sein sollte (siehe Abbildung 14, S. 69).

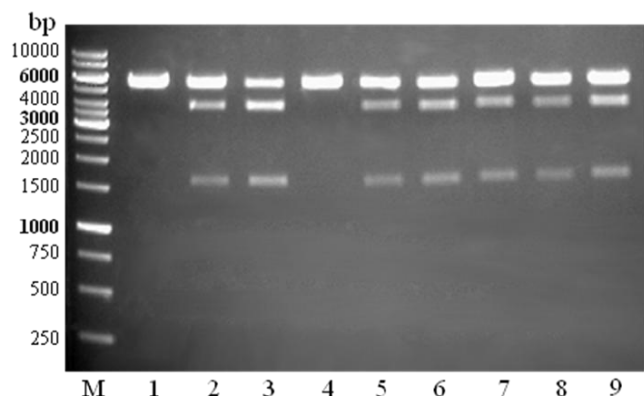


Abbildung 14: Gelbild nach analytischer Agarosegelelektrophorese des Testverdaus der Plasmid-DNA pCRII-OROV-L3_Neu mit Hilfe der beiden Restriktionsenzyme Esp3I und XhoI zur Kontrolle des Ligationserfolges (unvollständiger Verdau): M: Marker: 1-kb-DNA-Längenstandard (2 μ l), Spur 1-9: jeweils 5 μ l des jeweiligen, verdauten Klons 1-9 (erwartete Bandengrößen: 3,9 kb, 1,7 kb)

Vier der positiven Klone (*sense* und *antisense*) wurden wie unter Punkt 2.2.25 (S. 49) beschrieben, unter Verwendung des *Primer*-Paares M13 for und M13 rev sequenziert. Hierbei enthielten alle Klone die korrekte Nukleotidsequenz. Im Folgenden wurde nun mit Klon 7 weitergearbeitet.

Korrektur OROV-L1-Fragment:

Im Gegensatz zum L3-Fragment konnte zur Korrektur des L1-Fragments auf ein bereits existierendes, fehlerfreies Plasmid, pCRII-L1, zurückgegriffen werden. Unter Verwendung des *Primer*-Paares BtgZI_OROV-L_for_pTM1 und OROV-L1_rev, von denen der erstgenannte die zusätzliche Sequenz für eine BtgZI-Schnittstelle zur späteren Umklonierung des L-ORFs enthält, wurde das L1-Fragment mit Hilfe einer *Touchdown-PCR* amplifiziert (siehe 2.2.9, S. 21), anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und extrahiert (siehe 2.2.10, S. 25, 2.2.11, S. 26, erwartete Bandengröße ca. 1,5 kb).

Zum Abbau des *Template*plasmids wurde ein DpnI-Verdau durchgeführt (siehe 2.2.12, S. 27). Anschließend wurde analog zum L3-Fragment das *Insert* im Rahmen des TA-Klonierungsverfahrens in den pCRII-Vektor ligiert, transformiert und die generierte Plasmid-DNA durch Minipräparation isoliert (siehe 2.2.6, S.18, 2.2.19, S. 36). In diesem Fall war es für die anschließende Extraktion des korrigierten L1-Fragments jedoch elementar, einen Klon in *sense*-Orientierung zu erhalten, da sonst im Falle einer *antisense*-Orientierung das L1-Fragment aufgrund einer zusätzlich vorkommenden PstI-Schnittstelle

im pCRII-Vektor nicht ausgeschnitten werden könnte (erwartete Bandengrößen bei *sense*-Orientierung im Testverdau mit PstI: 4,3 kb, 1,2 kb, 0,1 kb, siehe 2.2.12, S. 27).

Insgesamt konnte nur ein einziger *sense*-Klone (Klon 4) erzeugt werden, der zur Überprüfung auf Korrektheit der Nukleotidsequenz mit dem *Primer*-Paar M13 for und M13 rev sequenziert wurde (siehe 2.2.25, S. 49). Die Sequenzanalyse ergab keinerlei Punktmutationen, sodass mit jenem Klon fortgeföhren werden konnte.

Subklonierung des kompletten OROV-L-ORFs_Neu in den Expressionsvektor pTM1:

Da nun alle fünf Fragmente fehlerfrei in ihren jeweiligen Ausgangsvektoren vorlagen, konnten diese mit Hilfe der zusätzlich eingefügten oder natürlich vorhandenen, singulären Restriktionsschnittstellen in mehreren Ligationsschritten zum kompletten, korrigierten L-ORF_Neu zusammengefügt werden.

Im ersten Schritt wurden das bereits existierende Konstrukt pUC19 $\Delta\Delta$ -OROV-L3 und das neu synthetisierte Konstrukt pCRII-OROV-L3_Neu mit den beiden Restriktionsenzymen HindIII und SmaI bzw. PstI und HindIII wie in Punkt 2.2.12 (S. 27) beschrieben, verdaut (siehe Abbildung 15, S. 71). Allerdings musste das Konstrukt pCRII-OROV-L3_Neu in diesem speziellen Fall aufgrund der Inkompatibilität der PstI-Schnittstelle (3'-Überhang (*sticky*)) des *Inserts* zur entstehenden SmaI-Restriktionsschnittstelle (*blunt*) des Vektors zusätzlich mit der T4-DNA-Polymerase vorbehandelt werden um durch Glättung des 3'-Überhangs eine anschließende Ligationsschritt der entstehenden Restriktionsschnittstellen zu ermöglichen (siehe 2.2.8, S. 20). In der nachfolgenden präparativen Gelelektrophorese wurden sowohl die *Insert*-Bande L3_Neu (1,7 kb) als auch die Vektorbande pUC19 $\Delta\Delta$ (2,6 kb) erwarteter Größe extrahiert, aufgereinigt (siehe 2.2.11, S. 26) und die Vektorfragmente zur Minimierung von Religation in der nachfolgenden Ligationsschritt zusätzlich wie unter Punkt 2.2.7 (S. 20) beschrieben, dephosphoryliert.

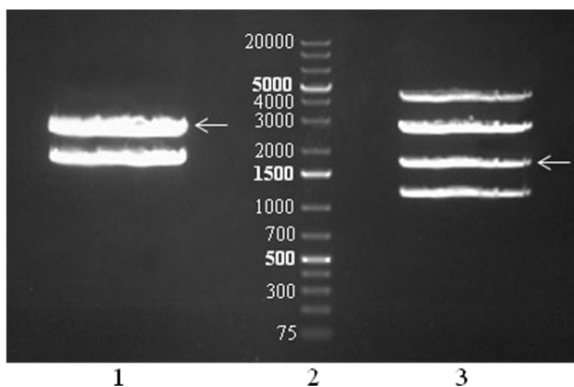


Abbildung 15: Gelbild nach präparativer Agarosegelelektrophorese des Verdauens der beiden Plasmide pUC19 $\Delta\Delta$ -OROV-L3 und pCRII-OROV-L3_Neu mit den Restriktionsenzymen SmaI/HindIII bzw. PstI/HindIII: Mit 1 ist die Spur des Verdauens von pUC19 $\Delta\Delta$ -OROV-L3 gekennzeichnet (zu extrahierende Bande=Vektorbande pUC19 $\Delta\Delta$: 2599 bp). Unter 3 ist der entsprechende Verdau von pCRII-OROV-L3_Neu zu sehen (zu extrahierende Bande=Insert-Bande OROV-L3_Neu: 1,7 kb). Spur 2 zeigt den 1-kb-Plus-DNA-Längenstandard (2 μ l).

Die Ligationsansätze wurden in XL1-Blue-kompetente *E. coli* transformiert (siehe 2.2.4, S. 16), kultiviert und anschließend von mehreren Klonen Flüssigkulturen angelegt (siehe 2.2.5, S. 17). Nach Isolation der Plasmid-DNA (siehe 2.2.19, S. 36) wurden jene zur Kontrolle des Ligationserfolges mit Esp3I verdaut (erwartete Banden: 2,1 kb und 2,3 kb, siehe Abbildung 16).

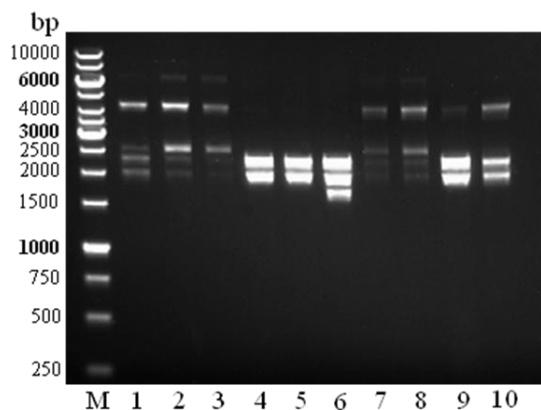


Abbildung 16: Gelbild nach analytischer Agarosegelelektrophorese des Testverdauens der Plasmid-DNA pUC19 $\Delta\Delta$ -OROV-L3_Neu mit Hilfe des Restriktionsenzym Esp3I zur Kontrolle des Ligationserfolges: M: Marker: 1-kb-DNA-Längenstandard (2 μ l), Spur 1-10: jeweils 5 μ l des jeweiligen, verdauten Klons 1-10 (erwartete Bandengrößen: 2,3 kb, 2,1 kb). Klon 1-3,6-8 und 10 zeigen einen unvollständigen Verdau, jedoch erwiesen sich alle Klone in der Sequenzierung als positiv.

Das erhaltene Konstrukt pUC19 $\Delta\Delta$ -OROV-L3_Neu wurde erneut mit Esp3I und ScaI verdaut, wodurch das Insert L3_Neu (2,3 kb) aus dem Vektor herausgeschnitten wurde und in das bereits bestehende, durch Esp3I linearisierte Konstrukt pUC19 Δ -L2 (4,8 kb)

eingefügt werden konnte. Zur Kontrolle des Ligationserfolges wurde ein Kontrollverdau mit ScaI angefertigt, bei dem bei Vorhandensein des *Inserts* gelelektrophoretisch die zwei erwarteten Banden der Größen 4,2 kb und 2,7 kb erhalten wurden.

Das Ligationsprodukt pUC19Δ-OROV-L2-L3_Neu und das Konstrukt pCRII-OROV-L1_Neu wurden beide mit den Restriktionsenzymen PstI und HindIII geschnitten. Das so gewonnene L1_Neu-Fragment (1,5 kb) wurde nach Gelextraktion in den linearisierten Vektor pUC19Δ-OROV-L2-L3_Neu (7,5 kb) ligiert. Im Testverdau mit dem Restriktionsenzym BamHI wurde bei erfolgreicher Ligation lediglich ein Fragment auf der Höhe von 8,3 kb erwartet.

Sowohl das oben erhaltene Konstrukt pUC19Δ-L1_Neu-L2-L3_Neu als auch das bereits vorhandene Konstrukt pI.18mod-L4-L5 wurden mit den beiden Restriktionsenzymen BamHI und BstAPI verdaut. Das so erhaltene Fragment L1_Neu-L2-L3 (5,3 kb) wurde in den linearisierten Vektor pI.18mod-L4-L5 (5,8 kb) eingefügt und so der komplette OROV-L-ORF erhalten. Im Testverdau zur Kontrolle des Ligationserfolges mit SapI (LguI) zeigten die verdauten Klone die vier erwarteten Fragmente: 6,8 kb, 3,3 kb, 0,6 kb, 0,5 kb.

Im letzten Schritt wurde der komplette virale L-ORF (6,8 kb) mit der zu Beginn eingefügten Restriktionsschnittstelle BtgZI am Anfang des L1_Neu-Fragments und der im Vektor pI.18mod enthaltenen Restriktionsschnittstelle EcoRV ausgeschnitten und in den mit NcoI und StuI verdauten Vektor pTM1 (5,2 kb) umkloniert. Im Testverdau mit den beiden Restriktionsenzymen XhoI und SalI wurden bei Vorhandensein des kompletten L-ORFs zwei Banden der Größe 7 kb und 5 kb erwartet (siehe Abbildung 17, S. 73).

Das so generierte Plasmid pTM1-OROV-L_Neu wurde abschließend zur Überprüfung der kompletten, klonierten Sequenz sequenziert. Aufgrund der Länge des korrigierten L-ORFs von insgesamt 6759 bp erfolgte die Sequenzierung mit 14 *Primern* (*Primer*-Sequenzen siehe 2.2.25, S. 49). Die neu generierte Sequenz des ORFs der Oropouche-Polymerase wies nun keinerlei die AS-Sequenz-verändernde Punktmutationen mehr auf.

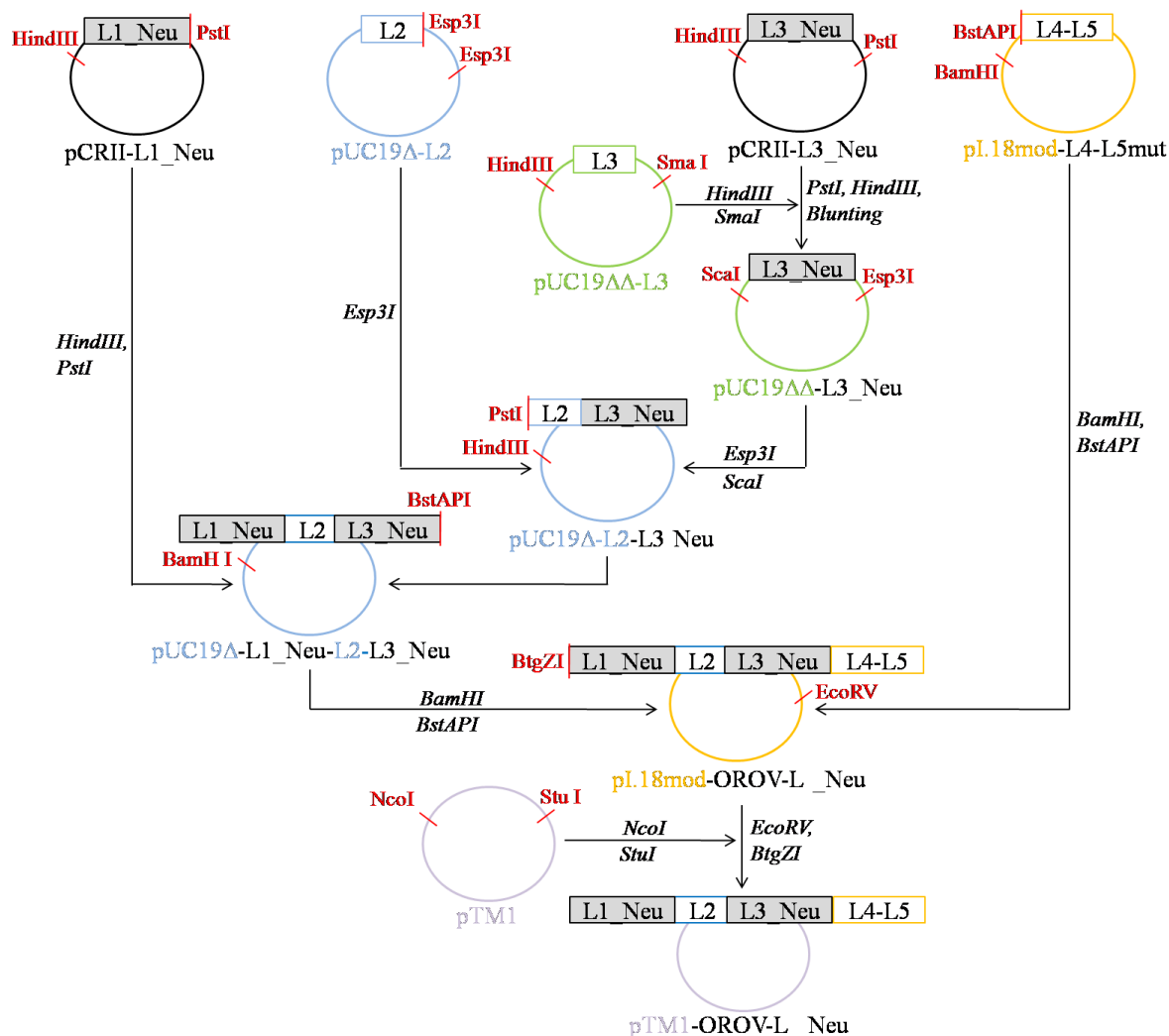


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Subklonierung des kompletten OROV-L-ORFs_Neu in den Expressionsvektor pTM1: Mit Hilfe künstlich eingefügter und natürlich vorkommender Restriktionsschnittstellen innerhalb des L-ORFs bzw. innerhalb verschiedener Plasmide wurden die einzelnen L-ORF-Fragmente (L1-L5) zum kompletten ORF der viralen Polymerase im pTM1-Vektor zusammengesetzt.

