

Molekulare Charakterisierung des Nukleokapsidaufbaus von TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus)

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Gregor L. Bucher
aus Luzern (CH)

Köln 2002

Berichtersteller:

Prof. Dr. Peter Schreier
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Dezember 2002

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jeff Schell danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Herrn Prof. Dr. Francesco Salamini für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung nach der Emeritierung von Prof. Schell.

Zu ganz besonderem Dank verpflichtet bin ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Peter Schreier, der mir immer wieder entscheidende Impulse gegeben und trotzdem viel Freiraum gelassen hat. Sein scharfsinniger Blick für das Wesentliche wird mir immer ein Vorbild sein, das ich so schnell nicht werde erreichen können.

Ein grosses Dankeschön geht auch an Dr. Joachim Uhrig, der während meiner ganzen Doktorarbeit sowohl für wissenschaftliche als auch alltägliche Probleme stets ein offenes Ohr hatte. Seine Kreativität hat meine Arbeit entscheidend vorangebracht, selbst als er seine eigene Arbeitsgruppe aufbaute und daher alle Hände voll zu tun hatte. Trotz all dieser Anstrengungen bringt es Joachim fertig, hervorragend Klavier zu spielen. Zusammen mit Tim (Querflöte) spielten wir Trio, was grossen Spass machte.

Dr. Tim Söllick und seine Frau Dr. Gül Söllick haben mir das Leben in Köln versüsst. Die wunderschönen Abende, welche wir gemeinsam verbracht haben, werde ich immer in Erinnerung behalten. Tim hat mich als mein Banknachbar in neue Techniken eingeführt und mich stets motiviert, doch etwas früher im Labor zu erscheinen und meinen Platz aufzuräumen.

Auch Christina Philipp hat mir als erfahrene TA viele praktische Tips und Tricks mit auf den Weg gegeben und war stets eine sehr angenehme und nette Kollegin mit viel Sinn für Humor.

Am längsten musste mich Christoph Rudolph aushalten, mein Doktorandenkollege. Bei seinem frohen Gemüt dürfte ihm das allerdings nicht allzu schwer gefallen sein. Zu jeder Tages- und Nachtzeit hat er meine Fragen geduldig beantwortet. Seine Ratschläge und Ideen haben mir sehr geholfen, wofür ich ihm herzlich danken möchte. Ganz nebenbei habe ich sogar noch etwas Hessisch gelernt!

Auch Verena Spies („Vreni“), unsere Diplomandin von der Fachhochschule Giessen, kommt aus dem Hessenland. Mit ihrem Temperament hat sie uns ganz schön eingeheizt! Seit sie am MPIZ arbeitet, heisst Christoph nur noch „Chrisi“.

Um bei den Hessen zu bleiben: Dr. Peter Porschewski durfte ich während seiner leider viel zu kurzen Zeit als Postdoc bei uns als überaus humorvollen und fachkundigen Chemiker und Biologen kennenlernen. Wir hatten eine tolle Zeit miteinander.

Eine andere Diplomandin, Jana Hackbusch, hat die mühselige biochemische Charakterisierung des TSWV N Proteins entscheidend vorangebracht. Ich möchte ihr für die wertvolle Arbeit danken, die sich auch auf mein Projekt positiv ausgewirkt hat.

Ausserdem möchte ich folgenden Kolleginnen und Kollegen danken: Dr. Jochen Winter (AG Dr. George Coupland) für die tatkräftige Unterstützung bei den Gelfiltrationsexperimenten, Klaus Richter (inzwischen AG Dr. Joachim Uhrig) für die Arbeit mit *Pichia pastoris* während seiner Zeit als Praktikant, Sabine Lohmer (AG Prof. Dr. Dietmar Schomburg, Institut für Biochemie, Universität zu Köln) für die Einführung in die CD-Spektroskopie, Dr. Frank Breuer und Sabine Schäfer (AG Dr. Csaba Koncz) für die Bereitstellung der *Arabidopsis thaliana* Pflanzensuspension und der *Agrobacterium*-Stämme, Dr. Jean-Baptiste Mariaux (AG Dr. Csaba Koncz), der mir u.a. wie kein anderer Franzose die „French Press“ erklären konnte, Dr. Guido Jach für die GFP-Plasmide und schliesslich Dr. Cornelia Heinze (Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg) für das Plasmid pTSWV-S.

Ganz besonders danken möchte ich Dr. Eileen Rojo. Sie ist die Frau meines Lebens und hat mir unendlich viel geholfen. Während der 2½ Jahre, die wir nun zusammen sind, haben wir sehr viel schönes miteinander erlebt. Eileen hat auch stets Interesse für das TSWV-Projekt gezeigt und mir wertvolle Anregungen gegeben.

Meinen Eltern und meinem Bruder Kuno, die mich während der Doktorarbeit nur selten sehen konnten, danke ich für die stete Unterstützung.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die grosszügige Förderung in Form eines dreijährigen Stipendiums sowie für die hervorragende Betreuung. Die Stiftung ermöglichte meine Teilnahme an einem Workshop in England, einem internationalen Kongress in Italien sowie an diversen Veranstaltungen in Deutschland, wofür ich enorm dankbar bin. Der Bayer AG bin ich dankbar für die finanzielle Unterstützung während des letzten halben Jahres meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Hülskamp danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Promotionsarbeit, und Herrn Prof. Dr. M. Melkonian danke ich für die Bereitschaft, den Vorsitz in meiner Disputation zu übernehmen. Ausserdem danke ich dem Protokollführer Dr. Andreas Müller.

Waiting

Yevgeny Yevtushenko (*1933)

My love will come
will fling open her arms and fold me in them,
will understand my fears, observe my changes.
In from the pouring dark, from the pitch night
without stopping to bang the taxi door
she'll run upstairs through the decaying porch
burning with love and love's happiness,
she'll run dripping upstairs, she won't knock,
will take my head in her hands,
and when she drops her overcoat on a chair,
it will slide to the floor in a blue heap.

for

Eileen

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 - Einleitung	1
1.1 TSWV, ein pflanzenpathogenes <i>Bunyavirus</i>	1
1.2 Genomorganisation und Proteine von TSWV	4
1.3 Der Infektionszyklus von TSWV	9
1.4 Die Interaktionen des TSWV Nukleokapsidproteins	12
1.5 Nukleokapsidproteine und Genom-Enkapsidierung bei TMV und Influenza A.....	14
1.5.1 Begriffe.....	14
1.5.2 Tabak Mosaik Virus (Gattung <i>Tobamovirus</i>)	15
1.5.3 Influenza A Virus (Familie der <i>Orthomyxoviridae</i>)	16
1.6 Zielsetzung	20
Kapitel 2 - Materialien und Methoden.....	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Materialien.....	21
2.1.2 Laborgeräte	22
2.1.3 Viren und Organismen	22
2.1.4 Vektoren.....	23
2.1.5 Oligonukleotide	24
2.1.6 Lösungen, Kulturmedien und Puffer	25
2.2 Methoden	28
2.2.1 Rekombinante DNA-Techniken.....	28
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.3 Sequenzanalyse.....	29
2.2.4 Analyse von DNA- und RNA-Proben mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer.....	29
2.2.5 Überexpression rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i>	31
2.2.6 Native Reinigung von (His) ₆ -Fusionsproteinen und Abspaltung des Peptides	31
2.2.7 Dialyse und Umpuffern von Proteinen	32
2.2.8 Messung der Proteinkonzentration	32
2.2.9 Suche nach geeigneten Puffern zur Aufbewahrung des TSWV N Proteins	33
2.2.10 SDS-PAGE und Proteinfärbung.....	33
2.2.11 Blue Native PAGE	33
2.2.12 CD-Spektroskopie	35
2.2.13 DIBA (Dot Immuno Binding Assay)	36
2.2.14 Immunoblot.....	37
2.2.15 Gelfiltration.....	37
2.2.16 RNA <i>in vitro</i> Transkription	38

2.2.17 GEMSA (Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay)	39
2.2.18 Filterbindungsversuche	40
2.2.19 Computer-Software und Datenbanken	40
Kapitel 3 - Ergebnisse.....	42
3.1 Expression und Reinigung von N Protein und Mutanten	42
3.2 Optimierung der Puffer zur Lagerung von N Protein	44
3.3 Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie.....	45
3.4 Spektralanalyse des heterolog exprimierten TSWV N Proteins	46
3.5 Gelfiltrationsanalysen von TSWV N Protein und Mutanten	48
3.6 Analyse der N Protein-Multimerisierung mittels Blue Native PAGE	51
3.7 RNA <i>in vitro</i> Transkripte für Protein – RNA Interaktionsstudien	53
3.8 Gel-Retardations-Assays (GEMSAs)	56
3.8.1 Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaften des TSWV NSm Proteins.....	56
3.8.2 Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaften des TSWV N Proteins mit C-terminaler (His) ₆ -Fusion	57
3.8.3 Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaften des unmodifizierten TSWV N Proteins.....	60
3.8.4 Analyse von Protein – RNA Komplexen mittels BN-PAGE	63
3.9 Filterbindungsversuche mit Protein - RNA Komplexen	64
3.10 RNA Sekundärstrukturberechnungen.....	67
Kapitel 4 - Diskussion	70
4.1 Expression, Reinigung und Haltbarkeit von biologisch aktivem TSWV Nukleokapsidprotein	70
4.2 Biochemische Untersuchungen zur Homopolymerisierung des Nukleokapsidproteins	74
4.3 Charakterisierung der RNA-Bindungseigenschaften des TSWV Nukleokapsidproteins	79
4.4 Ausblick	95
Kapitel 5 - Zusammenfassung.....	97
Kapitel 6 - Literaturverzeichnis	98
Kapitel 7 - Anhang	113
7.1 Oligonukleotide	113
7.2 Gelfiltrationen: Elutionsprofile	114
7.3 GEMSAs mit TSWV N-(His) ₆	115
7.4 GEMSAs mit TSWV N ohne Polyhistidin-Fusion	115
7.4 GEMSAs mit TSWV N ohne Polyhistidin-Fusion	116

Abkürzungen

(Akronyme von hier nicht erwähnten Virusnamen werden im Text erklärt)