3.2.1.3 OROV-Minireplikon-System unter Verwendung des korrigierten OROV-Polymerase-Expressionsplasmids pTM1-ORO-V-L_Neu

Mit der korrigierten OROV-Polymerase (pTM1-ORO-V-L_Neu) wurde nun eine neue OROV-Minireplikon-Kinetik durchgeführt. Hierzu wurden BSR-T7-Zellen in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen pro Kavität in eine 12-Kavitäten-Platte ausgesät (siehe 2.2.3, S. 15) und jene mit Hilfe des Fugene-6-Transfektionsreagenz mit den Bestandteilen der unterschiedlichen Minireplikon-Systeme transfiziert (siehe 2.2.13, S. 29). Insgesamt

wurden vier unterschiedliche Versuchsreihen (I bis IV) mit jeweils 0,3 µg pro Konstrukt und Kavität angesetzt:

- I. OROV-Minireplikon-System:
pTM1-OROV-L_Neu, pTM1-OROV-N, pT7-ribo-SM2-OROV-Minigenom
- II. OROV-Minireplikon-System ohne OROV-L = Negativkontrolle:
pUC19, pTM1-OROV-N, pT7-ribo-SM2-OROV Minigenom
- III. LACV-Minireplikon-System:
pTM1-LACV-L, pTM1-LACV-N, pT7-ribo-SM2-LACV-Minigenom
- IV. LACV-Minireplikon-System ohne LACV-L = Negativkontrolle:
pUC19, pTM1-LACV-N, pT7-ribo-SM2-LACV-Minigenom

Um Messungen an drei unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 24 und 48 Stunden) durchführen zu können, wurde die oben genannte Versuchsreihe jeweils als Dreifachansatz angelegt und jede der 12 Kavitäten zusätzlich als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz mit 0,05 µg pTM1-FF-Luc kotransfiziert (siehe 2.2.13, S.29). Nach der jeweiligen Inkubationszeit (0, 24, 48 h) wurden die transfizierten Zellen mit 100 µl 1xPLB pro Kavität lysiert und wie in Punkt 2.2.27 (S. 53) beschrieben, die enzymatische Aktivität der Reporterenzyme FF-Luc und Ren-Luc luminometrisch gemessen. Aufgrund der genomischen Orientierung der durch die nichtkodierenden Enden flankierten cDNA des Minigenoms (Ren-Luc) entsteht nach T7-Polymerase-abhängiger Transkription eine negativsträngige RNA. Diese stellt keine mRNA dar (kann also nicht translatiert werden) und ist durch die zelluläre RNA-Polymerase II nicht transkribierbar (da diese nur DNA als Matrize akzeptiert). Sie kann nur durch die kotransfizierte virale OROV-Polymerase transkribiert werden. Somit kann die Aktivität der Renilla-Luciferase als Maß für die virale Transkriptionseffizienz angesehen werden (vgl. zusätzlich Kapitel 2.2.26, S. 51). Gemäß diesem Schema wurden die Minireplikon-Kinetiken viermal durchgeführt und die erhaltenen Rohdaten wie unter 2.2.28 (S. 56) beschrieben, statistisch ausgewertet.

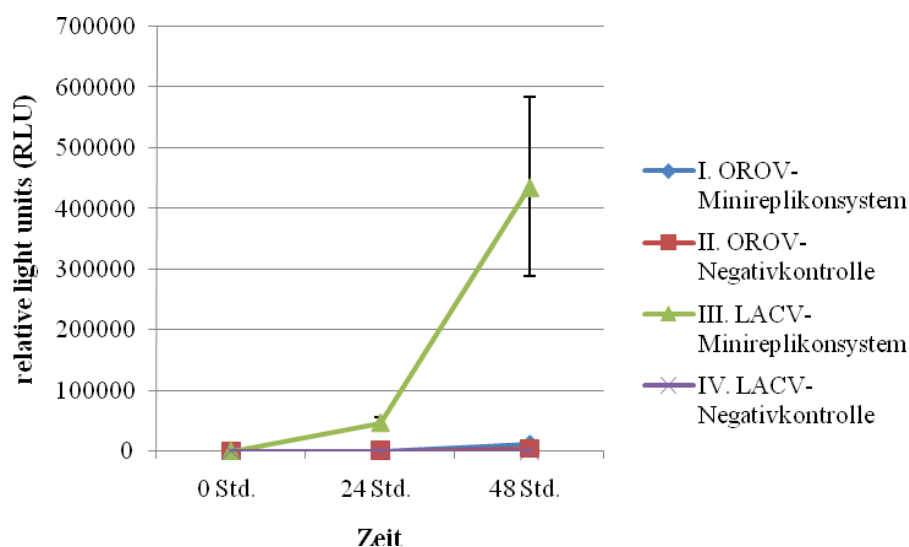


Abbildung 18: Oropouche-Minireplikon-System unter Verwendung der korrigierten Oropouche-Polymerase und den auf der Referenzsequenz basierenden nichtkodierenden Enden innerhalb des OROV-Minigenoms: Als Positivkontrolle fungierte in allen Minireplikontestläufen das LACV-Minireplikon-System mit einem deutlichen Aktivitätsanstieg nach 48 Stunden. Im Vergleich hierzu zeigte sich für das reine OROV-Minireplikon-System kein signifikanter Aktivitätsanstieg über die Zeit im Vergleich zur Negativkontrolle (nach 48 Std. $p=0,064$). Dargestellt sind die Mittelwerte vier unabhängiger Experimente für das OROV-Minireplikon-System bzw. 2 unabhängiger Experimente für das LACV-Minireplikon-System.

Auch mit der korrigierten Version der viralen Polymerase pTM1-OROV-L_Neu konnte im OROV-Minireplikon-System im Vergleich zur Negativkontrolle (II) keine signifikant erhöhte Renilla-Luciferase-Aktivität nach 12 Std. ($p=0,325$) oder nach 48 Std. ($p=0,064$) gemessen werden, wohingegen im LACV-Minireplikon-System als Positivkontrolle ein eindeutiger Aktivitätsanstieg über die Zeit nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 18).

3.2.2 Nichtkodierende Enden

3.2.2.1 Überprüfung der nichtkodierenden Enden der OROV-Genomsegmente

Da in einer vorangegangenen Arbeit (Keisers 2013) bereits für die Sequenz der viralen Polymerase gezeigt werden konnte, dass die publizierte Referenzsequenz (siehe NCBI Reference Sequences: NC_005776.1) fehlerhaft ist (in der Referenzsequenz fehlen 6 Nukleotide) und die im OROV-Minigenom-Plasmid verwendeten nichtkodierenden Enden denen der Referenzsequenz entsprechen, sollten im Folgenden auch die nichtkodierenden Enden im Detail analysiert werden. Aufgrund ihrer elementar wichtigen Funktion im Rahmen der viralen Transkription und Replikation, nämlich die der Promotorfunktion für

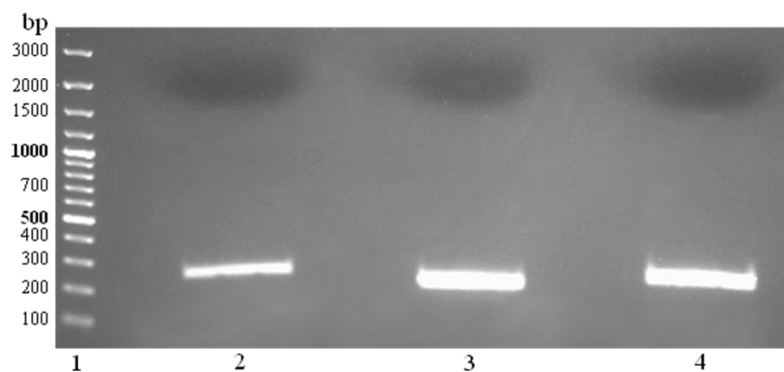


Abbildung 19: Gelbild nach präparativer Agarosegelelektrophorese der amplifizierten cDNA der nichtkodierenden 3'-Enden der drei viralen Genomsegmente: **Spur 1:** 100-bp-DNA-Längenstandard (2 μ l) **Spur 2** zeigt die amplifizierte cDNA des 3'-Endes des OROV-L-Segments (erwartete Bandengröße: 261 bp). Unter **3** ist das entsprechende Amplifikat für das OROV-M-Segment aufgetragen (erwartete Bandengröße: 208 bp) und **4** enthält das Amplifikat der cDNA des nichtkodierenden 3'-Endes des OROV-S-Segments (erwartete Bandengröße: 228 bp).

Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der TA-Klonierung in den pCRII-Vektor kloniert (siehe 2.2.6, S. 18). Mit Hilfe der Blau-Weiß-Differenzierung wurden 6 Klone ausgewählt, in Flüssigmedium kultiviert (siehe 2.2.5, S. 17) und gemäß Punkt 2.2.19 (S. 36) Plasmid-Minipräparationen angefertigt. Drei der positiven Klone pro OROV-Segment wurden wie in Kapitel 2.2.25 (S. 49) beschrieben, unter Verwendung des *Primer*-Paares M13 for und M13 rev sequenziert (*Primer*-Sequenzen siehe 2.2.25, S. 49).

Insgesamt wurde die beschriebene Versuchsreihe ausgehend von viraler genomischer RNA aus Überständen drei unterschiedlicher, infizierter Zelllinien durchgeführt (IFNAR^{-/-}, BHK, Vero E6). In allen drei Versuchsreihen konnte ein absolut identisches Sequenzierungsergebnis erzielt werden, wodurch ein zelllinienspezifisches Phänomen als Ursache des Ergebnisses ausgeschlossen werden konnte.

Sequenzierungsergebnisse der OROV-3'-Enden:

Im Vergleich zu den publizierten Referenzsequenzen (NCBI Reference Sequences: NC_005776.1/005775.1/005777.1) zeigten die Sequenzierungsergebnisse in allen Segmenten des Oropouche-Virus (OROV-L, -M und -S) einen Basenaustausch an Position 9 des viralen 3'-Endes. Hierbei handelte es sich, in genomischer Orientierung gelesen, um einen Basenaustausch von der Pyrimidinbase Cytosin zur Pyrimidinbase Uracil. Im weiteren Verlauf konnte im Vergleich zur Referenzsequenz NC_005776.1 für das 3'-Ende des L-Segments noch ein weiterer Austausch an Position 18 von Guanin zu Uracil (in

Primer, wodurch segmentspezifische, unterschiedliche cDNAs synthetisiert wurden (Methodik und *Primer*-Sequenzen siehe 2.2.22, S. 42).

I. 5'-Ende OROV-L: OROV-L_rev_5end

II. 5'-Ende OROV-M: OROV-M3_for

Mit Hilfe einer PCR wurden die jeweiligen 5'-Enden der viralen Segmente ausgehend von der segmentspezifischen cDNA und mit Hilfe segmentspezifischer *Primer* amplifiziert (Methodik und *Primer*-Sequenzen siehe 2.2.9, S. 21).

I. 5'-Ende OROV-L: 5' RACE Outer (→ bindet an die Adaptersequenz),
OROV-L_rev_5end inner

II. 5'-Ende OROV-M: 5' RACE Outer, OROV-M_rev_5end

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate wurden die Fragmente gewünschter Bandengröße (5'-Ende OROV-L: 323 bp, OROV-M: 437 bp) extrahiert (siehe 2.2.10, S. 25, 2.2.11, S. 26, siehe Abbildung 21).

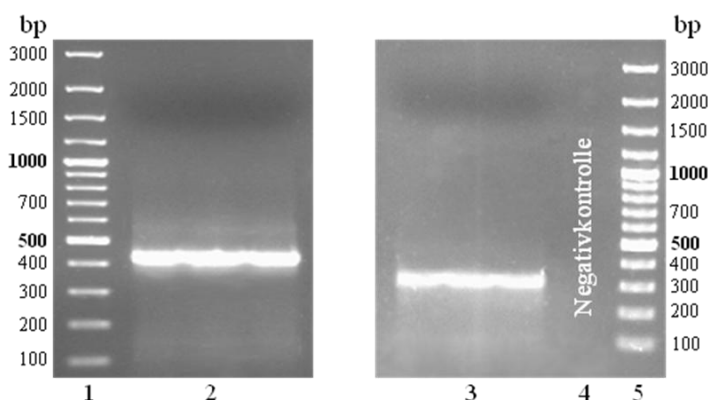


Abbildung 21: Gelbild nach präparativer Agarosegelelektrophorese der amplifizierten cDNA der nichtkodierenden 5'-Enden der viralen Genomsegmente M (links) und L (rechts): Spur 1+5: 100-bp-DNA-Längenstandard (2 µl) Unter 2 ist das Amplifikat der cDNA des 5'-Endes des OROV-M-Segments aufgetragen (erwartete Bandengröße: 437 bp), unter 3 das entsprechende Amplifikat der cDNA des 5'-Endes für das OROV-L Segment (erwartete Bandengröße: 323bp). **Spur 4:** Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne cDNA)

Im weiteren Verlauf schlossen sich analog zum 3'-Ende ein TA-Klonierungsverfahren, die Plasmidminipräparation einzelner Klone und deren Sequenzierung mit dem *Primer*-Paar M13 for und M13 rev an (siehe 3.2.2.1.1, S. 49).

Sonderfall 5'-Ende des OROV-S-Segments: Mit dem 5'-Ende des S-Segments wurde im ersten Versuch, wie oben beschrieben, verfahren, jedoch konnte kein Amplifikationsprodukt einheitlicher Größe generiert werden. In der Konsequenz beinhaltete das PCR-Amplifikat ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-

Fragmenten, die auch nach Gelextraktion auf erwarteter Bandenhöhe nicht die komplette Sequenz des nichtkodierenden 5'-Endes beinhalteten.

Daher wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau zum einen zur Optimierung der cDNA-Synthese und zum anderen zur Verbesserung der PCR-Amplifikation modifiziert. Im ersten Ansatz wurden unterschiedliche *Primer* entweder zur cDNA-Synthese oder zur PCR-Amplifikation bei gleichbleibenden cDNA/PCR-Ansatz und Reaktionsbedingungen verwendet, um möglicherweise ein *Primer*-Sequenz-spezifisches Problem auszuschließen. Die Verwendung der *Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase* anstelle der *SuperScript III Reverse Transkriptase* in Kombination mit dem *Primer* OROV-S_rev_5end zur cDNA-Synthese und der anschließenden PCR-Amplifikation mit dem *Primer*-Paar 5' RACE Outer und OROV-S_rev_5end inner erbrachte das beste Ergebnis.

Auch in diesem optimierten Versuchsaufbau konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente keine klare Bande erzeugt werden, sodass aus dem Gemisch unterschiedlich großer DNA-Fragmente eine DNA-Bande von der Größe des theoretisch ermittelten Wertes von 296 bp extrahiert wurde, um potenzielle, vollständige Fragmente zu erhalten (siehe Abbildung 22).

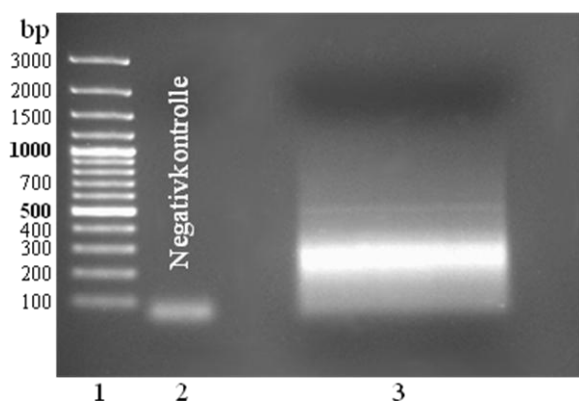


Abbildung 22: Gelbild nach präparativer Agarosegelelektrophorese der amplifizierten cDNA des nichtkodierenden 5'-Endes des OROV-S-Genomsegments: **Spur 1:** 100-bp-DNA-Längenstandard (2 µl) **Spur 2:** Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne cDNA) **Spur 3:** PCR mit cDNA für das 5'-Ende des OROV-S-Segments (erwartete Bandengröße: 296 bp)

Im weiteren Verlauf wurde gemäß der beiden anderen 5'-Enden des L- und M-Segments verfahren. Allerdings schloss sich vor der Sequenzierung noch ein zusätzliches Screeningverfahren mittels PCR der Plasmidminipräparationen an. Hierdurch sollte unter Verwendung des *Primer*-Paares OROV-S_rev_sapi und OROV-S_rev_5end inner (*Primer*-Sequenzen siehe 2.2.9, S. 21), welche ihre spezifische Anlagerungssequenz kurz

vor der interessierenden Sequenz, dem nichtkodierenden 5'-Ende, besitzen, die Wahrscheinlichkeit der Sequenzierung potentiell vollständiger bzw. nicht wesentlich verkürzter Klone erhöht werden (siehe Abbildung 23).