A	Adenosin oder Adenin; Alanin; Absorption
aa(s)	amino acid(s) / Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
AFM	Atomic Force Microscopy (Atomare Kraftmikroskopie)
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	ADP-ribosylation factor
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
b	Basen
BaYMV	Barley Yellow Mosaic Virus
BisTris	bis[2-Hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan
BN-PAGE	Blue Native PAGE
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BUN	Bunyamwera Virus (Familie der <i>Bunyaviridae</i>)
C	Cytidin oder Cytosin
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
Ci	Curie
CD-Spektroskopie	Circular Dichroismus Spektroskopie
cmc	critical micelle concentration (kritische Mizellbildungskonzentration)
CP	coat protein (Hüllprotein)
Da	Dalton
dest.	Destilliert
DIBA	Dot Immuno Binding Assay
DI Elemente	defective interfering elements
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleinsäuretriphosphate
dsRNA	double stranded RNA (doppelsträngige RNA)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Exp.	Experiment
F	Phenylalanin
G	Guanosin oder Guanin; Glykoprotein
(G)EMSA	(Gel) Electrophoretic Mobility Shift Assay (Gel-Retardations-Assay)
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
(His) ₆ -Fusion	Hexahistidin (6xHis) Fusion
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HTNV	Hantaan Virus (Familie der <i>Bunyaviridae</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
IVT	<i>in vitro</i> Transkription; <i>in vitro</i> Transkript
Kap.	Kapitel
kb(p)	Kilobasen(paare)

kD(a)	Kilodalton
L	Grösstes Protein von TSWV, u.a. mit RdRp-Funktion
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
MWCO	molecular weight cut-off (molekularer Grössenausschluss)
N	Nukleokapsidprotein
NA	Neuraminidase
NaP _i	Natriumphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid (Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure)
nmol	nanomol (10 ⁻⁹ mol)
NP	Nukleokapsidprotein (von Influenza)
NS	Nichtstrukturelles Protein von TSWV (NSs, NSm)
nt(s)	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte („optical density“)
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
panS	Mini-Panhandle („Pfannenstiel“)-RNA des TSWV S Genoms
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	lat. potentio hydrogenii (negativer log ₁₀ der H ⁺ Konzentration)
pI	isoelektrischer Punkt
pmol	picomol (10 ⁻¹² mol)
PMSF	Phenyl-Methylsulfonyl Fluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RdRp	RNA dependent RNA polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
RBD	RNA binding domain (RNA Bindedomäne)
RNP	ribonucleoprotein (Ribonukleoprotein)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
SB-12	lauryl sulfobetaine
SDS	sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
SEL	size exclusion limit (molekulare Ausschlussgrösse)
SNV	Sin Nombre Virus (Familie der <i>Bunyaviridae</i>)
ssRNA	single stranded RNA (einzelsträngige RNA)
T	Thymin oder Thymin; Temperatur
TBS	tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMV	Tabak Mosaik Tobamovirus (tobacco mosaic virus, Genus <i>Tobamovirus</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
TSWV	Tomato Spotted Wilt Tospovirus
U	Uridin oder Uracil
vcRNA	viral-komplementäre („viral complementary“, antigenomische) RNA
vRNA	virale (genomische) RNA
vRNP	virales Ribonukleoprotein
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

Kapitel 1 - Einleitung

1.1 TSWV, ein pflanzenpathogenes *Bunyavirus*

Das Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) gehört zur pflanzeninfizierenden Gattung der *Tospoviren* und war deren zuerst isoliertes Mitglied. Die von TSWV verursachte Tomatenbronzefleckenkrankheit wurde erstmals von Brittlebank 1919 beschrieben. Ein Jahrzehnt danach erkannte man den viralen Ursprung dieser Krankheit (Samuel 1930). Es dauerte nochmals fast ein halbes Jahrhundert, bis auf Grund struktureller und physikalischer Eigenschaften die Hypothese aufgestellt wurde, dass TSWV in die Familie der *Bunyaviridae* einzuordnen ist (Milne *et al.* 1984). Die *Bunyaviridae* sind RNA-Viren negativer Polarität, deren Genome in drei Segmente unterteilt sind. Mit Ausnahme des Genus *Tospovirus* sind die *Bunyaviridae* Tier- und Humanpathogene (Übersichtsartikel dazu siehe: Kolakofsky 1991). Wie alle *Bunyaviren* ist das Tomato Spotted Wilt Virus (oder Virion) sphärisch aufgebaut und von einer einfachen Membranhülle umgeben (Abb. 1.1). Es besitzt einen Durchmesser von ca. 75 bis 85 nm (Mohamed 1981).

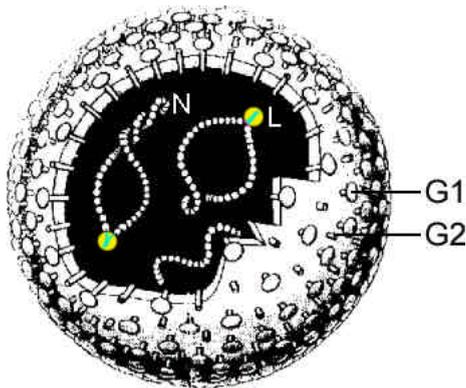


Abb. 1.1 Mögliches Aussehen eines Tomato Spotted Wilt Virions (in Anlehnung an Influenza).

Das segmentierte virale RNA-Genom zeigt pseudozirkuläre Strukturen, ist vom Nukleokapsidprotein (N) komplexiert und bildet zusammen mit wenigen Kopien der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp, L Protein) das Nukleokapsid. Dieses ist von einer einfachen Membranhülle umgeben, in welche die Glykoproteine G1 und G2 integriert sind. (Modifiziert nach Marcel Prins und Richard Kormelink, Wageningen University Research Centre, 1998).

Die Glykoproteine G1 und G2 sind in die Membran integriert. Das Nukleokapsid setzt sich aus der in drei Teile segmentierten genomischen RNA, dem Nukleokapsidprotein N und wenigen Kopien der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp oder L Protein) zusammen (Mohamed *et al.* 1973; Tas *et al.* 1977); Übersichtsartikel dazu siehe: German *et al.* 1992). Über terminale „Panhandle“-Bereiche bilden die RNAs pseudozirkuläre Strukturen. Während die human- und tierpathogenen *Bunyaviridae* hauptsächlich durch Mücken, Zecken und Sandfliegen übertragen werden (Elliott 1990), erfolgt die Verbreitung von TSWV durch mehrere Thripsarten (Ordnung *Thysanoptera*), von denen der kalifornische Blüenthrips (*Frankliniella occidentalis*) die wichtigste Spezies darstellt (Abb. 1.2). Das Virus kann nur von Thrips im ersten Larvenstadium aufgenommen werden. Es repliziert im Insekt (Ullman *et al.* 1993; Wijkamp *et al.* 1993) und wird zeitlebens vom adulten Thrips über den Speichel in die Pflanzen abgegeben. Falls es also gelingt, die Larvenstadien zu eliminieren, kann die Virusausbreitung eingedämmt werden, selbst wenn noch Adulttiere da sind.

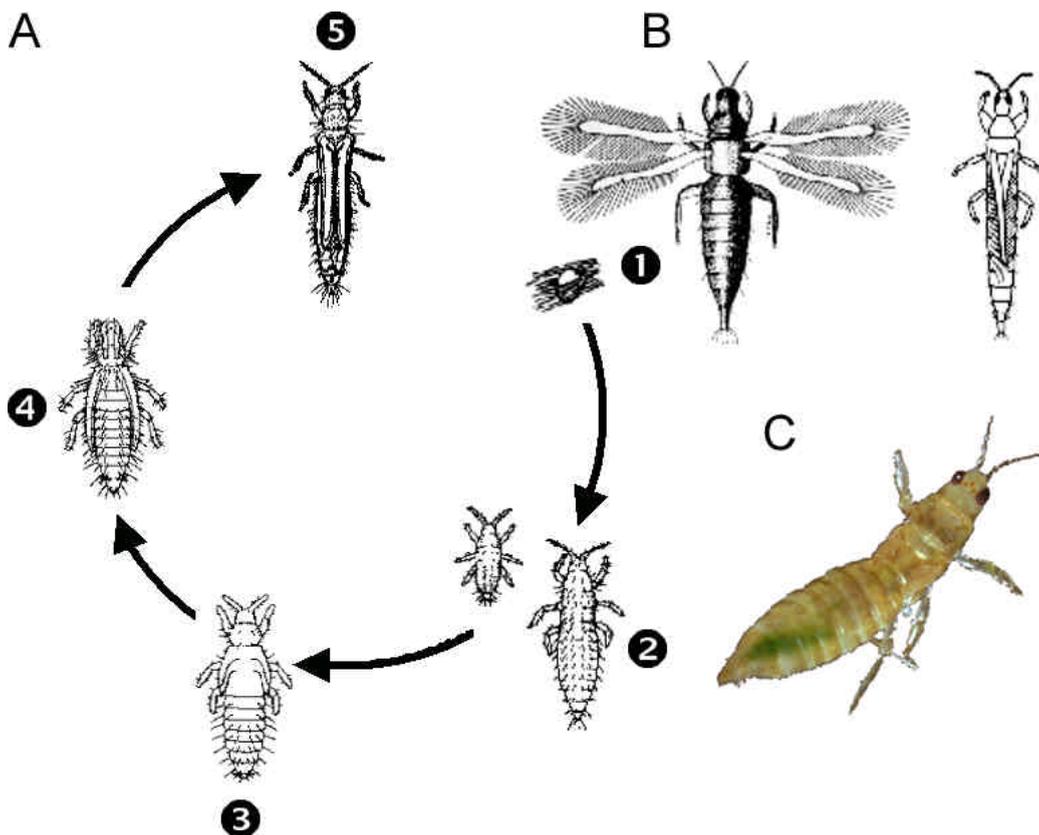


Abb. 1.2 TSWV wird nur durch Thrips-Larven aufgenommen und von Adulttieren übertragen.

(A) Unter günstigen Bedingungen vollendet ein Kalifornischer Blütenthrips (*Frankliniella occidentalis*, engl. „western flower thrips“) seinen Lebenszyklus in etwa 12 Tagen. Bei niedrigen Temperaturen kann er bis zu 44 Tage dauern. Die Eier werden in ein Blatt gelegt (1) und etwa drei Tage später schlüpfen die Larven ((2), links). Diese beginnen sofort mit der Nahrungsaufnahme ((2), rechts) und nehmen so das Virus auf. Nach vier Tagen verpuppen sie sich im Boden ((3): frühes Puppenstadium, (4): Puppe), und in etwas mehr als drei Tagen werden daraus Adulttiere (5). Diese ernähren sich wieder und übertragen das Virus. (Verändert nach L.P. Pottorff und S.E. Newman, Colorado State University und James R. Baker, North Carolina Cooperative Extension Service, 2002).

(B) Adulte Thrips. Ein erwachsener Kalifornischer Blütenthrips ist etwa 1 mm lang, wobei das Weibchen grösser ist als das Männchen. (John R. Meyer, Department of Entomology, North Carolina State University, 2001).

(C) Larve von *Frankliniella occidentalis*. Die Larven sind immer flügellos. (Ralph E. Berry, Department of Entomology, Oregon State University, Corvallis, 2000).

Auf Grund der beschriebenen Charakteristika wurden die *Tospoviren* im Jahre 1991 durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ als neu begründete Gattung innerhalb der Familie der *Bunyaviridae* klassifiziert (Francki 1991; Abb. 1.3). Mittlerweile wurden weitere *Tospoviren* identifiziert, die sich in Wirtsspektrum, geographischer Verbreitung, Serologie und Nukleotidsequenz von TSWV unterscheiden. Traditionellerweise unterscheidet man vier Serogruppen (de Avila *et al.* 1990; de Avila *et al.* 1993; Heinze *et al.* 1995; Tabelle 1.1), und die Einführung weiterer Serogruppen wird diskutiert. Mit der Klonierung und Sequenzierung von cDNA-Kopien der viralen Genome wurde unabhängig von den serologischen Eigenschaften der Viren die Möglichkeit eröffnet, die Klassifizierung neuer Viren an Hand von Sequenzhomologien vorzunehmen.

Familie der *Bunyaviridae*

Genera:

Hantavirus

Nairovirus

Orthobunyavirus

Phlebovirus

Tospovirus

sowie unklassifizierte *Bunyaviridae*

Chrysanthemum stem necrosis virus
 Gloxinia tospovirus (≈ Capsicum chlorosis virus)
 Groundnut bud necrosis virus
 Groundnut chlorotic fan-spot virus
 Groundnut ringspot virus
 Impatiens necrotic spot virus
 Iris yellow spot virus
 Peanut yellow spot virus
 Physalis severe mottle virus (= Melon yellow spot virus)
 Thailand tomato tospovirus
 Tomato chlorotic spot virus
Tomato spotted wilt virus
 Tomato yellow fruit ring virus

Abb. 1.3 Taxonomische Zuordnung von TSWV. Die Angaben aus dem „NCBI Taxonomy Browser“ (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) vom August 2002 wurden mit der aktuellen Literatur verglichen und korrigiert.

Tabelle 1.1 Serologische Einteilung der Tospoviren.

Serogruppe	Virusname	Literaturverweise
I	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	de Haan <i>et al.</i> 1990; de Haan <i>et al.</i> 1991; Kormelink <i>et al.</i> 1992
II	Groundnut Ringspot Virus (GRSV) ¹	de Avila <i>et al.</i> 1993
	Tomato Chlorotic Spot Virus (TCSV)	de Avila <i>et al.</i> 1993
III	Impatiens Necrotic Spot Virus (INSV)	Law <i>et al.</i> 1990; Adam <i>et al.</i> 1993
	Watermelon Silver Mottle Virus (WSMV)	Yeh <i>et al.</i> 1992; Yeh <i>et al.</i> 1995
IV	Groundnut Bud Necrosis Virus (GBNV)	Heinze <i>et al.</i> 1995; Satyanarayana <i>et al.</i> 1996; Satyanarayana <i>et al.</i> 1996
	Chrysanthemum Stem Necrosis Virus (CSNV)	Duarte <i>et al.</i> 1995; Bezerra <i>et al.</i> 1999
	Zucchini Lethal Chlorosis Virus (ZLCV)	Bezerra <i>et al.</i> 1999

Infektionen mit TSWV sind für mittlerweile etwa 1050 Pflanzenspezies aus 82 Familien beschrieben (Prins *et al.* 1998; Peters 1998), und der jährliche Ernteverlust durch TSWV wird auf etwa 1 Mrd. Euro geschätzt (Goldbach 1996; Peter Schreier, pers. Mitteilung). Betroffen sind u. a. wichtige Kulturpflanzen wie Paprika, Erdnuss, Erbse, Kartoffel, Tabak, Tomate, Sellerie und Kopfsalat bzw. Zierpflanzen wie Dahlien, Chrysanthemen, Gerbera, Usambaraveilchen und Schwertlilien. Die Symptome auf den befallenen Pflanzen reichen von der Ausbildung von lokalen Läsionen, Chlorosen und manchmal Nekrosen bis hin zum Auftreten von ringförmigen oder linienförmigen Mustern, Welken, Krüppeln, Vergilben, Marmorierungen und schweren Läsionen an Blättern und Stielen (Mumford *et al.* 1996).

¹ In einigen Veröffentlichungen wird nicht von „Groundnut“ sondern von „Peanut“ gesprochen. Dasselbe gilt für GBNV.

1.2 Genomorganisation und Proteine von TSWV

Die drei Genomsegmente von TSWV werden als S („short“), M („medium“) und L („large“) bezeichnet. Das kleinste RNA-Segment (S RNA) von 2.9 kb besitzt eine „ambisense“ Kodierungsstrategie, d.h. sowohl ein Teil der viralen als auch ein Teil der viral-komplementären S RNA wird transkribiert (de Haan *et al.* 1990; Maiss *et al.* 1991). Dies ist vergleichbar mit der S RNA einer anderen Gattung der *Bunyaviridae*, der *Phleboviren* (Ihara *et al.* 1984; Marriott *et al.* 1989; Simons *et al.* 1990; Giorgi *et al.* 1991; Elliott 1990).

Das N Protein (28.9 kDa) wird von einer subgenomischen mRNA komplementär zur 3'-Hälfte der viralen S RNA kodiert, während das NSs Protein (52.4 kDa) von einer subgenomischen mRNA, die der 5' Hälfte der S RNA entspricht, translatiert wird (Kormelink *et al.* 1991; Abb. 1.4).

Das mittlere RNA-Segment (M RNA) von 4.8 kb ist ebenfalls „ambisense“ organisiert (Kormelink *et al.* 1992; Law *et al.* 1992). Es besitzt ein offenes Leseraster für die Glykoproteine im viral-komplementären Sinn und kodiert im viralen Sinn für das Movementprotein (Transportprotein) NSm (33.6 kDa). Die „ambisense“ Organisation der M RNA ist nur für *Tospoviren* beschrieben, die anderen Mitglieder der *Bunyaviridae* besitzen eine M RNA ausschliesslich negativer Polarität (Elliott 1990).

Das mit 8.9 kb grösste RNA-Segment (L RNA) von ist von negativer Polarität und kodiert für das 322 kDa grosse L Protein (van Poelwijk *et al.* 1993), die RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRp, „RNA dependent RNA polymerase“; de Haan *et al.* 1991). Die Expression der L RNA findet über die Synthese einer mRNA statt, deren Grösse ungefähr der genomischen L RNA entspricht (Kormelink *et al.* 1992).

Sowohl S als auch M RNA besitzen eine A-U-reiche intergenische Region, welche die beiden Leseraster trennt. Es wird angenommen, dass diese Region eine komplexe Tertiärstruktur bilden kann und eine wichtige Rolle in der Transkriptions-Termination der subgenomischen RNAs spielt (de Haan *et al.* 1990; Maiss *et al.* 1991; Kormelink *et al.* 1992). Kürzlich wurde gezeigt, dass TSWV mRNAs polyadenyliert sind (Soellick 2000). Ein Uridin-Bereich (5'-UUUAUU-3') wurde als der Poly(A)-Sequenz direkt vorangehend identifiziert und eine nachfolgende „Hairpin“-Struktur in der intergenischen Region der TSWV S RNA gefunden. Die Polyadenylierungsaktivität wurde der RdRp zugeschrieben.

Alle drei genomischen Segmente von TSWV haben terminal komplementäre Sequenzen, die durch Basenpaarung zur Ausbildung von „Panhandle“-Strukturen führen können. Diese stellen vermutlich wichtige regulatorische Elemente als Erkennungsstellen für die virale Polymerase und die Verpackung der Nukleokapside in die Virionen dar (de Haan *et al.* 1989). In diesen terminalen „Repeats“ sind die ersten 15 Nukleotide hoch und die ersten 8 Nukleotide vollständig konserviert (de Avila *et al.* 1993). Für das *Rift Valley Fever Virus* (Gattung *Phlebovirus*, Familie der *Bunyaviridae*) ist eine Abhängigkeit der Transkription viraler RNA-Moleküle vom Vorhandensein der letzten 13 Nukleotide des 3' Endes gezeigt worden (Prehaud *et al.* 1997).

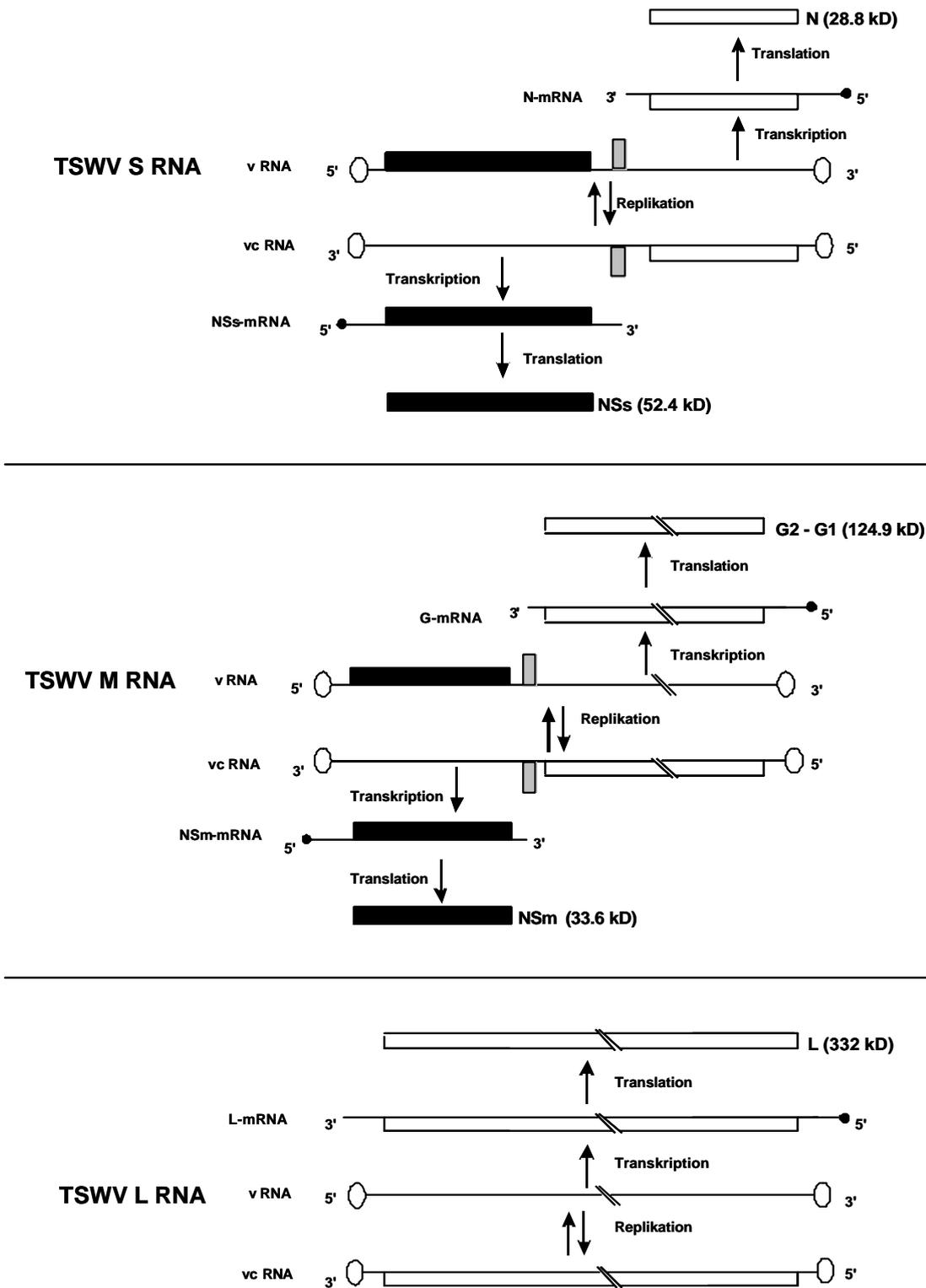


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der genetischen Organisation der drei genomischen RNAs S, M und L von TSWV (verändert nach German *et al.* 1992). Durchgezogene Linien stellen die viralen (v) bzw. die viral-komplementären (vc) RNAs dar. ORFs in negativer Polarität sind als offene Kästen und ORFs in positiver Polarität als schwarze Kästen dargestellt. Offene Kreise an den Enden der genomischen RNAs repräsentieren die für die „Panhandle“-Struktur verantwortlichen komplementären Basen, schwarze Kreise am 5' Ende der subgenomischen mRNAs stellen die „cap“-Strukturen nichtviralen Ursprungs dar. Die horizontal gestreiften Rechtecke symbolisieren die intergenischen Regionen der S und M RNA. Die L RNA besitzt nur ein ORF und hat daher keine intergenische Region.