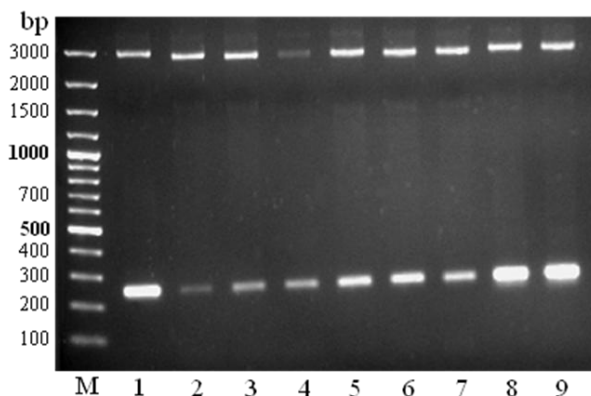


Abbildung 23: Gelbild nach analytischer Agarosegelelektrophorese der Screening-PCR zur Überprüfung der Klone auf Vollständigkeit der Plasmide für die Nukleotidsequenz des nichtkodierenden 5'-Endes des OROV-S-Segments: **M:** Marker: 100-bp-DNA-Längenstandard (2 µl) **Spur 1-9:** Klon 1-9: Insbesondere Klon 1, 8 und 9 zeigen ein deutliches Signal auf gewünschter Höhe von 238 bp und wurden im Rahmen des Screenings als positiv gewertet.

Sequenzierungsergebnisse der OROV-5'-Enden:

Die Sequenzierung des 5'-Endes des L-Segments ergab im Vergleich zur Referenzsequenz (NC_005776.1) keinerlei Abweichung. Leider enthielt keiner der analysierten Klone die komplette Sequenz des 5'-Endes des S-Segments. Jedoch fehlten einzelnen Klonen nur die ersten neun Basen und da es sich bei diesen um den innerhalb aller drei Segmente identischen, hochkonservierten Bereich handelte (Kohl et al. 2004), konnte durch Beurteilung der ersten neun Basen der beiden anderen Segmente auf die komplette Sequenz des 5'-Endes des S-Segments rückgeschlossen werden. Somit ergab sich verglichen mit der publizierten Referenzsequenz (NC_005777.1) auch für die Nukleotidsequenz des nichtkodierenden 5'-Endes des S-Segments kein Basenaustausch. Unter Berücksichtigung des Basenaustausches an Position 9 des viralen 3'-Endes resultierte nun in allen drei viralen Genomsegmenten im Vergleich zur Referenzsequenz ein Verlust der Basenpaarung an Position 9 innerhalb der hochkonservierten Bereiche der beiden nichtkodierenden Enden. Lediglich im Oropouche-Virus-M-Segment zeigte sich in genomischer Orientierung im Vergleich zur Referenzsequenz (NC_005775.1) ein zusätzlicher Basenaustausch an Position 15 von Guanin zu Adenin (siehe Abbildung 24, S. 82). Hieraus resultiert an Position 15 des 3'- bzw. des 5'-Endes eine Basenpaarung

zwischen der Pyrimidinbase Uracil (3'-Ende) und der Purinbase Adenin (5'-Ende), während die Referenzsequenz an dieser Position eine C-G-Basenpaarung aufweist.

5'-Ende des M-Segments des Oropouche-Virus:

Referenzsequenz: 5'-AGUAGUGUGCUACCG...-3'

Eigene Sequenz: 5'-AGUAGUGUGCUACCA...-3'

15

Abbildung 24: Sequenzierungsergebnis des 5'-Endes des Oropouche-Virus-M-Segments in genomischer Orientierung: Verglichen mit der Referenzsequenz zeigt sich nur im viralen M-Segment an Position 15 ein Basenaustausch von der Purinbase Guanin zur Purinbase Adenin. Durch den ebenfalls sequenzierten Basenaustausch im 3'-Ende von Cytosin zu Uracil resultiert hieraus, wie in der Referenzsequenz publiziert, wieder eine Basenpaarung.

3.2.2.2 Korrektur der nichtkodierenden Enden im OROV-Minigenom-Plasmid

Das bereits existierende Minigenom-Plasmid pT7-ribo-SM2-OROV-vMpro-vRL enthält die nichtkodierenden Enden des viralen M-Segments. Diese sind jedoch fehlerhaft, wie die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse ergeben hatten. Im Rahmen der folgenden Versuche mussten also die unter 3.2.2.1.1 (S. 76) und 3.2.2.1.2 (S. 78) beschriebenen Punktmutationen des nichtkodierenden 3'-Endes des M-Segments an Position 9 und 15 sowie jene an Position 15 des 5'-Endes korrigiert werden.

Als Ausgangsplasmid dienten 10 ng des bereits existierenden OROV-Minigenom-Expressionsplasmids, dessen Punktmutationen innerhalb der Sequenz der nichtkodierenden Enden mittels PCR behoben werden sollten. Zu diesem Zwecke wurden zwei *Primer*, Esp3I_OROV_vMpro_for_new und Esp3I_OROV_vMpro_vRL_rev_new konzipiert, bei denen das auszutauschende Nukleotid von Sequenzen flankiert wird, die dafür sorgen, dass die *Primer* trotz der Fehlpaarungen noch effektiv an ihre Zielsequenzen binden. In dem mit dieser Hilfe erzeugten Amplifikationsprodukt sind daher die fraglichen Punktmutationen korrigiert. Desweiteren enthielten die konstruierten *Primer*-Sequenzen zur nachfolgenden Umklonierung des korrigierten Minigenoms in den Expressionsvektor pT7-ribo-SM2 jeweils zusätzlich die Sequenz für eine Esp3I-Restriktionsschnittstelle (Methodik und *Primer*-Sequenzen siehe 2.2.9, S. 21).

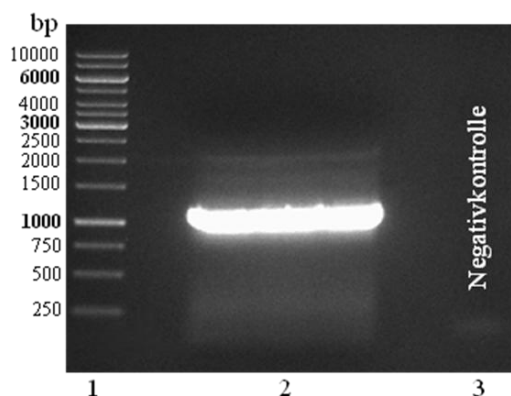


Abbildung 25: Gelbild nach präparativer Agarosegelelektrophorese des amplifizierten OROV-Minigenoms_Neu: Spur 1: 1-kb-DNA-Längenstandard (2 μ l) **Spur 2:** PCR mit cDNA des OROV-Minigenoms der erwarteten Größe von 1,1 kb (eingesetzte Menge: 50 μ l) **Spur 3:** Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne Amplifikat)

Das 1,1 kb große DNA-Fragment (siehe Abbildung 25) wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung extrahiert (siehe 2.2.10, S. 25) und gemäß Kapitel 2.2.11 (S. 26) aufgereinigt. Zur Degradation des Templateplasmids wurde das extrahierte DNA-Fragment vor dem Einsatz in die TA-Klonierung (siehe 2.2.6, S. 18) mit dem Enzym DpnI (siehe 2.2.12, S. 27) behandelt. Acht der in der Blau-Weiß-Differenzierung positiv erscheinenden Klone wurden in Flüssigkultur für 24 h angezüchtet (siehe 2.2.5, S. 17) und anschließend eine Plasmidpräparation gemäß Kapitel 2.2.19 (S. 36) durchgeführt. Zur Überprüfung der Anwesenheit des Inserts OROV-vMpro-vRL_Neu (im Folgenden OROV-Minigenom_Neu genannt) im pCRII-Vektor wurde mit Hilfe der eingefügten Esp3I-Restriktionsschnittstellen, wie in Punkt 2.2.12 (S. 27) beschrieben, ein Kontrollverdau durchgeführt, bei dem bei Anwesenheit des korrigierten *Inserts* zwei Fragmente entstehen sollten: Zum einen das *Insert* mit einer Größe von 1,1 kb und zum anderen die pCRII-Vektorbande mit einer Größe von 4 kb (siehe Abbildung 26, S. 84).

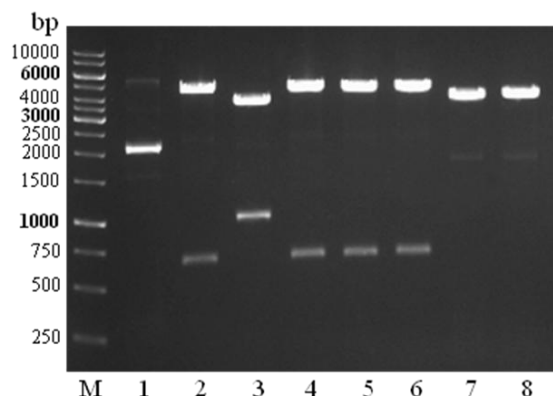


Abbildung 26: Gelbild nach analytischer Agarosegelelektrophorese des Testverdaus der Plasmid-DNA pCRII-OROV-Minigenom_Neu mit Hilfe des Restriktionsenzym *Esp3I* zur Kontrolle des Ligationserfolges: M: Marker: 1-kb-DNA-Längenstandard (2 μ l) Spur 1-8: jeweils 5 μ l des jeweiligen, verdauten Klons 1-8. Lediglich Klon 3 zeigt die erwarteten Fragmente der Größe 4 kb und 1,1 kb.

Da nur ein Klon das *Insert* zu enthalten schien (siehe Abbildung 26 Klon 3), wurde von diesem und dem Zielvektor pT7-ribo-SM2 jeweils ein präparativer Verdau mit dem Restriktionsenzym *Esp3I* angefertigt (siehe Abbildung 27, S. 84). Die Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend die DNA aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

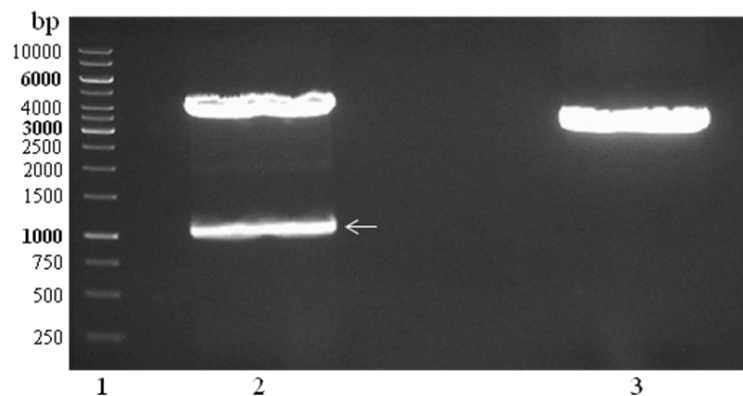


Abbildung 27: Gelbild nach präparativer Agarosegelelektrophorese des präparativen Verdaus der beiden Plasmide pCRII-OROV-Minigenom_Neu und pT7-ribo-SM2 mit dem Restriktionsenzym *Esp3I*: Spur 1: 1-kb-DNA-Längenstandard (2 μ l) Mit 2 ist die Spur des Verdaus von pCRII-OROV-Minigenom_Neu gekennzeichnet (zu extrahierende Bande=*Insert*-Bande OROV-Minigenom_Neu: 1058 bp). Unter 3 ist der entsprechende Verdau von pT7-ribo-SM2 zu sehen (zu extrahierende Bande=Vektorbande pT7-ribo-SM2: 3,2 kb).

Nach Extraktion des *Inserts* und des linearisierten Vektors schloss sich wie bereits für die cDNA der viralen Polymerase ausführlich beschrieben (siehe 3.2.1.2, S. 67) ein analoges Ligationsverfahren an. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *CfrI* (*EaeI*) ein Testverdau angefertigt, in dem bei Anwesenheit des

Inserts im Vektor drei Banden der Größen 2,1 kb, 1,5 kb und 0,7 kb entstehen sollten (siehe 2.2.12, S. 27, siehe Abbildung 28).

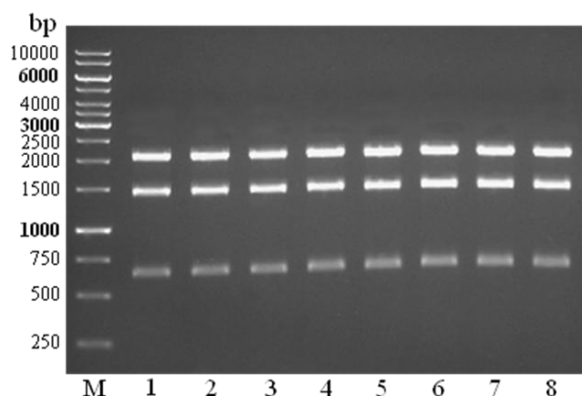


Abbildung 28: Gelbild nach analytischer Agarosegelelektrophorese des Testverdaus der Plasmid-DNA **pT7-ribo-SM2-OROV-Minigenom_Neu** mit Hilfe des Restriktionsenzym **CfrI** zur Kontrolle des **Ligationserfolges**: **M:** Marker: 1-kb-DNA-Längenstandard (2 µl) **Spur 1-8:** jeweils 5 µl des jeweiligen, verdauten Klons 1-8 (erwartete Bandengrößen: 0,7 kb, 1,5 kb und 2,1 kb)

Obwohl alle erhaltenen Klone positiv zu sein schienen, wurden zur Sicherheit und exakten Überprüfung der korrekten Basenabfolge drei dieser Klone unter Verwendung des *Primer*-Paares T7_rev und OROV-Smut-F1_for gemäß Kapitel 2.2.25 (S. 49) sequenziert. Alle Klone wiesen keine Abweichungen in ihrer jeweiligen Nukleotidsequenz auf.

3.2.2.3 Funktionelle Überprüfung des korrigierten Minigenom-Plasmids im OROV-Minireplikon-System

Analog wie bereits unter 3.2.1.3 (S. 73) beschrieben, wurde abermals eine Minireplikon-Kinetik mit dem korrigierten Minigenom-Expressionsplasmid pT7-ribo-SM2-OROV-Minigenom_Neu durchgeführt.

- I. OROV-Minireplikon-System:
pTM1-OROV-L_Neu, pTM1-OROV-N, pT7-ribo-SM2-OROV-Minigenom_Neu
- II. OROV-Minireplikon-System ohne OROV-L = Negativkontrolle:
pUC19, pTM1-OROV-N, pT7-ribo-SM2-OROV-Minigenom_Neu
- III. LACV-Minireplikon-System:
pTM1-LACV-L, pTM1-LACV-N, pT7-ribo-SM2-LACV-Minigenom
- IV. LACV-Minireplikon-System ohne LACV-L = Negativkontrolle:
pUC19, pTM1-LACV-N, pT7-ribo-SM2-LACV-Minigenom

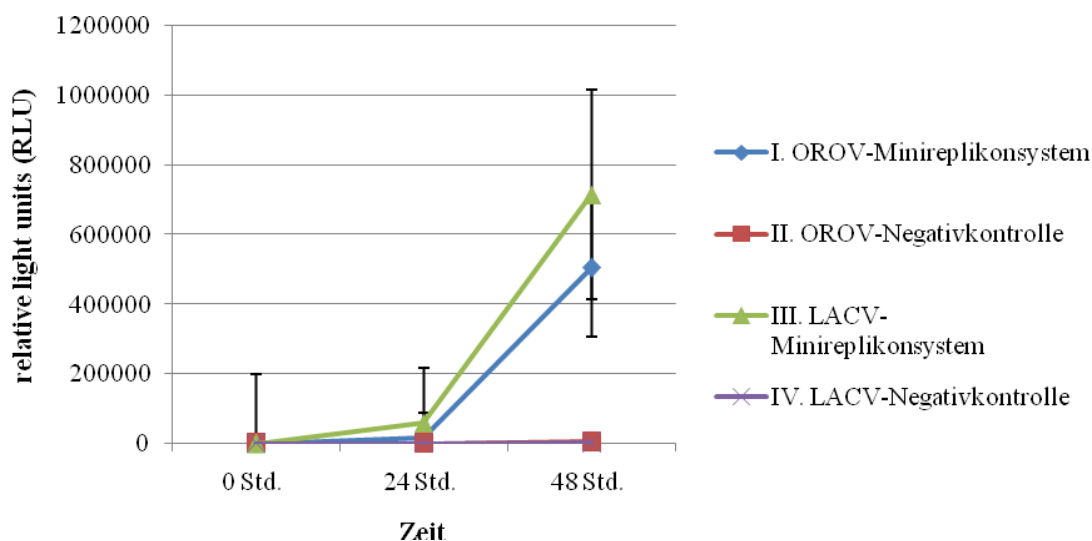


Abbildung 29: Oropouche-Virus-Minireplikon-System unter Verwendung der korrigierten OROV-Polymerase und den korrigierten nichtkodierenden Enden innerhalb des Minigenom-Expressionsplasmids: Als Positivkontrolle fungierte abermals das LACV-Minireplikon-System mit einem deutlichen Aktivitätsanstieg über die Zeit. Erstmals zeigte auch das OROV-Minireplikon-System eine signifikante Zunahme der Aktivität im Vergleich zu seiner Negativkontrolle nach 48 Stunden ($p=0,012$). Verglichen mit den Werten für das LACV-Minireplikon-System kann für das OROV-Minireplikon-System kein signifikanter Unterschied der Aktivität zum Zeitpunkt 0 Std. ($p=0,336$) sowie zum Zeitpunkt 48 Std. ($p=0,290$) festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte vier unabhängiger Experimente.