Das TSWV-Genom kodiert für insgesamt fünf Proteine. Dies sind die beiden nichtstrukturellen Proteine NSs und NSm sowie das Vorläuferprotein der beiden Glykoproteine G1 und G2, das L Protein und das N Protein.

Das 52.4 kDa grosse NSs Protein konnte in infizierten Protoplasten zu späten Zeitpunkten nach der Infektion an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Kikkert *et al.* 1997). Man fand eine Korrelation zwischen der Menge an NSs Protein und der Schwere der Symptome, was eine Rolle bei der Pathogenität vermuten lässt (Goldbach 1993). Auch das NSs Protein des verwandten Bunyamwera Virus scheint einen Einfluss auf die virale Pathogenese zu haben, obwohl es nicht essentiell ist (Bridgen *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den Viren der Gattungen *Phlebovirus* und *Tospovirus* wird das Bunyamwera NSs Gen in der gleichen Orientierung wie das N Gen kodiert. Es wird von der gleichen vc mRNA translatiert wie das N Protein, da die ORFs überlappen (Akashi *et al.* 1983). Vor kurzem wurde gezeigt, dass das Bunyamwera NSs in Säugerzellen die Aktivität der viralen Polymerase reguliert (Weber *et al.* 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass NSs bei TSWV die Aktivität der RdRp herunterreguliert (Thomas L. German, unveröffentlichte Beobachtung). Vor kurzem wurde demonstriert, dass das Bunyamwera NSs ein Antagonist der Induktion von Interferon ist (Weber *et al.* 2002). Es blockiert die transkriptionelle Aktivierung von Interferon- α/β und erhöht dadurch die Virulenz. Zum gleichen Ergebnis kamen Untersuchungen des Rift Valley Fever Virus (Bouloy *et al.* 2001). Die Produktion von α/β Interferonen ist eine der wichtigsten Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems. Deshalb produzieren viele Viren Substanzen, welche das Interferon-System unterminieren.

Das NSm Protein (33.6 kDa) stellt das virale Transportprotein dar. Hinweise hierfür lieferte dessen Immunolokalisation in zytoplasmatischen Einschlüssen, an der Zellmembran und an den Plasmodesmata (Kormelink *et al.* 1994). In infizierten Protoplasten bildete das Protein tubuläre Strukturen aus, welche aus der Oberfläche der Zellen herausragten (Kikkert *et al.* 1997). Weiterhin wurde die Expression des Proteins nur vorübergehend sechs bis sieben Tage nach Infektion beobachtet, ein Zeitpunkt, der mit dem ersten Auftreten von Symptomen korreliert (Kormelink *et al.* 1994). Eine Akkumulation von NSm in infizierten Thripsen konnte nicht gezeigt werden (Goldbach 1993). NSm-transgene Pflanzen zeigten in Mikroinjektions-Versuchen zur Bestimmung der Ausschlussgrösse („size exclusion limit“, SEL) der Plasmodesmata die gleichen Ergebnisse wie transgene, das TMV Movement Protein exprimierende Pflanzen (Storms *et al.* 1998). Dieses und das Fehlen eines entsprechenden offenen Leserasters bei den human- und tierpathogenen *Bunyaviridae* (mit Ausnahme von *Bunyamwera*, dessen NSm allerdings wesentlich kleiner ist) spricht für eine pflanzenspezifische Aufgabe und passt zu der Vorstellung, dass NSm für den Zell-zu-Zell-Transport verantwortlich ist. Vor kurzem wurde gezeigt, dass NSm spezifisch mit N interagiert und unspezifisch einzelsträngige RNA bindet (Soellick *et al.* 2000). Darüber hinaus wurden in einem Hefe Zwei-Hybrid Screen mit NSm als Köder zwei homologe NSm-bindende Proteine der DnaJ-Familie aus *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* identifiziert.

Der 124.9 kDa grosse Vorläufer der Glykoproteine wird posttranslational zu den Proteinen G1 (78 kDa) und G2a (58 kDa) bzw. G2b (52 kDa) prozessiert (Mohamed *et al.* 1973; Tas *et al.* 1977; Kormelink *et al.* 1994). Kikkert *et al.* (2001) exprimierten das G2-G1 Gen von TSWV mit Hilfe des Semliki Forest Virus Expressionssystems in BHK (Baby-Hamster-Nieren) Zellen. Das Vorläuferprotein wurde effizient geschnitten und die G1 und G2 Glykoproteine vom ER in den Golgi-Komplex transportiert, wo sie zurückgehalten wurden. Es wurde gezeigt, dass eine Interaktion der beiden Glykoproteine essentiell für den gerichteten Transport in den Golgi-Komplex ist. In einer Mäusezellkultur konnte gezeigt werden, dass das G1 Protein der Gattung *Orthobunyavirus* einen Einfluss auf die Infektiosität hat (Pekosz *et al.* 1995). Eine Expression des für die Glykoproteine kodierenden offenen Leserasters in einem Baculovirus-System zeigte eine Lokalisierung der prozessierten Proteine am Plasmalemma der infizierten Zellen (Adkins *et al.* 1996). Das G2 Protein besitzt in der Nähe des Aminoterminus eine RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), die bei anderen Viren eine Bedeutung in der Zell-Zell-Adhäsion besitzt (Fox *et al.* 1989; Berinstein *et al.* 1995). Weiterhin kann die Bindung von G2 an ein 94 kDa grosses Thrips-Protein gezeigt werden (Kikkert *et al.* 1998). Durch wiederholte mechanische Inokulation von TSWV auf Tabakpflanzen konnten Mutationen in der M RNA erzeugt werden, die zum Verlust der Expression von mindestens einem der Glykoproteine führten (Resende *et al.* 1991). Dies unterstützt die Vermutung, dass die Glykoproteine nicht für eine Infektion von Pflanzenzellen benötigt werden, sondern nur für eine Übertragung durch den Thrips.

Das L Protein (322 kDa) besitzt mehrere Aminosäuren-Motive, die auch in RNA-Polymerasen anderer RNA Viren gefunden wurden (Poch *et al.* 1989). Eine RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität konnte zudem in gereinigten Virionen nachgewiesen werden. Auch Nukleokapsid, das durch Detergenzien aus Virionen isoliert wurde, besass diese Aktivität (Adkins *et al.* 1995). Für die L Proteine des Rift Valley Fever und des Bunyamwera Virus konnte eine RNA-Polymeraseaktivität nur im Fall einer Koexpression mit dem entsprechenden N Protein in einem transgenen Vaccinia Virus System gezeigt werden (Lopez *et al.* 1995; Dunn *et al.* 1995). Für eine erfolgreiche TSWV-Infektion muss die Polymerase vorhanden sein, da die genomischen RNAs negativer Polarität nicht direkt als Template für die Translation dienen können. Hingegen ist noch nicht klar, ob die RdRp als Protein oder mRNA in die Nachbarzellen transportiert wird.

Untersuchungen der 5' Enden der mRNA von TSWV wiesen Nukleotide nicht-viralen Ursprungs nach (Kormelink *et al.* 1992; van Poelwijk *et al.* 1996). Diese stammen vom Prozess des „cap-snatching“, welcher die Transkription aller subgenomischen RNAs initiiert (Kormelink *et al.* 1992). Die virale Transkriptase schneidet dabei durch eine Endonuklease-Aktivität die methylierten „cap“-Strukturen endogener mRNAs ab und benutzt diese als Primer für die Transkription. „Cap-snatching“ war zuvor bereits für das Influenza Virus (Krug *et al.* 1987), das La Crosse *Bunyavirus* (Patterson *et al.* 1984), das Germiston *Bunyavirus* (Bouloy *et al.* 1990) und Bunyamwera (Jin *et al.* 1993) beschrieben worden. Für das Influenza A Virus konnten letztes Jahr die strukturellen Voraussetzungen auf der vRNA für die Endonuklease-Aktivität der Polymerase gefunden werden

(Leahy *et al.* 2001): Erstens muss am 5' Ende ein „Hairpin-Loop“ vorhanden sein, zweitens muss die Identität von Nukleotiden an den Positionen 5 und 10 vom 5' Ende konserviert sein und drittens muss die „Panhandle“ partiell ausgebildet sein. Duijsings und Kollegen untersuchten, welche RNAs als spezifische „cap donors“ für die Transkriptionsinitiation bei TSWV in Frage kommen (Duijsings *et al.* 2001). Dazu benutzten sie mutierte Alfalfa Mosaic Virus (AMV) RNAs als „cap donors“ in transgenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen, welche die AMV Replikase exprimierten. Die Plasmide, welche AMV RNAs unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promoters überexprimierten, wurden mechanisch inokuliert. Die Autoren stellten fest, dass die Leadersequenzen zwischen 13 und 18 Nukleotide lang sind, wobei der Schnitt bevorzugt nach einem Adenin erfolgt (Abb. 1.5).

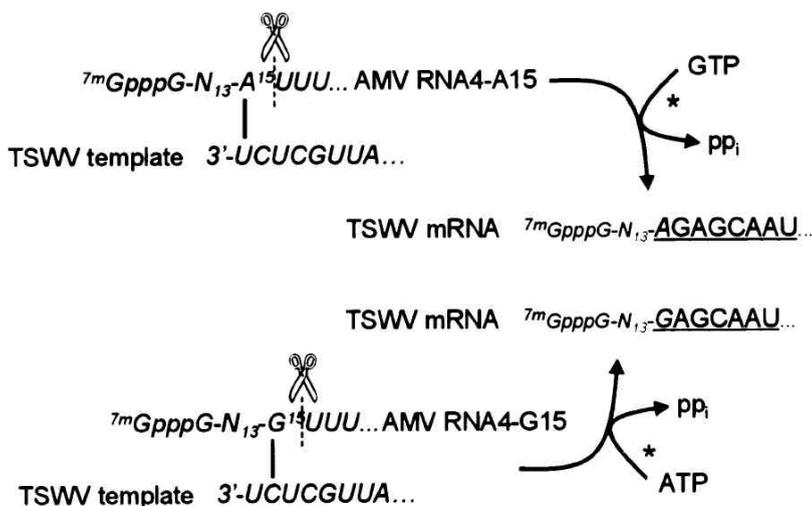


Abb. 1.5 Modell für die Transkriptionsinitiation am vorletzten Nucleotid des TSWV Genoms (Duijsings *et al.* 2001). Im oberen Teil der Abbildung ist dargestellt, wie die „cap donor“ RNA durch die virale Endonuklease 3' von einem Adenosin geschnitten wird und eine Basenpaarung mit dem äussersten Uridin der viralen Template RNA eingeht. Die Elongation erfolgt gemäss der Sequenz der viralen RNA, womit ein Guanodin als erstes Nucleotid eingebaut wird. Falls kein Adenosin in einer optimalen Entfernung von der „cap“-Struktur vorhanden ist, kann alternativ (vgl. untere Skizze) auch ein Guanodin zur Basenpaarung mit dem vorletzten Cytidin der viralen Template RNA benutzt werden. Als erstes Nucleotid in das entstehende mRNA-Molekül wird dann ein Adenosin eingebaut, und das erste Adenosin am 5' Ende des viralen Genoms geht verloren.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine einzige Basenkomplementarität mit dem TSWV RNA Template vorhanden sein muss. Durch die Analyse von Wirts-mRNAs, welche *in vivo* als „cap donors“ benutzt wurden, konnte diese Annahme bestätigt werden.

Das TSWV N Protein (258 Aminosäuren, 28.9 kDa) ist reich an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (vgl. Abb. 1.6), die bei pH 7 eine positive Nettoladung von +7 hervorrufen und so den

```

1  MSKVKLTKES IVALLTQKGD LEFEEDDQNLV AFNFKTFCLE NLDQIKKMSV ISCLTFLKNR
61  QSIMKVIKQS DFTFGKITIK KTSDRIGATD MTFRRLDSLI RVRLVEETGN SENLNTIKSK
121  IASHPLIQAY GLPLDDAKSV RLAIMLGGSL PLIASVDSFE MISVVLAIYQ DAKYDLGID
181  PKKYDTKEAL GKVCTVLKSK AFEMNEDQVK KGKEYAAILS SSNPNAKGSI AMHYSETLN
241  KFYEMFGVKK QAKLTELA

```

Abb. 1.6 Primärsequenz des TSWV N Proteins (258 aas). Aminosäuren mit geladenen, polaren Seitenketten sind eingefärbt: Lysin (K), Arginin (R), Histidin (H), Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E). Ausserdem sind die Phenylalanine (F) markiert, welche z.T. wichtig sind für die Homopolymerisierung.

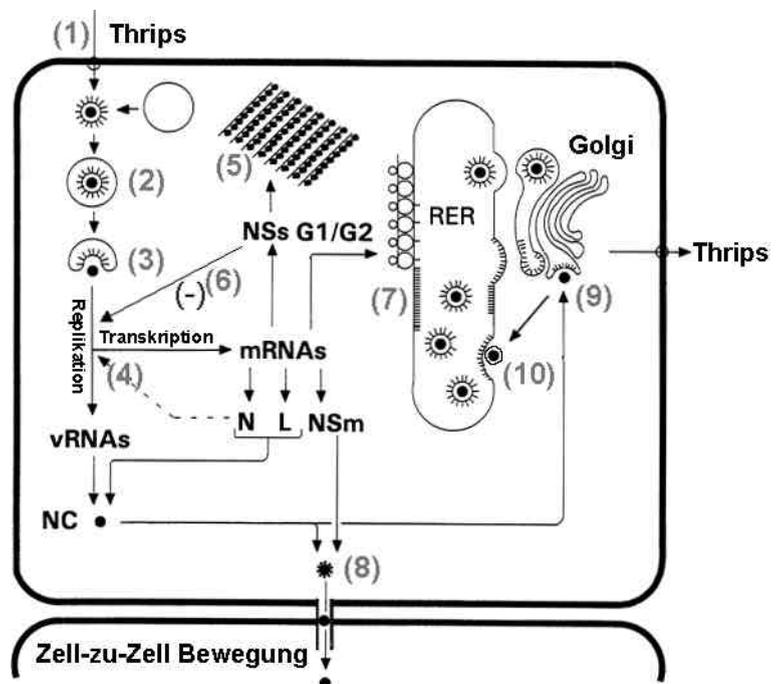
hohen isoelektrischen Punkt (pI) von 9.76 bedingen. Die Häufung von basischen Aminosäuren ist eine typische Eigenschaft vieler nukleinsäurebindender Proteine, zu denen nicht nur virale Nukleokapsidproteine, sondern z.B. auch Histone, Transkriptionsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Polymerasen, DNA-Helikasen und -Ligasen, das Single Strand DNA-Binding Protein (SSB) und das Catabolite Activator Protein (CAP) sowie Proteine, welche bei der Chromosomenverteilung in der Mitose eine Rolle spielen, gehören. Die hohe positive Nettoladung des TSWV N Proteins spricht für die Annahme einer Interaktion mit der viralen RNA. In Kapitel 1.4 wird näher auf die biologischen Funktionen des TSWV Nukleokapsidproteins eingegangen.

1.3 Der Infektionszyklus von TSWV

Der virale Infektionszyklus von TSWV in der infizierten Pflanze wird von folgenden Ereignissen bestimmt (Abb. 1.7): Die Ansteckung einer Pflanze erfolgt durch das Saugen eines infizierten adulten Thrips (*Frankliniella occidentalis*) (1). Das Virus verliert nach Eintritt in die Zelle (2) seine Membranhülle samt der Glykoproteine, wodurch das Nukleokapsid ins Zytosol entlassen wird (3), in dem es als amorphes, elektronendichtes Material vorliegt (Milne 1970; le 1971; Kormelink *et al.* 1991; Kitajima *et al.* 1992). Vor kurzem konnte für das verwandte Hantaan Virus (Gattung *Hantavirus*, Familie der *Bunyaviridae*) gezeigt werden, dass der Zelleintritt durch den Clathrin-abhängigen „coated pit“ Weg erfolgt (Jin *et al.* 2002). Im Zytosol der neu infizierten Zelle beginnt die virale RdRp mit der Transkription der fünf viralen Gene und der Replikation der drei einzelsträngigen genomischen RNAs.

Abb. 1.7 Infektions-Zyklus von TSWV (aktualisiert nach (Prins 1997)).

(1) Eintritt des Virus durch Saugen eines Thrips
 (2) Endozytose
 (3) Auflösung der viralen Membran und Freisetzung der Nukleokapside
 (4) Zytoplasmatische freie N Protein Konzentration kontrolliert wahrscheinlich den Wechsel von Transkription zu Replikation
 (5) NSs in parakristalliner Form
 (6) NSs reduziert vermutlich die Polymeraseaktivität
 (7) Glykosylierung und Proteolyse des G1/G2-Vorläuferproteins
 Ein Nukleokapsid (NC) wird entweder in eine benachbarte Zelle transportiert (8) oder am Golgi-System verpackt (9), wonach es mit dem ER verschmilzt (10) und von einem Thrips aufgenommen werden kann. Der Prozess der Membranhüllung wird in Abb. 1.8 genauer erklärt.



Das Nukleokapsidprotein N könnte beim Umschalten von der Transkription zur Replikation der genomischen RNAs durch die virale RdRp eine Rolle spielen (4). Im folgenden Kapitel wird näher

darauf eingegangen. Das NSs Protein wurde in Form kristalliner, teilweise fibröser Strukturen beschrieben (Kormelink *et al.* 1991; Urban *et al.* 1991, (5)). Wie bereits in Kapitel 1.2 besprochen wurde, reguliert es wahrscheinlich die Polymeraseaktivität herunter (6). Am Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgen die Glykosylierung und proteolytische Spaltung des G1/G2-Vorläuferproteins (7). Durch die Anlagerung einer oder weniger Kopien der RdRp an den gebildeten RNA-N-Komplex (van Poelwijk *et al.* 1993; Adkins *et al.* 1995) wird der Zusammenbau des Nukleokapsids abgeschlossen. Die subvirale infektiöse Einheit wird danach entweder zu einem Plasmodesma transportiert und in der Folge in eine benachbarte Zelle eingeschleust (8) oder in ein membranumhülltes Virion verpackt (9, 10), welches von einem Thrips aufgenommen werden kann, womit sich der Zyklus schliesst.

Pflanzenpathogene Viren verwenden mehrere Mechanismen, um sowohl den Transport von einer infizierten Zelle in die Nachbarzelle (lokale Ausbreitung) als auch den Transport über das Phloem (systemische Infektion) zu etablieren (Übersichtsartikel dazu siehe: Carrington *et al.* 1996; Lazarowitz *et al.* 1999; Haywood *et al.* 2002).

Das TSWV Movementprotein NSm wurde an Wänden und Plasmodesmata von infizierten Zellen und an Nukleokapsidpräparationen von TSWV gefunden (Kormelink *et al.* 1994; Prins *et al.* 1997). Da aus NSm bestehende tubuläre Strukturen in infizierten Tabakpflanzen und –protoplasten gefunden wurden (Storms *et al.* 1995), geht man für TSWV von einem Transport von Nukleokapsiden durch die Plasmodesmata aus (Goldbach 1996). Ähnliche Mechanismen wurden für das Cowpea Mosaic Virus (CPMV) oder das Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) beschrieben (Kasteel *et al.* 1996; Kasteel *et al.* 1997; van Lent *et al.* 1990; van Lent *et al.* 1991). Andere Pflanzenviren wie z.B. das Tabak Mosaik Tobamovirus (TMV) und das Red Clover Necrotic Mosaik Virus (RCNMV) vergrößern durch Anlagerung ihrer Movementproteine das „size exclusion limit“ der Plasmodesmata. Danach wird die unverpackte genomische RNA in die Nachbarzelle geschleust (Wolf *et al.* 1989; Waigmann *et al.* 1994; Waigmann *et al.* 1995; Fujiwara *et al.* 1993).