In diesem Versuchsaufbau zeigte sich erstmalig ein signifikanter Aktivitätsanstieg der Renilla-Luciferase im korrigierten OROV-Minireplikon-System gegenüber der Negativkontrolle nach 48 Stunden (II, $p=0,012$). Allerdings ist in allen Testläufen zu beobachten, dass die Renilla-Luciferase-Werte für das LACV-Minireplikon nicht erreicht werden, sondern das OROV-Minireplikon durchschnittlich 71 % der Aktivität des LACV-Minireplikon-Systems aufweist, wobei diese Differenz als nicht signifikant anzusehen ist ($p=0,290$, siehe Abbildung 29).

3.2.2.4 Mutationsanalyse

Im Rahmen der unter Punkt 3.2.2.2 (S. 82) beschriebenen Klonierungsarbeit zur Korrektur des OROV-Minigenom-Plasmids entstand als Nebenprodukt auch ein Klon, der zusätzlich im Vergleich zum OROV-Minigenom_Neu-Plasmid an Position 8 innerhalb der nichtkodierenden Enden des M-Segments eine Punktmutation aufwies. Zusammen mit dem Ausgangs-Minigenom, dessen nichtkodierende Enden auf der Referenzsequenz des OROV-M-Segments basierten und der im Zuge dieser Arbeit eigens generierten Sequenz für die nichtkodierenden Enden des M-Segments sollte die Frage, ob tatsächlich eine einzelne Punktmutation die fehlende Aktivität des OROV-Minireplikon-Systems erklärt,

oder ob möglicherweise eher die Position und damit die Anzahl der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der nichtkodierenden Enden ausschlaggebend für die fehlende Aktivität des Minireplikonsystems sind, analysiert werden.

Wie bereits in den Kapiteln 3.2.2.1.1 (S. 76) und 3.2.2.1.2 (S.78) beschrieben, weist die publizierte Referenzsequenz der nichtkodierenden Enden des OROV-M-Segments an zwei Stellen innerhalb des 3'-Endes (Position 9, 15) und an Position 15 des 5'-Endes eine Punktmutation auf. Hieraus resultiert als direkte Konsequenz eine weitere Wasserstoffbrückenbindung an Position 9 innerhalb des hochkonservierten Bereichs der nichtkodierenden Enden, wohingegen der Austausch komplementärer Basen an Position 15 beider Enden keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur nach sich zieht (siehe Abbildung 30 A). Im Falle der eigenen, korrigierten Sequenz resultiert aus der bereits beschriebenen Punktmutation an Position 9 innerhalb des nichtkodierenden 3'-Endes der Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung (U-G-Mismatch). Durch den komplementären Basenaustausch an Position 15 (A-T) bleibt hier ebenfalls die Wasserstoffbrückenbindung erhalten (siehe Abbildung 30 B). Die Punktmutation innerhalb der eigenen Sequenz an Position 8 des nichtkodierenden 5'-Endes führt zu einem weiteren Verlust einer vorher bestandenen Wasserstoffbrückenbindung (siehe Abbildung 30 C).

Nukleotidsequenz der nichtkodierenden Enden innerhalb des OROV-Minigenoms:

A: basierend auf der **publizierten Referenzsequenz** des OROV-M-Segments

```

3'- UCAUCACACGAUGGCCGUUGUUUGUCACUGU
      ||||| ||||| ||||| |||||
5'- AGUAGUGUGCUACCGACAACAAUUUUUGACU

```

B: basierend auf der **eigenen, korrigierten Sequenz** des OROV-M-Segments

```

3'- UCAUCACAUGAUGGUCGUUGUUUGUCACUGU
      ||||| ||||| ||||| |||||
5'- AGUAGUGUGCUACCAACAACAAUUUUUGACU

```

C: basierend auf der **eigenen, korrigierten Sequenz mit zusätzlicher Punktmutation** an Position 8 des OROV-M-Segments

```

3'- UCAUCACAUGAUGGUCGUUGUUUGUCACUGU
      ||||| ||||| ||||| |||||
5'- AGUAGUGCGCUACCAACAACAAUUUUUGACU

```

Abbildung 30: Sequenzierungsergebnisse der nichtkodierenden Enden des OROV-M-Segments innerhalb des OROV-Minigenoms: A zeigt die Sequenz der verwendeten nichtkodierenden Enden, die auf der publizierten Referenzsequenz basieren, wohingegen B und C aus eigener Sequenzanalyse hervorgehen mit dem Unterschied, dass bei C eine zusätzliche Punktmutation an Position 8 der nichtkodierenden Enden aufgetreten ist. Direkte Konsequenz der bereits beschriebenen Punktmutationen sind die unterschiedlich

Anzahl und Position stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des hochkonservierten Bereichs.

Nachfolgend wurden mit den drei OROV-Minigenom-Plasmiden (A, B, C) analog wie bereits unter 3.2.1.3 (S. 73) beschrieben, eine OROV-Minireplikon-Kinetik durchgeführt und deren Aktivität in Abhängigkeit von der Mutationskonstellation analysiert.

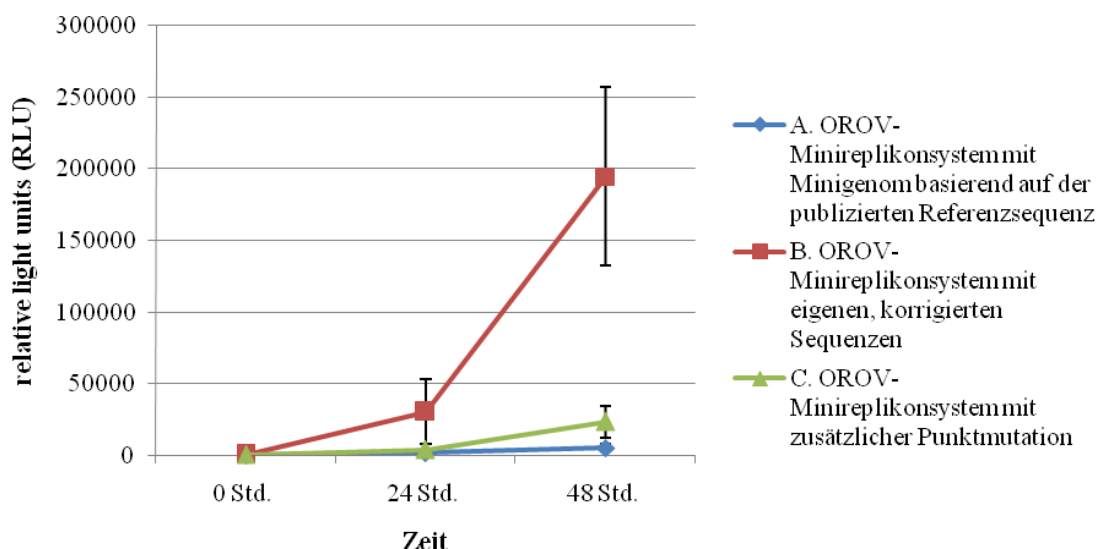


Abbildung 31: Oropouche Virus-Minireplikonsysteme unter Verwendung von Minigenom-Expressionsplasmiden mit unterschiedlicher Anzahl komplementärer Basenpaare innerhalb der nichtkodierenden Enden: Während unter der Verwendung des Minigenom-Expressionsplasmids mit den korrigierten nichtkodierenden Enden (B) ein signifikanter Aktivitätsanstieg zum Zeitpunkt 48 Std. im Vergleich zu A+C zu verzeichnen war ($p=0,009$ bzw. $p=0,011$), zeigte die Verwendung eines Minigenomkonstruktes mit zusätzlicher Punktmutation eine deutlich reduzierte Aktivität (C). Die Verwendung des Konstruktes basierend auf den nichtkodierenden Enden der Referenzsequenz (A) zeigte erneut keine Zunahme der Aktivität über die Zeit. Zum Zeitpunkt 0 Std. bestand unter den drei Konstrukten A-C kein signifikanter Aktivitätsunterschied ($p \geq 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte vier unabhängiger Experimente.

Abhängig von den unterschiedlichen Lokalisationen eingefügter Punktmutationen und den daraus resultierenden Konsequenzen auf Ebene der Sekundärstruktur, zeigte sich im Vergleich zur Verwendung eines Minigenom-Expressionsplasmids mit den eigens korrigierten nichtkodierenden Enden ein signifikanter Aktivitätsverlust sowohl beim zusätzlichen Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung (C, $p=0,011$) als auch beim zusätzlichen Vorhandensein einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung (A, $p=0,009$) nach 48 Stunden. Allerdings ist anzumerken, dass der Verlust einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung durch eine zusätzliche Punktmutation, wenn auch deutlich reduziert, aber im Vergleich zu A allerdings noch einen signifikanten Aktivitätsanstieg aufweist ($p=0,04$, siehe Abbildung 31).

4 Diskussion

4.1 Die drei viralen OROV-Genom-Segmente selbst stellen starke IFN-Induktoren dar

Grundlage für die Untersuchung des strukturellen Aufbaus der 5'-Enden der drei Genomsegmente des Oropouche-Virus stellte die Frage nach der Notwendigkeit der Kodierung eines interferonantagonistischen NSs-Proteins für das einzelne Virus dar, dessen Existenz und Funktion für verschiedene Vertreter der Bunyaviren bereits beschrieben wurde (Bouloy et al. 2001, Weber et al. 2002). Hierzu wurden verschiedene *Reporter Assays* mit nativer, genomischer Virus-RNA und mit dephosphorylierter genomischer Virus-RNA im Hinblick auf die Induktion des IFN- β -Promotors untersucht (siehe 3.1.1, S. 57).

Bei Transfektion genomischer Virus-RNA zeigte sich eine klare Zunahme der Aktivität des Reporters dessen Expression unter der Kontrolle des IFN- β -Promotors stattfindet (siehe Abbildung 7, S. 58), woraus man direkt ableiten konnte, dass die viralen OROV-Genomsegmente wohl selbst starke Induktoren des IFN- β -Promotors sind. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt keinerlei Aussage über das strukturelle Korrelat für die beobachtete Aktivierung des Interferonsystems getroffen werden.

Daher wurde vor dem Hintergrund, dass insbesondere freie Triphosphate am 5'-Ende einzelstängiger viraler RNA als Hauptkennungsmerkmal sog. *pattern recognition receptors* (PRR), den RIG-I, gelten (Pichlmair et al. 2006, Hornung et al. 2006), das analoge Experiment mit zuvor dephosphorylierter OROV-RNA durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der IFN- β -Promotor-Induktion (siehe Abbildung 8, S. 59). Aus diesem Aktivitätsabfall bei gleicher Transfektionseffizienz ließ sich nun schlussfolgern, dass die Interferon-induktive Eigenschaft des Oropouche-Virus im Wesentlichen tatsächlich von den unmodifizierten Triphosphatresten an den 5'-Enden der OROV-Genomsegmente abhängt. Somit stellt der strukturelle Aufbau des Oropouche-Genoms selbst ein starkes Stimulanz für das antivirale Interferonsystem dar und erklärt im Umkehrschluss die Notwendigkeit der Kodierung eines Interferonantagonisten durch das Virus. Ein Grund für die dennoch bestehende partielle Aktivierung des Interferon- β -Promotors stellt zum einen sicherlich die nicht absolute, d.h. nicht 100 %ige Effizienz der

Dephosphorylierungsreaktion dar und muss daher als Restinduktion der übergebliebenen, phosphorylierten RNA-Segmente gewertet werden. Zum anderen handelt sich bei viraler RNA um zellfremde RNA, die nicht nur ein Triphosphat am 5'-Ende besitzt, sondern der auch typische Modifikationen verglichen zu zellulärer, zytoplasmatischer RNA fehlen wie z.B. eine fehlende OH-Methylierung an den ersten Ribose-Resten viraler RNA, die ihrerseits dann über andere intrazytoplasmatische Signalwege, in diesem Fall via den MDA-5-Signalweg als fremd erkannt werden können und auf diese Weise ebenfalls Interferon- β -Produktion induzieren (Zust et al. 2011).

4.2 Das OROV-NSs-Protein hat als spezifisches Ziel die Hemmung der Interferon-Expression

Für das Nichtstrukturprotein NSs einiger Vertreter der Bunyaviren, wie dem BUNV oder dem RVFV, ist schon lange die Funktion eines Interferonantagonisten beschrieben (Weber et al. 2002). Allerdings handelt es sich bei den Nichtstrukturproteinen (NSs) primär um Transkriptioninhibitoren, die nicht nur spezifisch das Typ-I-Interferonsystem hemmen, sondern auf Basis einer globalen Suppression RNA-Polymerase-II-vermittelter Transkriptionsvorgänge (Thomas et al. 2004) auch das RNA-Polymerase-II-abhängig transkribierte Typ-I-Interferonsystem inhibieren (vgl. 1.2.4, S. 9). Aus dieser Beobachtung heraus sollte für das Oropouche-Virus mit Hilfe einer Virustiterbestimmung in OROV-infizierten HEK-293-Zellen mit und ohne Interferonvorbehandlung gezeigt werden, dass Typ-I-Interferone die OROV-Replikation inhibieren können, was im Umkehrschluss auf die Hemmung der Interferon- α/β -Induktion als primäres und spezifisches Ziel der NSs-vermittelten, globalen RNAP-II-vermittelten Transkription hindeuten könnte (siehe 3.1.2, S. 59).

Sowohl im mikroskopischen Bild des Zellverbandes, als auch in der Virustiterbestimmung zeigte sich in Abhängigkeit von der Interferonvorbehandlung sowie der verwendeten Interferonkonzentration ein identisches Bild. Im Vergleich zur Infektion nicht vorbehandelter HEK-293-Zellen konnte in mit Interferon- α -vorbehandelten Zellen die Konfluenz und Integrität des Zellrasens bei vermindertem CPE gewahrt werden. In den Zellkulturüberständen zeigte sich analog eine deutliche Virustiterreduktion. Am deutlichsten fiel dieser Effekt des Interferon- α im Bezug auf eine Oropouche-Virus-Infektion bei der Verwendung von 5000 U IFN- α auf (siehe 3.1.2, S. 59).

Durch die Verwendung von HEK-293-Zellen, die selbst über ein intaktes Interferonsystem verfügen (Graham et al. 1977), scheint die zytoplasmatische OROV-Replikation ausschließlich durch die zytoprotektive, antivirale Wirkung Typ-I-Interferone konzentrationsabhängig gehemmt zu werden. In Zusammenschau mit dem unter 4.1 (S. 89) beschriebenen induktiven Potential der OROV-Genomsegmente selbst und der daraus resultierenden Notwendigkeit der Unterdrückung der Interferon-Induktion kann vermutet werden, dass das tatsächliche Ziel der globalen RNAP-II-Inhibition die Hemmung der Interferon-Induktion darstellt, da sonst in Abwesenheit eines Interferonantagonisten, wie dem OROV-NSs, keine oder nur schwer Virusreplikation gegen das antivirale Typ-I-Interferonsystem möglich wäre.

In einem ähnlichen Experiment zur Charakterisierung des NSs-Proteins des Bunyamwera-Virus (der Prototyp-Spezies des Genus Orthobunyavirus), konnte bereits gezeigt werden, dass das Bunyamwera-Virus-NSs-Protein die Interferon- α/β -Induktion blockiert und damit virale Replikation fördert (Weber et al. 2001, Weber et al. 2002).

Jedoch blieben zu diesem Zeitpunkt immer noch der genaue Angriffspunkt des OROV-NSs und damit der exakte intrazellulär Wirkmechanismus ungeklärt. Aufgrund dessen wurde im Zuge dieser Arbeit versucht, mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz das intrazelluläre Zielmolekül des NSs-Proteins des Oropouche-Virus zu identifizieren (siehe 3.1.3, S. 61). Basierend auf der Identifikation des Mediatorproteins MED 8 als zellulären Interaktionspartner des Bunyamwera-Virus-NSs und als Ursache für die Suppression sowohl der allgemeinen RNAP-II-vermittelten Transkription als auch der antiviralen Interferonantwort (Leonard et al. 2006), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die indirekten Immunfluoreszenztests ebenfalls Teile des sog. Mediatorkomplexes als potentielle zelluläre Zielmoleküle des OROV-NSs getestet. Beim Mediatorkomplex selbst handelt es sich um eine Struktur aus > 20 verschiedenen Untereinheiten, die gemeinsam eine Schlüsselrolle in der Aktivierung RNAP-II-vermittelter mRNA-Synthese einnehmen (Conaway et al. 2005) und somit dessen Inhibition die drastische Hemmung der durch das OROV-NSs ausgelösten RNAP-II-vermittelten Transkriptionsvorgänge erklären könnte.

In den durchgeführten Studien konnte sowohl für die Untereinheit Cdk 8 als auch für MED 30 des Mediatorkomplexes keine Kolokalisation mit dem OROV-NSs-Protein im Zellkern nachgewiesen werden (siehe 3.1.3, S. 61). Somit reiht sich auch das Oropouche-Virus nahtlos in die Beobachtung ein, dass wohl jedes Bunyavirus seinen eigenen zellulären

Interaktionspartner und damit einen individuellen Pathogenitätsmechanismus zu besitzen scheint, der schlussendlich aber in der Hemmung der RNA-Polymerase-II-vermittelten Transkription mündet.

Im Gegensatz zu bereits beschriebenen, viralen Interferonantagonisten mit zytoplasmatischen Angriffspunkten (McInerney und Karlsson Hedestam 2009), lässt die hauptsächliche Lokalisation des OROV-NSs im Zellkern jedoch den Rückschluss zu, dass sich der Ziel- und Wirkort des viralen NSs-Proteins wohl im Nukleus selbst befindet und damit auch der zelluläre Interaktionspartner des viralen NSs-Proteins in diesem Kompartiment zu vermuten ist. Die intranukleäre Lokalisation des zellulären Interaktionspartners viraler Nichtstrukturproteine konnte bereits für andere Vertreter dieser Virusfamilie gezeigt werden (Le May et al. 2004).

Folglich kann man davon ausgehen, dass die virale Interaktion innerhalb der Interferoninduktionskaskade jenseits der Aktivierung von IRF-3 stattfinden muss, da bis zu diesem Schritt die Signaltransduktionskaskade im Zytoplasma lokalisiert ist und erst mit Bildung des Enhanceasoms in den Zellkern verlagert wird (vgl. 1.2.2, S.6). Diese Hypothese konnte bereits in einer weiteren, dieser vorangegangenen Arbeit mit Hilfe von *Reporter Assays* und IFTs auf verschiedenen Ebenen der intrazellulären Signaltransduktion für das OROV-NSs verifiziert werden (Essien 2013).

Ein weiteres Indiz für die Annahme einer intranukleären Interaktion des OROV-NSs stellt das direkte Nebeneinander der beiden markierten Mediatoreinheiten und dem viralen Interferonantagonisten dar. So scheint das virale NSs-Protein möglicherweise an einem anderen, benachbarten Bestandteil der basalen Transkriptionsmaschinerie, wie bereits für andere einzelsträngige RNA-Viren negativer Polarität wie z.B. dem VSV beschrieben, (Yuan et al. 1998), anzugreifen, was die Lokalisation im Kern, aber die nicht vorliegende Kolokalisation mit dem ebenfalls nukleär lokalisierten Mediator-Komplex erklären würde. Zu diesem Zeitpunkt bleibt also der zelluläre Interaktionspartner des NSs-Proteins des Oropouche-Virus unbekannt. Daher sollte in folgenden Experimenten unter Einbeziehungen dieser Ergebnisse insbesondere weitere Bestandteile des Initiationskomplexes der RNA-Polymerase-II-vermittelten Transkription als potentielle Interaktionspartner in Erwägung gezogen und mit Hilfe weiterer Immunfluoreszenztests untersucht werden.

4.3 Das OROV-Minireplikon-System

4.3.1 Sequenzanalyse der viralen Polymerase

Als Vorstufe des Reversen-Genetik-Systems handelt es sich beim Minireplikon-System um ein etabliertes Verfahren, mit dessen Hilfe rekombinante virale Nukleokapside mit einem sog. Reporter-Genom erzeugt werden können und somit die Untersuchung viraler Replikations- und Pathogenitätsmechanismen auf molekularer Ebene im Virus-freien Kontext ermöglichen (vgl. 2.2.26, S. 51).

Auf der Suche nach dem Grund für die Inaktivität des bereits komplett klonierten, T7-Polymerase-abhängigen OROV-Minireplikonsystems wurde der klonierte L-ORF der OROV-Polymerase erneut näher untersucht, da in der vorherigen Sequenzierungsarbeit sowohl in der Nukleotidsequenz, als auch auf Aminosäureebene erhebliche Abweichungen zur publizierten Referenzsequenz (siehe NCBI Reference Sequence: NC_005776.1) aufgefallen waren. Es konnte gezeigt werden, dass der publizierten Sequenz für die Oropouche-Virus-Polymerase insgesamt 6 Nukleotide bzw. 2 AS fehlten, was seinerseits zu einem Austausch von insgesamt 6 AS führte. Die Insertionen wurden bereits z.T. durch einen Abgleich mit anderen Orthobunyavirus-Polymerasen verifiziert (Keisers 2013).

Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt keine definitive Aussage über die Bedeutung der Abweichungen getroffen werden. Aufgrund dessen musste im Rahmen der vorliegenden Arbeit primär davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Abweichungen in der eigenen Sequenz um potentielle Fehler/Mutationen handeln könnte.

Zur erneuten Überprüfung der Nukleotidsequenz des ORFs der viralen Polymerase konnte eine zusätzliche Sequenzierung des gesamten OROV-Genoms, die mit Hilfe einer weiteren Sequenzierungsmethode, der Pyrosequenzierung, generiert wurde, herangezogen werden, die im Falle von Diskrepanzen der Referenzsequenz von der eigenen Nukleotidsequenz ggfs. Aufschluss über die Korrektheit liefern sollte (siehe 3.2.1.1, S. 65).

Am häufigsten handelte es sich bei den Abweichungen zur Referenzsequenz um sog. stumme Mutationen, d.h. Mutationen, die zwar zu einem Nukleotidaustausch führen, allerdings aufgrund der Degeneration des genetischen Codes keine Auswirkung auf AS-Ebene und damit keine Veränderungen für die Struktur der viralen Polymerase nach sich ziehen. Diese Mutationen konnten also im Folgenden zur Erklärung der Inaktivität als OROV-Polymerase-abhängiges Problem vernachlässigt werden. Insgesamt blieben jedoch noch 31 Punktmutationen in der Nukleotidsequenz des OROV-L-ORFs im Vergleich zur

Referenzsequenz übrig, die einen Austausch auf AS-Ebene verursachten und somit eine unklare Auswirkung auf die Funktionsweise der viralen Polymerase haben (vgl. vollständige Sequenzanalyse im Anhang, S. 102). Durch den zusätzlichen Abgleich der Sequenzen mit der L-ORF-Sequenz aus der Pyrosequenzierung blieben schließlich nur vier relevante Punktmutationen in der eigenen Sequenz übrig, während die übrigen durch die Pyrosequenzierung gegenüber der Referenzsequenz verifiziert werden konnten. Interessanterweise sind diese scheinbar relevanten Basenaustausche über den gesamten 6759-bp-umfassenden L-ORF verteilt und können daher nicht einer bestimmten Struktur des Moleküls zugeordnet werden (siehe 3.2.1.1, S. 65). Während es sich bei den beiden Nukleotid-Austauschen an Position 761 und 1389 um konservative Mutationen handelt, bei denen es auf Proteinebene jeweils zum Austausch von Aminosäuren ähnlicher chemischer Eigenschaften kommt (Glycin zu Serin bzw. Lysin zu Arginin), kommt es durch den Nukleotidaustausch an Position 4434 zum Einbau der neutralen AS Glycin anstelle der sauren AS Glutaminsäure und durch die Mutation an Position 4962 zum Einbau von Serin (polar) anstelle von Phenylalanin (unpolar, hydrophob). Diese Austausche können die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Moleküls erheblich beeinflussen und bei Veränderung katalytischer Zentren den Funktionsverlust der viralen Polymerase im Minireplikonsystem erklären.

Durch den zusätzlichen Abgleich mit der Sequenz aus der Pyrosequenzierung scheint nun erstmals nach dem Konsensprinzip aller drei Sequenzen eine korrekte oder zumindest funktionsfähige Nukleotidsequenz für die Oropouche-Virus-Polymerase gefunden zu sein. Allerdings stellt sich an dieser Stelle die Frage nach der potentiellen Ursache für die Diskrepanzen zur publizierten Referenzsequenz. Die eigene Ausgangssequenz beruhte auf dem OROV-Stamm TRVL9760/Trinidad (AF 164531), für den bisher keine vollständige Sequenzinformation vorlag, während die publizierte Referenzsequenz auf dem Stamm BeAn19991 basiert und unterschiedliche Stämme durchaus Modifikationen in ihrer Nukleotidsequenz aufweisen können. Jedoch spricht die Dysfunktion der viralen Polymerase im OROV-Minireplikonsystem eher dafür, dass es sich bei den Diskrepanzen um methodenbedingte Mutationen innerhalb der Referenzsequenz handeln muss, da stammbedingte Abweichungen dennoch für eine funktionsfähige OROV-Polymerase kodieren müssten (siehe 3.2.1.3, S. 73).

Folglich scheint es sich bei den gefundenen Punktmutationen die ausschließlich in der eigenen Sequenz vorkamen, um sog. Klonierungsartefakte zu handeln, deren Existenz zu erheblichen funktionellen Einbußen, sogar zur kompletten Funktionslosigkeit der viralen Polymerase des Oropouche-Virus führen können, da mit der korrigierten Nukleotidsequenz des L-ORFs eindeutig Minireplikonaktivität als Maß für die Funktionsfähigkeit der OROV-Polymerase nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Neben der Nukleotidsequenz ist auch die abgeleitete Sekundärstruktur der nichtkodierenden Enden elementar für die Initiation der viralen Polymerase

Wie bereits in Kapitel 1.1.4 (S. 3) detailliert beschrieben, handelt es sich bei den nichtkodierenden 3'- bzw. 5'-Enden der Bunyaviridae um partiell hochkonservierte, teilkomplementäre, untranslatierte Nukleotidsequenzen, die die Funktion eines Promotors für die virale Polymerase im Rahmen viraler Replikations- und Transkriptionsvorgänge innehaben. Fehler innerhalb dieser Sequenzen können daher in einer Inaktivität viraler Transkriptions- bzw. Replikationsvorgänge resultieren und folglich die Inaktivität des OROV-Minireplikon-Systems erklären. Mit Hilfe einer Adapterligation sowohl an das 3'- als auch an das 5'-Ende aller drei OROV-Genomsegmente konnte unter Erhalt der vollständigen, nichtkodierenden Enden eine cDNA jener synthetisiert und diese insbesondere mit Fokus auf die Nukleotidsequenz der nichtkodierenden 3'- bzw. 5'-Enden mittels RACE-PCR analysiert werden (siehe 3.2.2.1.1, S. 76, 3.2.2.1.2, S. 78). Bei den Sequenzen der nichtkodierenden 3'-Enden zeigte sich für alle drei OROV-Genomsegmente im Vergleich zur publizierten Referenzsequenz an Position 9 des hochkonservierten Bereichs eine Punktmutation von Cytosin zu Uracil. Im Gegensatz dazu konnten die publizierten Sequenzen für die 5'-Enden der drei viralen Genomsegmente größtenteils bestätigt werden. Insbesondere an Position 9 wurde im 5'-Ende keine Abweichungen von der Referenzsequenz beobachtet.

Interessanterweise war es für das nichtkodierende 5'-Ende des viralen S-Segments nicht möglich die vollständige Sequenz zu generieren. Auch durch Modifikationen in der Methodik konnten die ersten 9 Basen nicht in cDNA umgeschrieben werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem S-Segment im Vergleich zu den beiden anderen viralen Genomsegmente möglicherweise um eine sehr stabile und starke Sekundärstruktur handelt, die nicht einfach zu durchbrechen ist. Da jedoch die ersten 9 Basenpaare der

nichtkodierenden Enden für alle bisher untersuchten Orthobunyaviren absolut identisch sind (s. u.), konnte im Analogieschluss von den anderen nichtkodierenden Enden auch auf die vollständige Sequenz des nichtkodierenden 5'-Endes des S-Segments geschlossen werden (Knipe et al. 2006).

Bei Betrachtung beider nichtkodierenden Enden resultiert aus der Punktmutation an Position 9 der UTR ein sog. *U-G-Basenmismatch* und damit der Verlust einer stabilisierenden Wasserstoffbrücke innerhalb des sonst absolut komplementären, hochkonservierten Bereichs der nichtkodierenden Enden. Die weiter stromabwärts gelegenen Abweichungen der Basenabfolge für die 3'-Enden zogen in allen Fällen keine weiteren Veränderungen der Komplementarität im Vergleich zur Referenzsequenz nach sich (siehe 3.2.2.1.1, S. 76).