Membranumhüllte Viren erhalten ihre Lipoproteinhülle, indem sie durch eine der zahlreichen Membranen der Wirtszellen knospen. Die Plasmamembran ist für die meisten dieser Viren der Ort der Knospung (z.B. *Alpha-*, *Arena-*, *Orthomyxo-*, *Paramyxo-*, *Rhabdo-* und *Retroviridae*). In solchen Fällen werden die Viruspartikel nach der Knospung direkt in den extrazellulären Raum entlassen. Andere Viren hingegen knospen an internen Membranen, z.B. dem ER (z.B. *Rotavirus* und *Flaviviridae*), der inneren Kernmembran (z.B. *Herpesviridae*), dem ER-Golgi Intermediärkompartiment (*Corona-* und *Poxviridae*) oder dem Golgikomplex (*Bunyaviridae* und *Togaviridae*). Kikkert und Kollegen untersuchten die Morphogenese von TSWV, indem sie Protoplasten von *Nicotiana rustica* infizierten (Kikkert *et al.* 1997; Kikkert *et al.* 1999). Mit diesem System wurde eine hohe Synchronität der Partikelreifung erreicht. Ausserdem wurden Lokalnekrosen und systemisch infiziertes Blattmaterial von *N. rustica* elektronenmikroskopisch untersucht. Den beiden Glykoproteinen, welche durch Proteolyse aus einem Vorläuferprotein entstehen (Adkins *et al.* 1996), wurde eine entscheidende Rolle bei der Heranreifung der

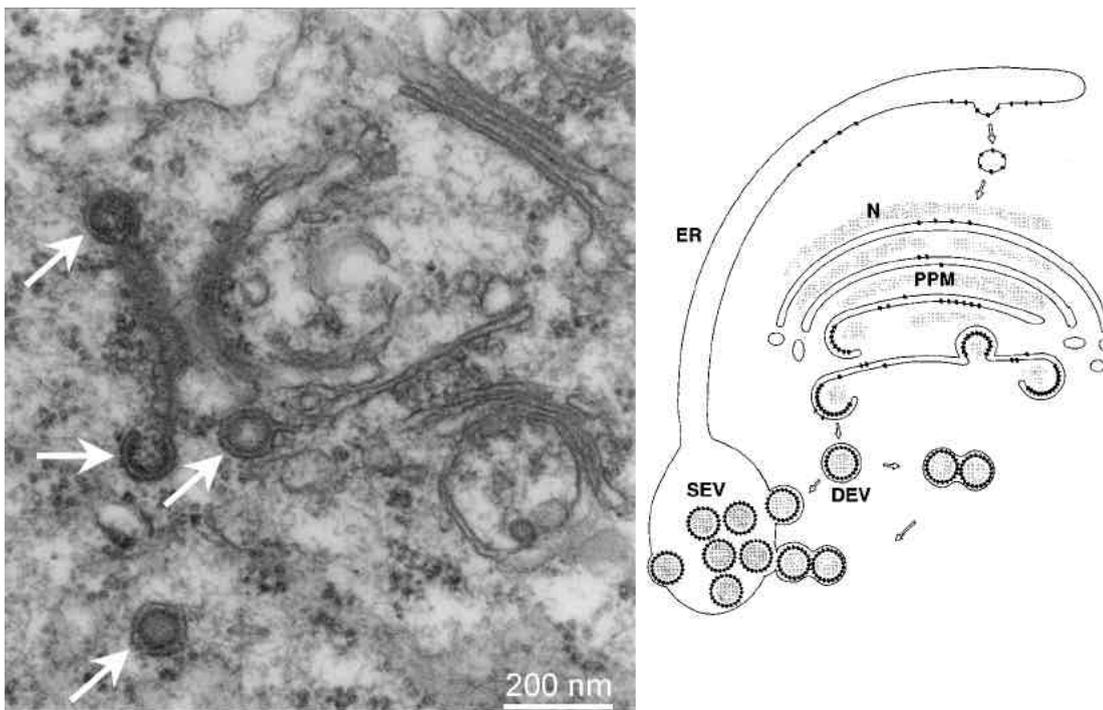


Abb. 1.8 Gepaarte parallele Membranen („paired parallel membranes“ = PPM) in Lokalläsionen von Petunie, vier Tage nach der Inokulation (links, Pfeile) und Modell der TSWV Morphogenese (modifiziert nach Kikkert *et al.* 1999). Die PPM-Strukturen entstehen aus dem Golgi und sind der Ort der Virionmorphogenese. Aus ihnen bilden sich doppelt membranumhüllte Partikel („doubly enveloped particles“ = DEV). Details sind im Text erklärt. SEV = einfach membranumhüllte Partikel („singly enveloped particles“)

membranumhüllten Viruspartikel in der infizierten Zelle zugeschrieben. Es wird vermutet, dass mindestens ein TSWV Glykoprotein oder gar beide ein Golgi-Retentionssignal enthalten, wie dies für das nahe verwandte Uukuniemi *Phlebovirus* gezeigt wurde (Andersson *et al.* 1997). So findet zuerst eine Anhäufung der Glykoproteine im Golgi statt. Sogenannte PPM-Strukturen („paired parallel membranes“) entstehen aus Golgi-Zisternen, welche die frei im Zytoplasma vorliegenden Nukleokapside umhüllen (Abb. 1.8, links). Die auf diese Weise mit einer doppelten Membranhülle ausgestatteten Partikel („doubly enveloped particles“ = DEV) fusionieren miteinander und mit dem Membransystem des ER und bilden auf diese Weise einfach membranumhüllte Viruspartikel (SEV = „singly enveloped particles“) im ER (Abb. 1.8, rechts). Es wurde gezeigt, dass nicht membranumhüllte TSWV *env⁻* Partikel eine Mutation im *G1/G2* Gen aufweisen und die Glykoproteine nicht mehr funktionell exprimieren (Resende *et al.* 1991; Goldbach 1996). Dies unterstützt die Vorstellung, dass die Glykoproteine beim erfolgreichen Verpacken der membranumhüllten Viruspartikel beteiligt sind.

1.4 Die Interaktionen des TSWV Nukleokapsidproteins

Das TSWV N Protein erfüllt im viralen Zyklus verschiedene – zum Teil erst bruchstückhaft verstandene oder bloss vermutete - Aufgaben, welche im folgenden beleuchtet werden. Dabei unterscheidet man Interaktionen mit sich selbst (homotypische Interaktionen), mit anderen viralen Proteinen und RNAs sowie mit Wirts-Proteinen (Pflanzen- und Thripsproteine). Einen aktuellen Artikel über die vielfältigen Funktionen der Kapsidproteine von Pflanzenviren findet man in Callaway *et al.* (2001).

Für die Homopolymerisierung viraler Nukleokapsidproteine kann man die Beteiligung von mindestens zwei Bindungsstellen postulieren, welche miteinander interagieren und auf diese Weise eine fortlaufende geordnete Aggregation der Proteine zu einem höhermolekularen Komplex ermöglichen. Die homotypische Interaktion des TSWV N Proteins (dargestellt in Abbildung 1.9)



Abb. 1.9 Modell der TSWV N Protein Homopolymerisierung: Durch Kopf-Schwanz („head-to-tail“) Interaktionen bilden sich hochmolekulare Komplexe. Für die Protein – Protein Bindung verantwortliche Regionen sind grau (N-Terminus) bzw. grün (C-Terminus) dargestellt. Es wird vermutet, dass diese α -Helices ausbilden (Uhrig *et al.* 1999).

wurde sowohl im Hefe Zwei-Hybrid System (Uhrig *et al.* 1999; Soellick 2000) als auch mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) nachgewiesen (Minke 1998). Durch Interaktionsstudien von Deletions- und Punktmutanten von N wurden zwei N- und C-terminal gelegene Bindungsstellen identifiziert (aas 23 – 39 und aas 233 – 248). Diese sind in Abbildung 1.10 zu sehen. In Übereinstimmung mit der Vorstellung einer Multimerisierung des N Proteins wurde beobachtet, dass die C-terminale Bindungsstelle eines N Proteins mit der N-terminalen des nächsten interagiert. Werden in den Bindungsstellen hydrophobe Aminosäuren zu Alaninen mutiert (F34A, F37A, F242A, F246A), findet keine Interaktion mehr statt. Dabei spielt F246 eine wichtigere Rolle als F242 und F34 eine wichtigere als F37. Diese Phenylalanine sind in den Nukleokapsidsequenzen der *Tospoviridae* konserviert (Uhrig *et al.* 1999). Die C-terminale Bindungsstelle ist besser untersucht und es wird vermutet, dass die Aminosäurefolge KFYEMFGV die Kernsequenz darstellt. Bei den zwei Phenylalaninen handelt es sich um die erwähnten F242 und F246. Die Spezifität der Interaktion wird möglicherweise durch die Glutaminsäure (E) vermittelt (Christoph Rudolph, pers. Mitteilung).

Eine Interaktion des TSWV N Proteins mit dem Movementprotein NSm konnte in einem „Protein Overlay Assay“ gezeigt werden (Soellick *et al.* 2000). Ausserdem wurden in Hefe Zwei-Hybrid-Screens NSm-bindende Proteine der DnaJ-Familie von *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis*

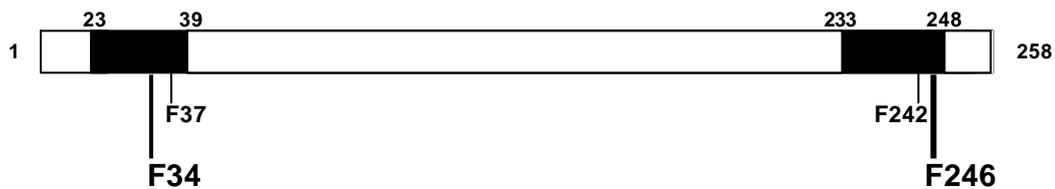


Abb. 1.10 Schematische Darstellung der Bindungsregionen des TSWV N Proteins, welche für dessen Homo-polymerisierung verantwortlich sind (Soellick *et al.* 2000). Die N-terminale und die C-terminale Bindungs-stelle des N Proteins sind schwarz dargestellt. Proteinbereiche, denen bisher keine Bindungseigenschaften zugeordnet wurden, sind weiss. Konservierte Phenylalanine in den Bindungsbereichen sind angezeigt und entsprechend ihres Einflusses auf die Bindungsstärke verschieden gross dargestellt.

thaliana gefunden (Soellick *et al.* 2000). Weitere Experimente führten zur Isolierung von DnaJ-ähnlichen Proteinen aus *Lycopersicon esculentum* (Tomate) und zur Identifizierung eines Proteins aus *A. thaliana*, welches gewisse Homologien zu myosin- und kinesin-ähnlichen Polypeptiden aufweist (von Bargen *et al.* 2001). Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass alle drei in verschiedenen Wirtspflanzen gefundenen DnaJ-ähnlichen Polypeptide eine von den archetypischen DnaJ Chaperone verschiedene Subgruppe bilden. Ausserdem wurden in systemisch mit TSWV infizierten Blättern oder durch einen Hitzeschock gestressten Pflanzen erhöhte Mengen an DnaJ-ähnlichen Proteinen gefunden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass molekulare Chaperone und das Zytoskelett zumindest am intrazellulären Virustransport beteiligt sind.

Es gibt Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem Glykoprotein G2 und dem N Protein, welche zur Entstehung der reifen Viruspartikel führen soll (Goldbach 1996). Ausserdem wurde ein 94 kDa Protein aus Thrips gefunden, welches spezifisch mit TSWV Partikeln interagiert (Kikkert *et al.* 1998).