Bereits 1986 publizierten Lees et al. das gleiche Phänomen für den Prototyp des Genus Orthobunyavirus, dem BUNV, der ebenfalls an Position 9 des hochkonservierten, 11-bp-umfassenden Bereichs der UTR eine Unterbrechung der Komplementarität aufwies (Lees et al. 1986). Auch für weitere Vertreter dieses Genus, wie dem La-Crosse-Virus oder dem Snowshoe hare-Virus ist dieser *U-G-Mismatch* bereits beschrieben worden (Akashi und Bishop 1983, Bishop et al. 1983, Eshita und Bishop 1984). Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Unterbrechung der Komplementarität in den nichtkodierenden Enden der viralen Segmente für die virale Transkription und Replikation von wesentlicher Bedeutung ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Hypothese: Dass Fehler innerhalb der regulierenden Sequenzen an Position 9 sich auf die virale Transkription bzw. Replikation auswirken, konnte bereits eindrücklich durch die absolute Inaktivität des Oropouche-Virus-Minireplikon-Systems bei Verwendung der fehlerhaften, nichtkodierenden Enden des OROV-M-Segments gezeigt werden (siehe 3.2.1.3, S. 73). Wahrscheinlich ist nicht die Nukleotidsequenz der nichtkodierenden Enden an sich die entscheidende Determinante für die Aktivität der viralen Polymerase, sondern die durch die Komplementarität der nichtkodierenden Enden erzeugte Sekundärstruktur. Ein Indiz für diese Annahme bietet die durchgeführte Mutationsanalyse (siehe 3.2.2.4, S. 86), in deren Rahmen gezeigt werden konnte, dass Punktmutationen an unterschiedlichen Stellen unterschiedliche Auswirkungen auf die OROV-Polymeraseaktivität aufweisen. Sind alle 9 Basen der nichtkodierenden Enden komplementär (damit besteht eine vollständige Paarung

der ersten 11 Basenpaare) kommt es möglicherweise zu einer zu starken intermolekularen Bindung der beiden RNA-Enden, sodass es für die virale Polymerase unmöglich ist, die beiden Enden aufzuschmelzen und die Transkription bzw. Replikation zu initiieren. Ist die Komplementarität an Position 9 unterbrochen, so scheint die virale Polymerase nicht nur an die Promotorregion zu binden, sondern auch aktiviert zu werden und virale Transkriptionsvorgänge zu ermöglichen. Ein zusätzlicher Verlust der Komplementarität an Position 7 führt dagegen wieder zu einer deutlich reduzierten Polymeraseaktivität, die durch eine ineffizientere Bindung der Polymerase an die virale Promotorregion erklärt werden könnte. Zusammenfassend resultieren sowohl eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung an Position 9 als auch das zusätzliche Fehlen einer Wasserstoffbrückenbindung an Position 8 im Verlust bzw. in einer drastischen Verminderung der Transkriptions- bzw. Replikationsaktivität im Minireplikon-System. Allerdings zeigte dieses Experiment auch, dass die Tatsache einer Punktmutation nicht alleine die Veränderungen in den gemessenen Aktivitäten erklärt, sondern vielmehr die Position der Veränderung und deren potentielle Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit der Polymerase ausschlaggebend sind. Allerdings gilt an dieser Stelle auch festzuhalten, dass es sich bei der Mutationsanalyse nur um zwei zufällig ausgewählte Mutationen in den nichtkodierenden Enden handelt. Zur Verifizierung dieser Hypothese sollte in einem möglichen Folgeexperiment mit Hilfe gezielter Mutagenese an anderen Positionen des hochkonservierten Bereichs der nichtkodierenden Enden Punktmutationen eingefügt werden; insbesondere auch solche, die keine Auswirkung auf die Komplementarität haben um zu beweisen, dass nicht nur die Nukleotidsequenz an sich, sondern auch die daraus abgeleitete Sekundärstruktur ausschlaggebend für die Initiation der viralen Polymerase ist. Auf der Suche nach der Ursache der Diskrepanz zwischen den publizierten Referenzsequenzen für die nichtkodierenden Enden der OROV-Genomsegmente (die die Basis für das Minigenom des inaktiven OROV-Minireplikon-Systems darstellen) und den eigens generierten Nukleotidsequenzen wurden vor allem die Sequenzierungsarbeiten von Aquino et al. 2003 und 2004 herangezogen, da auf deren Ergebnissen die publizierten Referenzsequenzen für das OROV-Genom basieren. Bei genauerer Betrachtung insbesondere der Methodik der durchgeführten Sequenzierungsarbeiten fiel auf, dass jene Arbeitsgruppe für alle OROV-Genomsegmente zur Synthese der jeweiligen, segmentspezifischen cDNA einen *Primer* für die Anlagerung an das 3'-Ende verwendete,

dessen Nukleotidsequenz *nicht* wie angegeben auf der publizierten Nukleotidsequenz für das hochkonservierte 3'-Ende des genomischen L-Segments des BUNV (Elliott 1989), sondern auf der **anti**genomischen Sequenz des 3'-Endes basierte. Beide Sequenzen sind in den ersten 15 Positionen mit Ausnahme der Position 9 identisch. Demzufolge entstand durch Verwendung dieses *Primers* für die reverse Transkription der genomischen OROV-RNA eine zusätzliche Komplementarität an Position 9 des hochkonservierten Bereichs der nichtkodierenden Enden in der synthetisierten cDNA. Damit lässt sich die Diskrepanz in den nichtkodierenden Enden der Oropouche-Referenzsequenzen im Vergleich zu anderen Orthobunyavirus-Sequenzen und den eigenen Ergebnissen als Folge eines methodisch bedingten Fehlers erklären (Aquino et al. 2003, Aquino und Figueiredo 2004).

4.3.3 Etablierung eines OROV-Minireplikon-Systems

Die Etablierung eines Minireplikon-Systems für das Oropouche-Virus ermöglicht zum einen die molekulare Untersuchung von Transkriptions- und Replikationsmechanismen des Virus und schafft damit die Basis zur Charakterisierung viraler Pathogenitätsprinzipien, zum anderen stellt es eine wichtige Vorstufe des zu etablierenden Reversen-Genetik-Systems für das OROV dar.

Als Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit diente, wie schon unter 3.2 (S. 65) beschrieben, ein bereits komplett kloniertes, T7-Polymerase-abhängiges OROV-Minireplikon-System. Allerdings wies jenes im Vergleich zum bereits etablierten LACV-Minireplikon-System vollständige Inaktivität auf. Folglich war davon auszugehen, dass es sich bei der Ursache für die Inaktivität um eine Komponente der OROV-Expressionsplamide handeln musste. Aufgrund ihrer elementaren Funktion in viralen Transkriptions- und Replikationsvorgängen traten insbesondere zwei Strukturen in den näheren Fokus. Zum einen die OROV-Polymerase selbst und zum anderen die nichtkodierenden Enden der Genomsegmente aufgrund ihrer Promotorfunktion (Knipe et al. 2006). Allerdings wurde bisher davon ausgegangen, dass die nichtkodierenden Enden des OROV-Minigenoms funktionell sein müssten, da in einem „gemischten“ Minireplikon-System die LACV-Polymerase in der Lage war, das OROV-Minigenom zu transkribieren und zu replizieren (Keisers 2013). Auffällig war jedoch, dass die nichtkodierenden Enden der OROV-L-Referenzsequenz (siehe NCBI Reference Sequences: NC_005776) im Vergleich zu allen anderen publizierten Orthobunyavirus-Sequenzen an Position 9 eine

Komplementarität aufwiesen. Daher wurden die Sequenzen beider Komponenten abermals analysiert und die korrigierte Sequenz in die jeweiligen Expressionsplasmide kloniert. Anschließend wurde, wie unter 2.2.27 (S. 53) beschrieben, mit den neuen Konstrukten jeweils Minireplikon-Kinetikmessungen durchgeführt.

Auch nach Korrektur des L-ORFs innerhalb des OROV-L-Expressionsplasmids bei gleichzeitiger Verwendung eines OROV-Minigenoms, das die publizierten nicht-kodierenden Enden enthält, zeigte sich keinerlei Aktivitätsanstieg innerhalb der Kinetikmessung im Vergleich zur Positivkontrolle, dem LACV-Minireplikon-System. Diese Beobachtung ließ die Vermutung zu, dass möglicherweise zusätzliche, fehlerhafte regulatorische Sequenzen die fehlende Transkription bzw. Replikation der jetzt korrekten OROV-Polymerase bedingen. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt eine Inaktivität der OROV-Polymerase nicht eindeutig auszuschließen, da ein unabhängiger Test für die Funktionsüberprüfung nicht zur Verfügung stand.

Nach Korrektur der NCEs (*non-coding ends*) im Minigenom-Expressionsplasmid wurde analog eine Minireplikonkinetikmessung durchgeführt (siehe 3.2.2.3, S. 85). Erstmals zeigte sich nun ein signifikanter Aktivitätsanstieg innerhalb von 48 h im reinen OROV-Minireplikon-System. Aus dieser Beobachtung heraus konnte geschlossen werden, dass beide Komponenten nun funktionell waren, die virale OROV-Polymerase und die regulatorischen, nichtkodierenden Enden, aber ein sensibles System sind und genau aufeinander abgestimmt sein müssen um virale Transkription bzw. Replikation zu ermöglichen. Unter Zuhilfenahme der Ergebnisse der durchgeführten Mutationsanalyse konnte der Grund für die bisherige Inaktivität des Systems geklärt werden (vgl. 3.2.2.4, S. 86). Die korrigierten Punktmutationen in den regulatorische Enden scheinen das Bindungsverhalten der viralen Polymerase so zu verändern (vgl. 4.3.2, S. 95), dass die beiden elementaren Komponenten der Transkriptionsinitiation nicht mehr nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zusammen passten und dies wiederum in vollständiger Inaktivität des gesamten Systems resultierte (siehe 4.3.2, S. 95). Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Punktmutationen in der Polymerase-Sequenz zu einer Verminderung bzw. zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führen. Sowohl das LACV- als auch das OROV-Minireplikon-System zeigte in den Testläufen einen analogen Kinetikverlauf mit endständiger Plateaubildung als Ausdruck der Stagnation der Reportergenexpression (Blakqori et al. 2003). Auffallend ist jedoch, dass in allen

Testläufen das Aktivitätsniveau des OROV-Minireplikon-Systems unter dem des als Kontrolle verwendeten LACV-Minireplikon-System lag. Dies könnte folgende Gründe haben:

Die LACV-Polymerase scheint ein wesentlich robusteres und aktiveres Enzym darzustellen, da es wie unter 3.2 (S. 65) beschrieben, sogar im „gemischten Minireplikon-System“ bei der Verwendung eines OROV-Minigenoms mit fehlerhaften regulatorischen Sequenzen zu einem erheblichen Aktivitätsanstieg kam. Zudem zeigt das LACV-Minireplikon-Systems auch im Vergleich zu anderen Bunyavirus-Minireplikon-Systemen, wie z.B. dem BUNV-Minireplikon-System deutlich stärkere Aktivität (persönliche Mitteilung von Prof. Friedemann Weber, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg).

Darüber hinaus sind die eingesetzten Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten des OROV-Minireplikon-Systems möglicherweise noch nicht optimal, sodass unter Umständen die Effizienz und damit die Aktivität des gesamten OROV-Minireplikon-Systems durch Variation der Mengenverhältnisse noch verbessert werden kann.

Unter Verwendung der korrigierten Sequenzen für den L-ORF der viralen Polymerase des Oropouche-Virus und für die nichtkodierenden Enden der drei Genomsegmente konnte nun erstmals ein funktionsfähiges T7-Polymerase-basiertes OROV-Minireplikon-System etabliert werden, auf dessen Basis nun in folgenden Experimenten ein Reverses-Genetik-System für das OROV generiert werden kann. Dieses wird benötigt, um sog. *virus-like particles* (VLPs) oder auch replikationskompetente rekombinante Viruspartikel, denen die genetische Information für einen Interferonantagonisten (NSs) fehlt, zu generieren, die mögliche Kandidaten für einen bisher noch nicht verfügbaren OROV-Impfstoff darstellen. Für das RVFV konnte bereits gezeigt werden, dass die Immunisierung mit RVFV-VLPs zuverlässig vor Infektionen mit dem Wildtypvirus schützt (Pichlmair et al. 2010). Auch für die Strategie, rekombinante Viruspartikel mit einem funktionslosen bzw. deletierten Gen, das für den viralen Interferonantagonisten kodiert, für die Impfung einzusetzen, konnte bereits Wirksamkeit nachgewiesen werden: Rekombinante replikationskompetente Influenza-A- und -B-Viruspartikel ohne funktionellem NS1-Gen können effizient schützende Immunität induzieren (Talon et al. 2000).

5 Zusammenfassung

Beim Oropouche-Virus (OROV) handelt es sich um ein RNA-Virus mit einem segmentierten, einzelsträngigen Genom negativer Polarität, das zur Familie der Bunyaviren gehört. Das durch dieses Virus verursachte Oropouche-Fieber tritt in weiten Teilen Zentral- und Südamerikas auf und ist nach dem Dengue-Fieber die häufigste Arboviruserkrankung Brasiliens. Hauptcharakteristikum dieser Erkrankung ist hohes Fieber, begleitet von grippeähnlichen Symptomen. Darüber hinaus weist das Virus ein erhebliches endemisches Potential ohne derzeitige Therapieoptionen auf.

Als spezifischer Pathogenitätsmechanismus für diese Virusfamilie gilt die Kodierung eines interferonantagonistischen Nichtstrukturproteins (NSs), mit dessen Hilfe durch Hemmung der RNAP-II-vermittelten Transkription die Induktion des antiviralen Interferonsystems inhibiert und somit eine effiziente Virusreplikation ermöglicht wird. So kommt es auch nach einer OROV-Infektion nicht zur Typ-I-Interferon-Induktion. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die OROV-RNA-Genomsegmente aufgrund ihrer Triphosphat-Reste am 5'-Ende selbst starke Induktoren des antiviralen Interferonsystems darstellen. Des Weiteren war zu beobachten, dass Typ-I-Interferon die OROV-Replikation suffizient hemmen kann. Folglich benötigt das Virus für die effiziente Replikation einen Interferonantagonisten. Für das OROV-NSs ist bereits nachgewiesen worden, dass es die Aktivierung des IFN- β -Promotors verhindern kann. Allerdings sind die zellulären Interaktionspartner bisher weiter unbekannt, können aber aufgrund der nukleären Lokalisation des NSs wohl auf intranukleäre Bestandteile beschränkt werden.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines funktionsfähigen OROV-Minireplikon-Systems. Erstmals konnte ein funktionelles OROV-Minireplikon-System etabliert werden. Die durchgeführten Sequenzanalysen zeigten, dass die publizierten OROV-Referenzsequenzen sowohl für die virale Polymerase als auch für die nichtkodierenden Enden fehlerhaft sind. Insbesondere bei den nichtkodierenden Enden scheint nicht nur die Nukleotidsequenz, sondern auch die dadurch definierte Sekundärstruktur aufgrund der veränderten Interaktion mit der viralen Polymerase ausschlaggebend für Transkription bzw. Replikation zu sein.

6 Anhang: Abbildung 32

Alignment Report of OROV-L_protein.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)
Freitag, 18. Januar 2013 15:13

Majority	M	S	Q	L	L	N	Q	Y	R	N	R	I	L	H	C	R	E	P	E	I	A	K	D	I	W	R	D	L	L	N	D	R	H	N	Y	F	S	R	E	F	F	C	R	A	A	N	L	E	Y	R	
	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190																																				
OROV-L_NC_005776	M	S	Q	L	L	N	Q	Y	R	N	R	I	L	H	C	R	E	P	E	I	A	K	D	I	W	R	D	L	L	N	D	R	H	N	Y	F	S	R	E	F	F	C	R	A	A	N	L	E	Y	R	
OROV-L_contig_1_corrected	M	S	Q	L	L	N	Q	Y	R	N	R	I	L	H	C	R	E	P	E	I	A	K	D	I	W	R	D	L	L	N	D	R	H	N	Y	F	S	R	E	F	F	C	R	A	A	N	L	E	Y	R	
OROV-L_own_sequencing	M	S	Q	L	L	N	Q	Y	R	N	R	I	L	H	C	R	E	P	E	I	A	K	D	I	W	R	D	L	L	N	D	R	H	N	Y	F	S	R	E	F	F	C	R	A	A	N	L	E	Y	R	
Majority	N	D	V	P	A	E	D	I	C	A	E	V	L	D	G	Y	K	A	R	K	V	R	F	C	T	P	D	N	Y	L	L	H	D	G	K	M	Y	I	I	D	F	F	K	V	S	V	D	D	R	S	S
	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340																																				
OROV-L_NC_005776	N	D	V	P	A	E	D	I	C	A	E	V	L	D	G	Y	K	A	R	K	V	R	F	C	T	P	D	N	Y	L	L	H	D	G	K	M	Y	I	I	D	F	F	K	V	S	V	D	D	R	S	S
OROV-L_contig_1_corrected	N	D	V	P	A	E	D	I	C	A	E	V	L	D	G	Y	K	A	R	K	V	R	F	C	T	P	D	N	Y	L	L	H	D	G	K	M	Y	I	I	D	F	F	K	V	S	V	D	D	R	S	S
OROV-L_own_sequencing	N	D	V	P	A	E	D	I	C	A	E	V	L	D	G	Y	K	A	R	K	V	R	F	C	T	P	D	N	Y	L	L	H	D	G	K	M	Y	I	I	D	F	F	K	V	S	V	D	D	R	S	S
Majority	R	I	T	R	E	K	Y	N	E	I	F	G	E	V	F	N	P	E	G	V	D	F	E	I	V	I	I	R	L	D	P	S	N	M	A	I	H	V	D	S	R	D	F	M	N	T	I	G	P	I	
	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490																																				
OROV-L_NC_005776	R	I	T	R	E	K	Y	N	E	I	F	G	E	V	F	N	P	E	G	V	D	F	E	I	V	I	I	R	L	D	P	S	N	M	A	I	H	V	D	S	R	D	F	M	N	T	I	G	P	I	
OROV-L_contig_1_corrected	R	I	T	R	E	K	Y	N	E	I	F	G	E	V	F	N	P	E	G	V	D	F	E	I	V	I	I	R	L	D	P	S	N	M	A	I	H	V	D	S	R	D	F	M	N	T	I	G	P	I	
OROV-L_own_sequencing	R	I	T	R	E	K	Y	N	E	I	F	G	E	V	F	N	P	E	G	V	D	F	E	I	V	I	I	R	L	D	P	S	N	M	A	I	H	V	D	S	R	D	F	M	N	T	I	G	P	I	
Majority	T	L	N	I	S	M	Q	W	F	F	D	M	K	D	F	L	F	G	K	F	R	D	D	K	F	H	A	I	I	S	Q	G	E	F	T	M	T	L	P	W	I	E	E	D	T	P	E	L	L		
	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640																																				
OROV-L_NC_005776	T	L	N	I	S	M	Q	W	F	F	D	M	K	D	F	L	F	G	K	F	R	D	D	K	F	H	A	I	I	S	Q	G	E	F	T	M	T	L	P	W	I	E	E	D	T	P	E	L	L		
OROV-L_contig_1_corrected	T	L	N	I	S	M	Q	W	F	F	D	M	K	D	F	L	F	G	K	F	R	D	D	K	F	H	A	I	I	S	Q	G	E	F	T	M	T	L	P	W	I	E	E	D	T	P	E	L	L		
OROV-L_own_sequencing	T	L	N	I	S	M	Q	W	F	F	D	M	K	D	F	L	F	G	K	F	R	D	D	K	F	H	A	I	I	S	Q	G	E	F	T	M	T	L	P	W	I	E	E	D	T	P	E	L	L		
Majority	T	H	P	I	Y	N	E	F	M	N	S	M	P	E	A	E	Q	A	L	F	K	E	A	L	E	F	K	S	F	G	A	E	K	W	N	I	F	L	K	G	V	M	S	K	Y	G	E	Y	K		
	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790																																				
OROV-L_NC_005776	T	H	P	I	Y	N	E	F	M	N	S	M	P	E	A	E	Q	A	L	F	K	E	A	L	E	F	K	S	F	G	A	E	K	W	N	I	F	L	K	G	V	M	S	K	Y	G	E	Y	K		
OROV-L_contig_1_corrected	T	H	P	I	Y	N	E	F	M	N	S	M	P	E	A	E	Q	A	L	F	K	E	A	L	E	F	K	S	F	G	A	E	K	W	N	I	F	L	K	G	V	M	S	K	Y	G	E	Y	K		
OROV-L_own_sequencing	T	H	P	I	Y	N	E	F	M	N	S	M	P	E	A	E	Q	A	L	F	K	E	A	L	E	F	K	S	F	G	A	E	K	W	N	I	F	L	K	G	V	M	S	K	Y	G	E	Y	K		
Majority	E	F	T	K	G	H	A	H	S	I	F	L	T	T	G	D	Y	P	K	P	D	K	N	Q	I	S	A	G	W	R	E	M	V	N	R	V	S	S	E	R	D	M	S	N	D	I	N	Q	E	K	
	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940																																				
OROV-L_NC_005776	E	F	T	K	G	H	A	H	S	I	F	L	T	T	G	D	Y	P	K	P	D	K	N	Q	I	S	A	G	W	R	E	M	V	N	R	V	S	S	E	R	D	M	S	N	D	I	N	Q	E	K	
OROV-L_contig_1_corrected	E	F	T	K	G	H	A	H	S	I	F	L	T	T	G	D	Y	P	K	P	D	K	N	Q	I	S	A	G	W	R	E	M	V	N	R	V	S	S	E	R	D	M	S	N	D	I	N	Q	E	K	
OROV-L_own_sequencing	E	F	T	K	G	H	A	H	S	I	F	L	T	T	G	D	Y	P	K	P	D	K	N	Q	I	S	A	G	W	R	E	M	V	N	R	V	S	S	E	R	D	M	S	N	D	I	N	Q	E	K	

Abbildung 32: AS-Alignment der OROV-Polymerase (S. 102-109): Vergleichende Analyse der AS-Abfolge der Referenzsequenz (NC_005776), der Pyrosequenzierung (contig_1_corrected) und der eigenen Sequenz (own sequencing). Die Kästchen markieren nur Mutationen mit Auswirkungen auf die AS-Sequenz.

Alignment Report of OROV-L_protein.meg ClustaW (Slow/Accurate, Gonnet)
 Freitag, 18. Januar 2013 15:14

Majority	V S S P G L F L M T S C L L F N G N K S L E F D K L L G F S F F T S I S I T T K T M L S L T E P S R Y	
	1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990	
OROV-L_NC_005776	V S S P G L F L M T S C L L F N G N K S L E F D K L L G F S F F T S I S I T T K A M L S L T E P S R Y	650
OROV-L_contig_1_corrected	V S S P G L F L M T S C L L F N G N K S L E F D K L L G F S F F T S I S I T T K T M L S L T E P S R Y	650
OROV-L_own_sequencing	V S S P G L F L M T S C L L F N G N K S L E F D K L L G F S F F T S I S I T T K T M L S L T E P S R Y	650
Majority	M I M N S L A V S S H V R E Y I S E K F S P Y T K T S F S V V M T D L I K K G C Y S A Y E Q R K K V	
	2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140	
OROV-L_NC_005776	M I M N S L A V S S H V R E Y I S E K F S P Y T K T S F S V V M T D L I K K G C Y S A Y E Q R K K V	700
OROV-L_contig_1_corrected	M I M N S L A V S S H V R E Y I S E K F S P Y T K T S F S V V M T D L I K K G C Y S A Y E Q R K K V	700
OROV-L_own_sequencing	M I M N S L A V S S H V R E Y I S E K F S P Y T K T S F S V V M T D L I K K G C Y S A Y E Q R K K V	700
Majority	Q I R D I K L T D Y D I T Q K G V D S K R D L K S I W F P G K V N L K E Y L N Q I Y L P F Y F N S K	
	2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290	
OROV-L_NC_005776	Q I R D I K L T D Y D I T Q K G V D S K R D L K S I W F P G K V N L K E Y L N Q I Y L P F Y F N S K	750
OROV-L_contig_1_corrected	Q I R D I K L T D Y D I T Q K G V D S K R D L K S I W F P G K V N L K E Y L N Q I Y L P F Y F N S K	750
OROV-L_own_sequencing	Q I R D I K L T D Y D I T Q K G V D S K R D L K S I W F P G K V N L K E Y L N Q I Y L P F Y F N S K	750
Majority	G L H E K H H V L I D L A K T V L E I E K E Q R E S L P E P W S E I P A K Q T V N L N V L I Y S I A	
	2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440	
OROV-L_NC_005776	G L H E K H H V L I D L A K T V L E I E K E Q R E S L P E P W S E I P A K R L S L N V L I Y S L Q	799
OROV-L_contig_1_corrected	G L H E K H H V L I D L A K T V L E I E K E Q R E S L P E P W S E I P A K Q T V N L N V L I Y S I A	800
OROV-L_own_sequencing	G L H E K H H V L I D L A K T V L E I E K E Q R E S L P E P W S E I P A K Q T V N L N V L I Y S I A	800
Majority	R N L N L D T S R H N F V R S R V E N A N N F N R S I T T I S T F T S S K S C I K I G D F E E E K K	
	2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580	
OROV-L_NC_005776	- E L N L D T S R H N F V R S R V E N A N N F N R S I T T I S T F T S S K S C I K I G D F E E E K R	848
OROV-L_contig_1_corrected	R N L N L D T S R H N F V R S R V E N A N N F N R S I T T I S T F T S S K S C I K I G D F E E E K K	850
OROV-L_own_sequencing	R N L N L D T S R H N F V R S R V E N A N N F N R S I T T I S T F T S S K S C I K I G D F E E E K K	850
Majority	R K T K N D T K K L A K D I S K L T I A N P A F L D E I T N E H E I R H S T Y E D L K Q S I P D Y T	
	2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730	
OROV-L_NC_005776	E K L R M I Q K K L A K D I S K L T I A N P A F L D E I T N E H E I R H S T Y E D L K Q S I P D Y T	898
OROV-L_contig_1_corrected	R K T K N D T K K L A K D I S K L T I A N P A F L D E I T N E H E I R H S T Y E D L K Q S I P D Y T	900
OROV-L_own_sequencing	R K T K N D T K K L A K D I S K L T I A N P A F L D E I T N E H E I R H S T Y E D L K Q S I P D Y T	900

Alignment Report of OROV-L_protein.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)
 Freitag, 18. Januar 2013 15:14

Majority	E K I C L T F G N Q A N M K K T Y L T N F I K E F V S L F N I H G E P F S I Y G R F L L T A V G D C	
	3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780	
OROV-L_NC_005776	E K I C L T F G N Q A N M K K T Y L T N F I K E F V S L F N I H G E P F S I Y G R F L L T A V G D C	1248
OROV-L_contig_1_corrected	E K I C L T F G N Q A N M K K T Y L T N F I K E F V S L F N I H G E P F S I Y G R F L L T A V G D C	1250
OROV-L_own_sequencing	E K I C L T F G N Q A N M K K T Y L T N F I K E F V S L F N I H G E P F S I Y G R F L L T A V G D C	1250
Majority	A Y L G P Y E D L A S R L S A T Q T A I K H G C C P P S L A W V S I A L N H H W I T H T T Y N M L P G Q	
	3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930	
OROV-L_NC_005776	A Y L G P Y E D L A S R L S A T Q T A I K H G C C P P S L A W V S I A L N H H W I T H T T Y N M L P G Q	1298
OROV-L_contig_1_corrected	A Y L G P Y E D L A S R L S A T Q T A I K H G C C P P S L A W V S I A L N H H W I T H T T Y N M L P G Q	1300
OROV-L_own_sequencing	A Y L G P Y E D L A S R L S A T Q T A I K H G C C P P S L A W V S I A L N H H W I T H T T Y N M L P G Q	1300
Majority	N N D P L P F F P T N N R S E I P V E M C G I L E S D L S T I A L T G L E A G N V T F L T N I A R K	
	3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080	
OROV-L_NC_005776	N N D P L P F F P T N N R S E I P V E M C G I L E S D L S T I A L T G L E A G N V T F L T N I A R K	1348
OROV-L_contig_1_corrected	N N D P L P F F P T N N R S E I P V E M C G I L E S D L S T I A L T G L E A G N V T F L T N I A R K	1350
OROV-L_own_sequencing	N N D P L P F F P T N N R S E I P V E M C G I L E S D L S T I A L T G L E A G N V T F L T N I A R K	1350
Majority	L S S P I L Q R E S I Q D Q Y N S I E K W D L S K L S Q I D I L R L K M L R Y I S L D S S V T S D D	
	4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230	
OROV-L_NC_005776	L S S P I L Q R E S I Q D Q Y N S I E K W D L S K L S Q I D I L R L K M L R Y I S L D S S V T S D D	1398
OROV-L_contig_1_corrected	L S S P I L Q R E S I Q D Q Y N S I E K W D L S K L S Q I D I L R L K M L R Y I S L D S S V T S D D	1400
OROV-L_own_sequencing	L S S P I L Q R E S I Q D Q Y N S I E K W D L S K L S Q I D I L R L K M L R Y I S L D S S V T S D D	1400
Majority	G M G E T S E M R S R S L L T P R K F T T S G S L N R L K S Y K D F Q D I I A D E D K T N E L F E N	
	4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380	
OROV-L_NC_005776	G M G E T S E M R S R S L L T P R K F T T S G S L N R L K S Y K D F Q D I I A D E D K T N E L F E N	1448
OROV-L_contig_1_corrected	G M G E T S E M R S R S L L T P R K F T T S G S L N R L K S Y K D F Q D I I A D E D K T N E L F E N	1450
OROV-L_own_sequencing	G M G E T S E M R S R S L L T P R K F T T S G S L N R L K S Y K D F Q D I I A D E D K T N E L F E N	1450
Majority	F I R H P E L L V T K G E T F E E F V N T I L F R Y N S K K F K E S L S I Q N P A Q L F I E Q I L F	
	4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530	
OROV-L_NC_005776	F I R H P E L L V T K G E T F E E F V N T I L F R Y N S K K F K E S L S I Q N P A Q L F I E Q I L F	1498
OROV-L_contig_1_corrected	F I R H P E L L V T K G E T F E E F V N T I L F R Y N S K K F K E S L S I Q N P A Q L F I E Q I L F	1500
OROV-L_own_sequencing	F I R H P E L L V T K G E T F E E F V N T I L F R Y N S K K F K E S L S I Q N P A Q L F I E Q I L F	1500

Alignment Report of OROV-L_protein.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)
Freitag, 18. Januar 2013 15:14

Majority	S	N	K	P	V	I	D	Y	T	S	I	H	D	K	I	F	G	L	Q	D	M	P	G	I	E	E	L	D	T	I	I	G	R	K	T	F	V	E	S	Y	Q	I	V	D	D	L	S	N	L	
	4540	4550	4560	4570	4580	4590	4600	4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680																																			
OROV-L_NC_005776	S	N	K	P	V	I	D	Y	T	S	I	H	D	K	I	F	G	L	Q	D	M	P	G	I	E	E	L	D	T	I	I	G	R	K	T	F	V	E	S	Y	Q	I	V	D	D	L	S	N	L	
OROV-L_contig_1_corrected	S	N	K	P	V	I	D	Y	T	S	I	H	D	K	I	F	G	L	Q	D	M	P	G	I	E	E	L	D	T	I	I	G	R	K	T	F	V	E	S	Y	Q	I	V	D	D	L	S	N	L	
OROV-L_own_sequencing	S	N	K	P	V	I	D	Y	T	S	I	H	D	K	I	F	G	L	Q	D	M	P	G	I	E	E	L	D	T	I	I	G	R	K	T	F	V	E	S	Y	Q	I	V	D	D	L	S	N	L	
Majority	T	L	D	I	N	D	V	K	T	I	F	A	F	C	L	M	N	D	P	L	I	T	S	A	N	N	I	I	M	S	V	K	G	H	S	Q	E	R	I	G	Q	S	A	C	K	M	P	E	V	
	4690	4700	4710	4720	4730	4740	4750	4760	4770	4780	4790	4800	4810	4820	4830																																			
OROV-L_NC_005776	T	L	D	I	N	D	V	K	T	I	F	A	F	C	L	M	N	D	P	L	I	T	S	A	N	N	I	I	M	S	V	K	G	H	S	Q	E	R	I	G	Q	S	A	C	K	M	P	E	V	
OROV-L_contig_1_corrected	T	L	D	I	N	D	V	K	T	I	F	A	F	C	L	M	N	D	P	L	I	T	S	A	N	N	I	I	M	S	V	K	G	H	S	Q	E	R	I	G	Q	S	A	C	K	M	P	E	V	
OROV-L_own_sequencing	T	L	D	I	N	D	V	K	T	I	F	A	F	C	L	M	N	D	P	L	I	T	S	A	N	N	I	I	M	S	V	K	G	H	S	Q	E	R	I	G	Q	S	A	C	K	M	P	E	V	
Majority	R	S	L	K	L	I	H	Y	S	P	A	V	L	R	A	Y	V	R	G	P	T	N	V	P	N	V	D	I	D	E	L	A	R	D	L	S	H	L	E	D	F	I	Q	S	T	K	L	R	E	
	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900	4910	4920	4930	4940	4950	4960	4970	4980																																			
OROV-L_NC_005776	R	S	L	K	L	I	H	Y	S	P	A	V	L	R	A	Y	V	R	G	P	T	N	V	P	N	V	D	I	D	E	L	A	R	D	L	S	H	L	E	D	F	I	Q	S	T	K	L	R	E	
OROV-L_contig_1_corrected	R	S	L	K	L	I	H	Y	S	P	A	V	L	R	A	Y	V	R	G	P	T	N	V	P	N	V	D	I	D	E	L	A	R	D	L	S	H	L	E	D	F	I	Q	S	T	K	L	R	E	
OROV-L_own_sequencing	R	S	L	K	L	I	H	Y	S	P	A	V	L	R	A	Y	V	R	G	P	T	N	V	P	N	V	D	I	D	E	L	A	R	D	L	S	H	L	E	D	F	I	Q	S	T	K	L	R	E	
Majority	N	M	R	E	R	I	E	I	N	E	K	R	H	L	G	R	D	F	K	F	E	I	K	E	L	T	R	F	Y	Q	V	C	Y	D	Y	I	K	S	T	E	H	K	V	K	V	F	I	L	P	Y
	4990	5000	5010	5020	5030	5040	5050	5060	5070	5080	5090	5100	5110	5120	5130																																			
OROV-L_NC_005776	N	M	R	E	R	I	E	I	N	E	K	R	H	L	G	R	D	F	K	F	E	I	K	E	L	T	R	F	Y	Q	V	C	Y	D	Y	I	K	S	T	E	H	K	V	K	V	F	I	L	P	Y
OROV-L_contig_1_corrected	N	M	R	E	R	I	E	I	N	E	K	R	H	L	G	R	D	F	K	F	E	I	K	E	L	T	R	F	Y	Q	V	C	Y	D	Y	I	K	S	T	E	H	K	V	K	V	F	I	L	P	Y
OROV-L_own_sequencing	N	M	R	E	R	I	E	I	N	E	K	R	H	L	G	R	D	F	K	F	E	I	K	E	L	T	R	F	Y	Q	V	C	Y	D	Y	I	K	S	T	E	H	K	V	K	V	F	I	L	P	Y
Majority	K	V	F	T	S	I	E	F	C	G	A	L	T	G	N	L	I	N	D	K	L	W	Y	I	T	H	Y	L	K	N	I	V	S	T	T	H	K	A	Q	I	S	S	P	E	L	E	L	Q	I	
	5140	5150	5160	5170	5180	5190	5200	5210	5220	5230	5240	5250	5260	5270	5280																																			
OROV-L_NC_005776	K	V	F	T	S	I	E	F	C	G	A	L	T	G	N	L	I	N	D	K	L	W	Y	I	T	H	Y	L	K	N	I	V	S	T	T	H	K	A	Q	I	S	S	P	E	L	E	L	Q	I	
OROV-L_contig_1_corrected	K	V	F	T	S	I	E	F	C	G	A	L	T	G	N	L	I	N	D	K	L	W	Y	I	T	H	Y	L	K	N	I	V	S	T	T	H	K	A	Q	I	S	S	P	E	L	E	L	Q	I	
OROV-L_own_sequencing	K	V	F	T	S	I	E	F	C	G	A	L	T	G	N	L	I	N	D	K	L	W	Y	I	T	H	Y	L	K	N	I	V	S	T	T	H	K	A	Q	I	S	S	P	E	L	E	L	Q	I	
Majority	A	D	E	A	L	R	L	V	A	H	F	A	D	T	F	L	A	S	E	S	R	I	Q	F	L	K	K	I	E	E	F	T	Y	K	G	I	P	V	K	H	L	Y	S	K	I	K	N	S	K	
	5290	5300	5310	5320	5330	5340	5350	5360	5370	5380	5390	5400	5410	5420	5430																																			
OROV-L_NC_005776	A	D	E	A	L	R	L	V	A	H	F	A	D	T	F	L	A	S	E	S	R	I	Q	F	L	K	K	I	E	E	F	T	Y	K	G	I	P	V	K	H	L	Y	S	K	I	K	N	S	K	
OROV-L_contig_1_corrected	A	D	E	A	L	R	L	V	A	H	F	A	D	T	F	L	A	S	E	S	R	I	Q	F	L	K	K	I	E	E	F	T	Y	K	G	I	P	V	K	H	L	Y	S	K	I	K	N	S	K	
OROV-L_own_sequencing	A	D	E	A	L	R	L	V	A	H	F	A	D	T	F	L	A	S	E	S	R	I	Q	F	L	K	K	I	E	E	F	T	Y	K	G	I	P	V	K	H	L	Y	S	K	I	K	N	S	K	