Das Umschalten von der Transkription zur Replikation der genomischen RNAs durch die RdRp ist bisher schlecht verstanden. Durch Studien in Protoplasten-Transfektionssystemen wird die regulatorische Funktion des in der Pflanzenzelle exprimierten N Proteins auf die RdRp und auf deren Modus (Transkription / Replikation) diskutiert (Steinecke *et al.* 1998). Analoges ist aus Experimenten zu schliessen, bei denen die Anwesenheit von N für die Transkriptions- / Replikationsaktivität der RdRp nötig ist, so z.B. beim Rift Valley Fever Virus (Familie der *Bunyaviridae*; Lopez *et al.* 1995), beim Vesikular Stomatitis Virus (Familie der *Paramyxoviridae*; Arnheiter *et al.* 1985) oder beim Influenza A Virus (Familie der *Orthomyxoviridae*; Biswas *et al.* 1998). Bei anderen *Bunyaviridae* konnte eine Interaktion zwischen der RdRp und dem Nukleokapsidprotein gezeigt werden (Bishop 1990). Mit dem Hefe Zwei-Hybrid-System brachten Experimente, bei denen sechs Peptide der TSWV RdRp gegen das N Protein getestet wurden, bisher keine Ergebnisse (Christoph Rudolph und Joachim Uhrig, pers. Mitteilungen).

Das Studium des viralen Lebenszyklus von TSWV wird bisher durch die Tatsache erschwert, dass es für dieses Virus kein revers-genetisches System gibt. Der *in vitro* Zusammenbau einer

infektiösen subviralen Einheit scheiterte bisher daran, dass die 332 kDa grosse RdRp nicht heterolog exprimiert werden konnte.

Es ist seit langem bekannt, dass das TSWV N Protein mit RNA assoziiert ist (Mohamed 1973). Richmond und Kollegen subklonierten Regionen des N ORF in einen pET Vektor und exprimierten die mit einer N-terminalen (His)₆-Fusion versehenen Proteine bzw. Deletionskonstrukte in *E. coli* (Richmond *et al.* 1998). Als ssRNA-Substrate für Bindungsstudien wurden das NSs ORF, das RNA3-Segment von CCMV (Cowpea Chlorotic Mottle Virus, Gattung *Bromovirus*, positivsträngiges RNA-Virus) sowie die „multiple cloning site“ (MCS) aus pBluescript KS⁺ verwendet. Von den getesteten Proteinen banden nur NN (amino-terminale Hälfte des N Proteins, aas 1-127), NC (carboxyl-terminale Hälfte des N Proteins, aas 129-258) und N4 (äusserster C-Terminus des N Proteins, aas 191-258) die RNA-Substrate. Das N3-Fragment (N-terminale Hälfte des NC-Fragmentes, aas 129-190) zeigte keine RNA-Bindung. Die Tatsache, dass die RNA-Substrate entweder in einem „freien“ oder „gebundenen“ Zustand vorlagen, wurde als Hinweis auf eine kooperative Bindung gedeutet. Da sowohl die NSs RNA als auch die Kontroll-Substrate (CCMV RNA3 und MCS RNA) gebunden wurden, postulierten die Autoren eine sequenz-unspezifische Bindungseigenschaft des N Proteins. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Minke (1998) erschien die RNA-Bindung irreversibel. Hefe tRNA und einzelsträngige DNA konnten die RNA-Bindung nur verringern, wenn sie gleichzeitig mit dem radioaktiv markierten Transkript zum N Protein gegeben wurden. In diesem Fall kann man aber nicht von einer Konkurrenz sprechen, obwohl dies in gewissen Veröffentlichungen getan wird (Richmond *et al.* 1998; Osborne *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu wurde doppelsträngige RNA nicht gebunden. Die Autoren spekulierten, dass das N Protein *in vivo* die einzelsträngigen Bereiche der „Panhandles“ binden könnte. Ebenso wurde der Einfluss der Ionenkonzentration auf die Protein - RNA Interaktion untersucht (Richmond *et al.* 1998). Unter den gewählten Bedingungen reichten 0.6 M NaCl aus, um die Bindung zu inhibieren. Dies deutet auf elektrostatische Interaktionen zwischen N Protein und RNA hin. Über die Enkapsidierung des TSWV-Genoms ist wenig bekannt. Eine spezifische Bindung der S RNA „Panhandle“ wurde postuliert (Minke 1998).

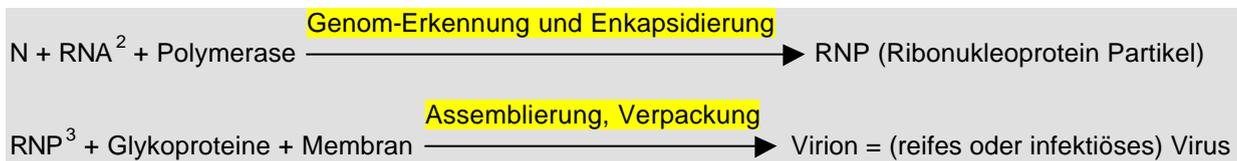
1.5 Nukleokapsidproteine und Genom-Enkapsidierung bei TMV und Influenza A

1.5.1 Begriffe

Alle Viren mit negativsträngigem RNA-Genom kodieren für ein ssRNA-bindendes Nukleokapsidprotein (Portela *et al.* 2002). Die wichtigste Aufgabe des Nukleoproteins ist die Enkapsidierung des viralen Genoms, damit dieses transkribiert, repliziert und verpackt werden kann. Im folgenden werden die Nukleoproteine von zwei aussergewöhnlich intensiv erforschten RNA-Viren - Tabak Mosaik Virus (TMV) und Influenza A - sowie deren biologische Funktionen

vorgestellt. Ausserdem werden Modelle der Genom-Enkapsidierung für diese Viren präsentiert. Die nahe mit TSWV verwandten Viren der *Hanta*- und *Bunyavirus* Genera werden in Kapitel 4 im Rahmen der in dieser Dissertation vorgestellten Daten diskutiert.

Um Missverständnissen vorzubeugen, werden im folgenden Begriffe definiert, welche die Morphogenese eines membranumhüllten Virus beschreiben:



Weil die meisten Pflanzenviren keine Membran besitzen, werden diese Begriffe bei ihnen oft gleichbedeutend verwendet. In dieser Arbeit sollen sie jedoch klar unterschieden werden.

1.5.2 Tabak Mosaik Virus (Gattung *Tobamovirus*)

Das Tabak Mosaik Virus (TMV) war die erste makromolekulare Struktur, deren Enkapsidierung *in vitro* gezeigt werden konnte (Zimmern *et al.* 1976; Zimmern 1976; Übersichtsartikel: Hirth *et al.* 1981; Butler 1999; Culver 2002). Bereits 1955 gelang es, das Virus aus seinen Komponenten – Protein und RNA – zu rekonstituieren (Fraenkel-Conrat *et al.* 1955). TMV besitzt ein einziges 6398 Nukleotide langes RNA-Molekül positiver Polarität (Goelet *et al.* 1982). Ein Hüllprotein-Monomer („coat protein“, CP) ist 17.4 kDa gross. 1977 wurde die RNA-Sequenz identifiziert, welche den „Origin of Assembly“ bildet (Abb. 1.11 (A); Zimmern *et al.* 1977; Zimmern 1977). Die Selbstassemblierung beginnt durch die Bindung eines 876 Nukleotide vom 3' Ende entfernten spezifischen „Stem-Loops“ der einzelsträngigen viralen RNA an ein Loch, welches sich in der Mitte eines aus zwei Kapsidscheiben bestehenden Ringes befindet (Abb. 1.11 (B)). Auf Grund hydrophober Wechselwirkungen bilden sich diese zweilagigen Ringe in Lösung spontan aus jeweils zwei mal 17 Proteinmonomeren (Abb. 1.11 (C); Durham *et al.* 1971; Durham 1972; Durham *et al.* 1972). Sie werden wegen ihres Sedimentationskoeffizienten auch als 20S Aggregate bezeichnet. In Abwesenheit von RNA ist die Struktur im Innern der Ringe ungeordnet. Die RNA-Bindung erzwingt eine bestimmte Ausrichtung der Aminosäurereste, wodurch die RNA eingeschlossen wird und ein stabiler, helixförmiger Nukleoprotein Komplex entsteht (Abb. 1.11 (D); Bhyravbhatla *et al.* 1998; Caspar 1980). Die Verlängerung des Virions erfolgt sowohl in die 5' Richtung als auch in die 3' Richtung der RNA (Schuster *et al.* 1980). Beim sogenannten „inside-out“ Modell der Verpackung in 5' Richtung wird das 5' Ende der RNA durch das zentrale Loch der Helix hinaufgezogen (Abb. 1.11 (B); Lebeurier *et al.* 1977). Der Zusammenbau erfolgt rasch durch Anlagerung von 20S Aggregaten (Schuster *et al.* 1980; Shire *et al.* 1979; Turner *et al.* 1989). In 3' Richtung erfolgt der Zusammenbau wesentlich langsamer und beinhaltet die Anlagerung einzelner

² RNA mit Enkapsidierungssignal

³ RNP mit Verpackungssignal in jedem Genom-Segment

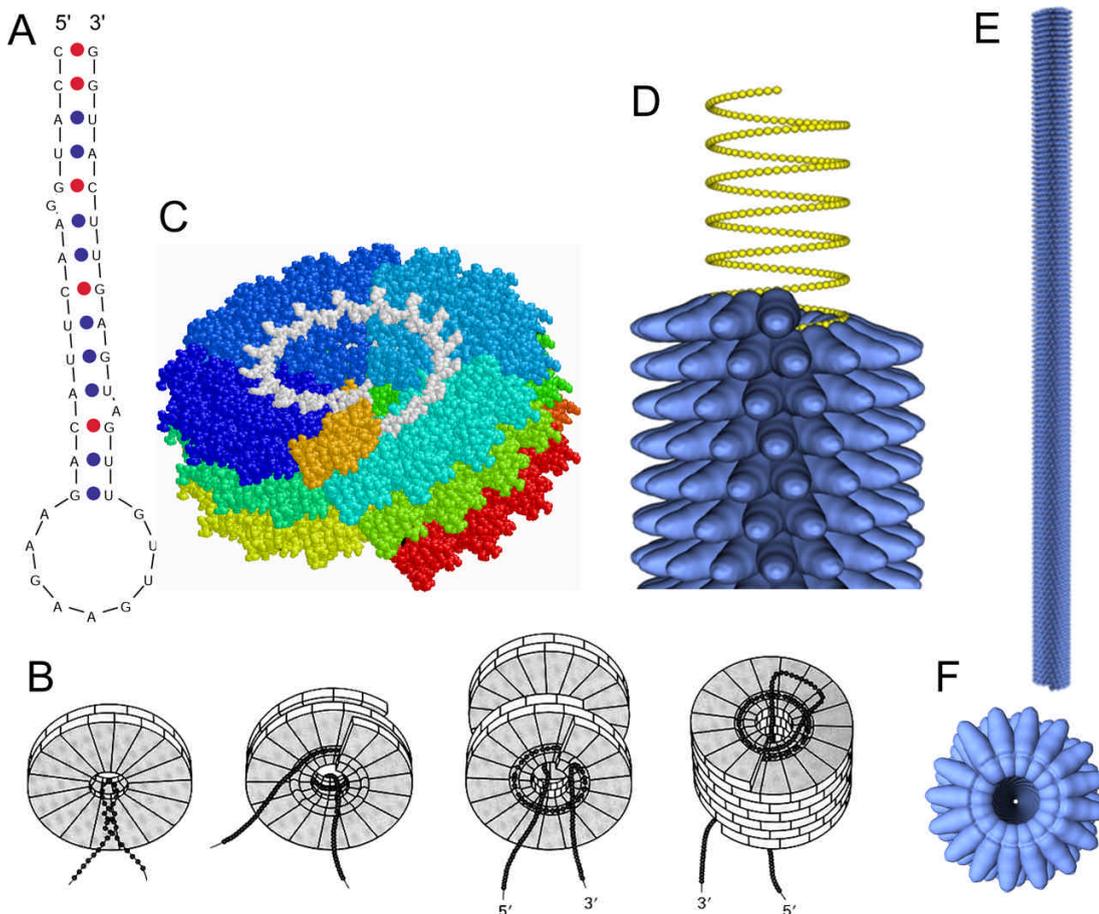


Abb. 1.11 Die Selbstassemblierung des Tabak Mosaik Virus (TMV).