Alignment Report of OROV-L_protein.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)
Freitag, 18. Januar 2013 15:14

Majority	A F H K A L I S E C D K F E E A F D F L D M G F C S N E N L S I L E E I H W I I S Y L K T N Q W S T
6340	6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480
OROV-L_NC_005776	A F H K A L I S E C D K F E E A F D F L D M G F C S N E N L S I L E E I H W I I S Y L K T N Q W S T 2148
OROV-L_contig_1_corrected	A F H K A L I S E C D K F E E A F D F L D M G F C S N E N L S I L E E I H W I I S Y L K T N Q W S T 2150
OROV-L_own_sequencing	A F H K A L I S E C D K F E E A F D F L D M G F C S N E N L S I L E E I H W I I S Y L K T N Q W S T 2150
Majority	E L D N C I H M C M Y R N G Y D A E Y H K F D I P S K F L K D P I N R T I N W T E V I E F I L L I E
6490	6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630
OROV-L_NC_005776	E L D N C I H M C M Y R N G Y D A E Y H K F D I P S K F L K D P I N R T I N W T E V I E F I L L I E 2198
OROV-L_contig_1_corrected	E L D N C I H M C M Y R N G Y D A E Y H K F D I P S K F L K D P I N R T I N W T E V I E F I L L I E 2200
OROV-L_own_sequencing	E L D N C I H M C M Y R N G Y D A E Y H K F D I P S K F L K D P I N R T I N W T E V I E F I L L I E 2200
Majority	D F Q T K I E P W S S M K S H F C S K A H S V A L E C M K N E K R S L A E F V D R R S K K T G K S K F
6640	6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780
OROV-L_NC_005776	D F Q T K I E P W S S M K S H F C S K A H S V A L E C M K N E K R S L A E F V D R R S K K T G K S K F 2248
OROV-L_contig_1_corrected	D F Q T K I E P W S S M K S H F C S K A H S V A L E C M K N E K R S L A E F V D R R S K K T G K S K F 2250
OROV-L_own_sequencing	D F Q T K I E P W S S M K S H F C S K A H S V A L E C M K N E K R S L A E F V D R R S K K T G K S K F 2250
Majority	D F .
6790	D F .
OROV-L_NC_005776	D F .
OROV-L_contig_1_corrected	D F .
OROV-L_own_sequencing	D F .

Decoration #1: Box residues that differ from OROV-L_NC_005776.

7 Literaturverzeichnis

- Akashi H, Bishop DH (1983): Comparison of the sequences and coding of La Crosse and snowshoe hare bunyavirus S RNA species. *J Virol* 45, 1155-1158
- Anderson CR, Spence L, Downs WG, Aitken TH (1961): Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 10, 574-578
- Ank N, Paludan SR (2009): Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors* 35, 82-87
- Aquino VH, Figueiredo LT (2004): Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown DNA fragments: complete nucleotide sequence of Oropouche virus M RNA segment. *J Virol Methods* 115, 51-57
- Aquino VH, Moreli ML, Moraes Figueiredo LT (2003): Analysis of oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. *Arch Virol* 148, 19-28
- 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, 912-915
- 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, 9798-9806
- Bishop DH, Gay ME, Matsuoko Y (1983): Nonviral heterogeneous sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S complementary RNA. *Nucleic Acids Res* 11, 6409-6418
- 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, 1207-1214
- 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, 1371-1377
- Clemens MJ (1997): PKR-a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 945-949
- Conaway RC, Sato S, Tomomori-Sato C, Yao T, Conaway JW (2005): The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 30, 250-255
- Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, Lin TY, Schneller S, Züst R, Dong H, Thiel V, Sen GC, Fensterl V, Klimstra WB, Pierson TC, Buller RM, Gale MJr, Shi PY, Diamond MS (2010): 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* 468, 452-456

- Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chappier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL (2003): Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 33, 388-391
- Elliott RM (1989): Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *Virology* 173, 426-436
- Elliott RM (1990): Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol* 71, 501-522
- Elliott RM (1997): Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med* 3, 572-577
- Elliott RM, Weber F (2009): Bunyaviruses and the type I interferon system. *Viruses* 1, 1003-1021
- Elliott RM, Schmaljohn CS, Collett MS (1991): Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 169, 91-141
- Eshita Y, Bishop DH (1984): The complete sequence of the M RNA of snowshoe hare bunyavirus reveals the presence of internal hydrophobic domains in the viral glycoprotein. *Virology* 137, 227-240
- Essien T (2013): The Inhibition of RNA-Polymerase II mediated expression by the Non-Structural Protein NSs of the Oropouche Virus and Establishing an Oropouche Virus Minireplicon System. *Med. Diss. Göttingen (in Vorbereitung)**
- Figueiredo LT (2007): Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40, 224-229
- Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M (2006): Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1032-1060
- Garcia-Sastre A (2001): Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 279, 375-384
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74
- Habjan M, Penski N, Spiegel M, Weber F (2008): T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus. *J Gen Virol* 89, 2157-2166
- Hayden MS, Ghosh S (2008): Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362
- 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, 1-13
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G (2006): 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S (2008): Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205, 1601-1610

*) „mit freundlicher Genehmigung des Verfassers“

- Keisers K (2013): Klonierung der Genomsegmente des Oropouche-Virus und Charakterisierung der Interferon-antagonistischen Aktivität des S-Segment-kodierten NSs-Proteins. Med. Diss. Göttingen (in Vorbereitung)*
- Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE: *Fields Virology* Vol. 2, 5. Auflage; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Verlag, Philadelphia 2006
- Kohl A, Dunn EF, Lowen AC, Elliot RM (2004): Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. *J Gen Virol* 85, 3269-3278
- 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, 541-550
- 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, e13
- Lees JF, Pringle CR, Elliott RM (1986): Nucleotide sequence of the Bunyamwera virus M RNA segment: conservation of structural features in the Bunyavirus glycoprotein gene product. *Virology* 148, 1-14
- 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, 9667-9675
- Liu SY, Sanchez DJ, Cheng G (2011): New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon. *Curr Opin Immunol* 23, 57-64
- 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, 121-128
- Maan S, Rao S, Maan NS, Anthony SJ, Attoui H, Samuel AR, Mertens PP (2007): Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *J Virol Methods* 143, 132-139
- Malmgaard L (2004): Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24, 439-454
- Maruyama K, Sugano S (1994): Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 138: 171-174
- McInerney GM, Karlsson Hedestam GB (2009): Direct cleavage, proteasomal degradation and sequestration: three mechanisms of viral subversion of type I interferon responses. *J Innate Immun* 1, 599-606
- Mourao MP, Bastos MS, Gimaqu JB, Mota BR, Souza GS, Grimmer GH, Galusso ES, Arruda E, Figueiredo LT (2009): Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerg Infect Dis* 15, 2063-2064
- Nakhaei P, Genin P, Civas A, Hiscott J (2009): RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *Semin Immunol* 21, 215-222
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C (2006): RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1001

*) „mit freundlicher Genehmigung des Verfassers“

- Pichlmair A, Habjan M, Unger H, Weber F (2010): Virus-like particles expressing the nucleocapsid gene as an efficient vaccine against Rift Valley fever virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 701-703
- Pinheiro FP, Pinheiro M, Bensabath G, Causey OR, Shope RE (1962): Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Rev Serv Esp Saúde Públ*
- Pinheiro FP, Rocha AG, Freitas RB, Ohana BA, Travassos da Rosa AP, Rogerio JS, Linhares AC (1982): Meningitis associated with Oropouche virus infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 24, 246-251
- Randall RE, Goodbourn S (2008): Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89, 1-47
- Rebouillat D, Hovanessian AG (1999): The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 19, 295-308
- Sadler AJ, Williams BR (2008): Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8, 559-568
- Saeed MF, Wang H, Nunes M, Vasconcelos PF, Weaver SC, Shope RE, Watts DM, Tesh RB, Barrett AD (2000): Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. *J Gen Virol* 81, 743-748
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264
- Struthers JK, Swanepoel R (1982): Identification of a major non-structural protein in the nuclei of Rift Valley fever virus-infected cells. *J Gen Virol* 60, 381-384
- Sun L, Liu S, Chen ZJ (2010): SnapShot: pathways of antiviral innate immunity. *Cell* 140, 436-436
- Talon J, Salvatore M, O'Neill RE, Nakaya Y, Zheng H, Muster T, Garcia-Sastre A, Palese P (2000): Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4309-4314
- Thomas D, Blakqori G, Wagner V, Banholzer M, Kessler N, Elliott RM, Haller O, Weber F (2004): Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem* 279, 31471-31477
- Van Knippenberg I, Carlton-Smith C, Elliott RM (2010): The N-terminus of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein is essential for interferon antagonism. *J Gen Virol* 91, 2002-2006
- Vasconcelos HB, Azevedo RS, Casseb SM, Nunes-Neto JP, Chiang JO, Cantuaria PC, Segura MN, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG, Nunes MR, Vasconcelos PF (2009): Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol* 44, 129-133
- Verbruggen P, Ruf M, Blakqori G, Overby AK, Heidemann M, Eick D, Weber F (2011): Interferon antagonist NSs of La Crosse virus triggers a DNA damage response-like degradation of transcribing RNA polymerase II. *J Biol Chem* 286, 3681-3692
- Wang H, Beasley DW, Li L, Holbrook MR, Barrett AD (2001): Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the medium RNA segment of Oropouche, a Simbu

-
- serogroup virus: comparison with the middle RNA of Bunyamwera and California serogroup viruses. *Virus Res* 73, 153-162
- Weber F, Dunn EF, Bridgen A, Elliott RM (2001): The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology* 281, 67-74
- 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, 7949-7955
- Yadani FZ, Kohl A, Prehaud C, Billecocq A, Bouloy M (1999): The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley Fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein. *J Virol* 73, 5018-5025
- Yuan H, Yoza BK, Lyles DS (1998): Inhibition of host RNA polymerase II-dependent transcription by vesicular stomatitis virus results from inactivation of TFIID. *Virology* 251, 383-392
- Zust R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, Szretter KJ, Baker SC, Barchet W, Diamond MS, Siddell SG, Ludewig B, Thiel V (2011): Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* 12, 137-143

Danksagung:

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Martin Spiegel für die exzellente wissenschaftliche Begleitung und stetige Unterstützung bedanken. Er hat durch seine unermüdlichen Problemlösungsstrategien und ständige Hilfsbereitschaft im erheblichen Maße zu dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Frank Hufert, der mir die Möglichkeit gab, unter seiner Supervision in seiner Abteilung meine Dissertation anzufertigen.

Besonderer Dank gilt auch allen medizinisch-technischen Assistentinnen der Virologie, insbesondere Frau Andrea Paluschkiwitz und Frau Susanne Böhlken-Fascher für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe bei so manchem schwierigen Experiment im Laboralltag.

Ich danke auch Herrn Dr. rer. nat. Meik Dilcher für die freundliche Bereitstellung seiner Pyrosequenzierungsergebnisse des Oropouche-Virus-Genoms zu Vergleichszwecken im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Mein abschließender Dank gilt jedoch von ganzem Herzen meinen lieben Eltern, ohne deren bedingungslose Unterstützung die Doktorarbeit sowie das gesamte Studium der Medizin niemals möglich gewesen wären.

Lebenslauf:

Mein Name ist Katharina Schnülle, ich wurde am 30.10.1986 in Mannheim-Neckarau als Tochter von Prof. Dr. med. Peter Schnülle (Arzt) und Friederike Schnülle geb. Struth (Apothekerin) geboren. Im Zeitraum von 1997 bis 2006 besuchte ich das St. Raphael Gymnasium in Heidelberg, an dem ich 2006 meine schulische Ausbildung mit der allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Unmittelbar anschließend begann ich eine dreimonatige Ausbildung zur Rettungssanitäterin beim ASB Mannheim an der Franz-Anton-Mai-Schule, die ich im Dezember 2006 erfolgreich beendete. Zum Sommersemester 2007 mit Erhalt eines Studienplatzes für Medizin an der Georg-August-Universität in Göttingen nahm ich mein Medizinstudium auf.

Im Frühjahr 2009 legte ich das erste Staatsexamen der Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen ab und beendete somit den vorklinischen Abschnitt des Studiums. Aktuell befinde ich mich in meinem praktischen Jahr und werde aller Voraussicht nach Ende 2013 mein Medizinstudium mit dem zweiten Staatsexamen an der Georg-August-Universität Göttingen beenden.

Anfang Februar 2010 im Rahmen eines Promotionssemesters begann ich die Experimente als Grundlage für meine Doktorarbeit in der Abteilung Virologie der Universitätsmedizin Göttingen durchzuführen.

Während sowohl des vorklinischen als auch des klinischen Abschnitts übte ich verschiedene studentische Hilfstätigkeiten aus. Im Wintersemester 2008/2009 war ich Präparationsassistentin unter Dr. Ivo Chao im Zentrum für Anatomie der Universitätsmedizin Göttingen. Vom Wintersemester 2009/2010 bis zum Sommersemester 2013 wurde ich als studentische Hilfskraft in der klinischen Chemie beschäftigt. Darüberhinaus veranstaltete ich über insgesamt drei Semester (SS 2009 bis SS 2010) ein durch die Fachschaft organisiertes Anatomie-Tutorium für Studenten des zweiten klinischen Semesters. In den Semesterferien arbeitete ich ehrenamtlich beim ASB Mannheim als Rettungssanitäterin im Rettungsdienst.