(A) Nukleotidsequenz und von MFOLD (Walter *et al.* 1994); Temperatur = 20°C) berechnete Sekundärstruktur des „Origin of Assembly“ von TMV (nach Zimmern 1977).

(B) Modell der Selbstassemblierung aus Proteinscheiben und der viralen RNA (Butler 1984)

(C) Eine Proteinscheibe mit RNA (weiss), im „spacefill“-Modus dargestellt (Rolf Bergmann, Universität Hamburg). Die Proteine sind von rot nach blau wechselnd entlang der Helix gefärbt. Die oberste Untereinheit ist hellbraun hervorgehoben. Jede Proteinuntereinheit bindet an drei Nukleotide der RNA.

(D) Detail eines TMV-Partikels. Zur besseren Visualisierung der ssRNA (gelb) wurden z.T. die Hüllproteine (blau) weggelassen.

(E) Modell eines kompletten Tabak Mosaik Virus (ca. 300 x 15 nm)

(F) Blick auf ein TMV-Partikel von dessen Ende her

Die Abbildungen (D), (E) und (F) stammen von Peter Sforzas Internetseite „Tobacco Mosaic Virus 3-D Images“, <http://www.ppws.vt.edu/~sforza/tmv/tmv.html> (2001)

Monomere oder kleiner Dimer/Trimer Aggregate (Lomonosoff *et al.* 1980). *In vivo* verschieben hohe CP-Konzentrationen das Gleichgewicht in Richtung Assemblierung (Schuster *et al.* 1980).

1.5.3 Influenza A Virus (Familie der *Orthomyxoviridae*)

Das Influenza A Virus enthält ein aus acht Segmenten bestehendes RNA-Genom negativer Polarität, welches für insgesamt 10 Gene kodiert. Im Gegensatz zu den meisten anderen negativsträngigen RNA Viren repliziert Influenza im Kern infizierter Zellen (Übersichtsartikel: Lamb 1996). Der virale Ribonukleoprotein-Komplex (vRNP; Abb. 1.12 (B)) besteht aus vRNA, Nukleoprotein (NP, 56 kDa) und den drei Untereinheiten der Polymerase (PB2, PB1 und PA). Dieser wird in den Kern transportiert, wo Transkription und Replikation ablaufen. Die von NP enkapsidierte negativsträngige vRNA muss zuerst von der viralen RdRp in mRNA transkribiert

werden, welche dann als Template für die Proteinsynthese dient. Bei der Replikation wird die vRNA in Vollängen-cRNA umgeschrieben, welche wiederum als Template für die Synthese neuer vRNA dient. Die minimale funktionelle Einheit von Influenza ist also der vRNP Komplex, der acht Segmente umfasst, die alle in den Nukleus transportiert werden müssen.

Die Abbildung 1.12 (A) gestattet einen Blick in das Innere eines Influenza A Virus (nach Kaplan *et al.* 1977). Die Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) „Spikes“ sind in eine Lipid-Doppelmembran eingebettet, welche die äussere Hülle des Virus bildet. Der Virionkern enthält die acht ssRNA-Segmente sowie die bereits erwähnten Proteine NP, PA, PB1 und PB2. Das Matrix-Protein (M1) ist das in grösster Stückzahl vorkommende Protein des Virus (ca. 3000 Kopien). Es bildet eine Proteinhülle von 6 nm Dicke direkt unterhalb der viralen Membran und ist vermutlich die entscheidende Komponente bei der Virusknospung (Gomez-Puertas *et al.* 2000). Ein kleineres Membranprotein (M2) ist auf dieser älteren Darstellung noch nicht eingezeichnet. Es handelt sich um einen Protonenkanal, welcher das „uncoating“ von Virionen in Endosomen erleichtert und den pH im trans-Golgi Netzwerk moduliert (Lamb *et al.* 1985; Grambas *et al.* 1992). Das NP kommt in

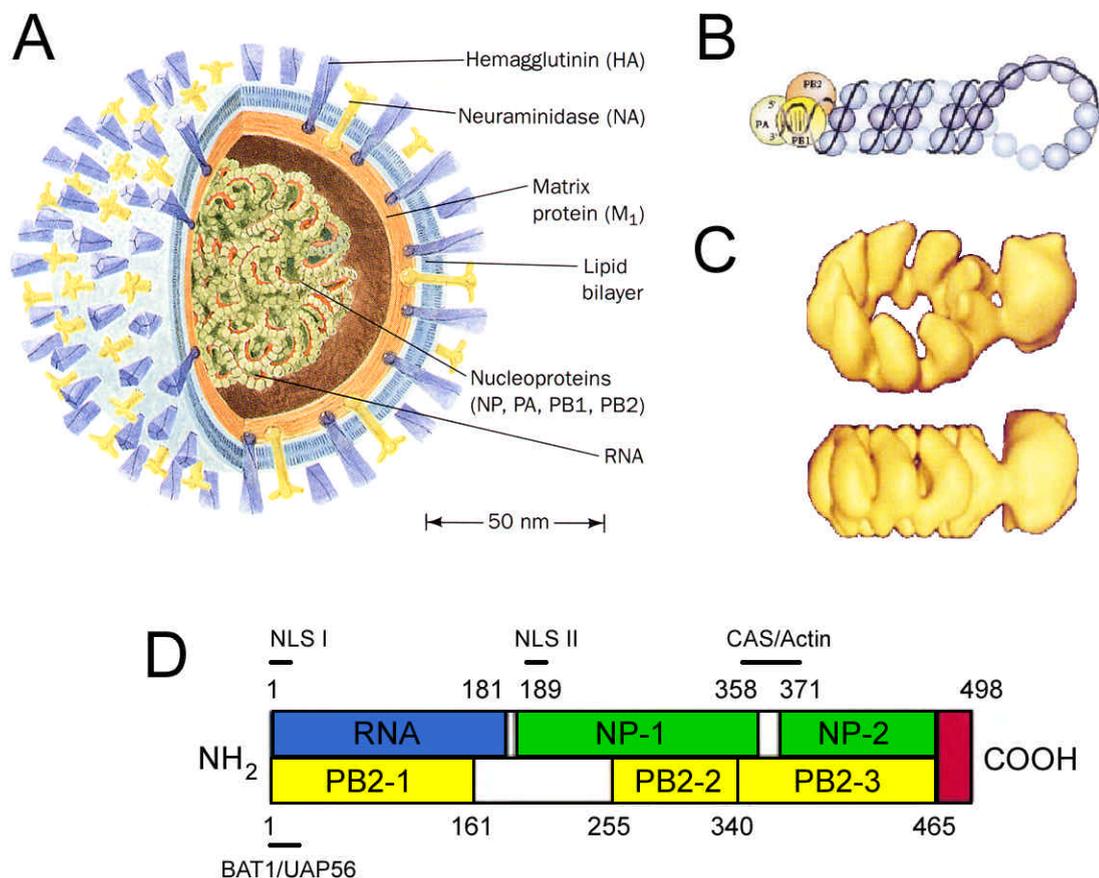


Abb. 1.12 Das Influenza Virus, ein *Orthomyxovirus*.

(A) Blick in ein Influenza Virus (nach Kaplan and Webster 1977)

(B) Cartoon-Modell der Influenza RNP Organisation. Blaue Kugeln stellen NP Monomere dar, welche mit der vRNA (schwarze Linie) interagieren. Die heterotrimeren RdRp ist an die konservierten 5' und 3' Enden gebunden.

(C) 3D-Ansicht eines *in vitro* rekonstituierten mini-RNP, welches aus neun NP Monomeren und einer heterotrimeren Polymerase besteht (nach Martin-Benito *et al.* 2001).

(D) Funktionelle Domänen des NP (Portela and Digard 2002)

Für weitere Informationen siehe Text.

etwa 1'000 Kopien vor. Die Untereinheiten der Polymerase liegen in je 30-60 Kopien vor. Die viralen RNAs haben Längen zwischen 890 und 2341 Nukleotiden.

Eine schematische Darstellung der RNP-Organisation von Influenza ist in Abbildung 1.12 (B) gezeigt (nach Compans *et al.* 1972 und Portela *et al.* 2002). Die blauen Kugeln repräsentieren NP Monomere, welche an der einzelsträngigen vRNA (schwarze Linie) gebunden sind. Die vRNA scheint um die Nukleoproteine herum gewunden zu sein. Sie bildet eine „Panhandle“ aus, welche durch Basenkomplementarität zwischen dem 5' und 3' Ende entsteht. Die RdRp bindet in dieser Region (Übersichtsartikel: Klumpp *et al.* 1997). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Polymerase mit der vRNA in einer „Korkenzieher“-Konformation interagiert (Flick *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass der Wechsel von der Transkription zur Produktion von Vollängen vRNA durch die Auflösung der „Panhandle“-Struktur ausgelöst wird (Beaton *et al.* 1986; Shapiro *et al.* 1988). Nachdem ursprünglich angenommen wurde, dass das 3' Ende enthalte die Promoterelemente für die Polymerasebindung und Transkriptionsinitiation (Parvin *et al.* 1989; Seong *et al.* 1992), so deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass das 5' Ende der vRNAs sowohl für die Endonukleaseaktivität als auch die Transkriptionsinitiation der RdRp notwendig ist (Hagen *et al.* 1994; Cianci *et al.* 1995). *In vitro* Experimente mit kurzen RNA-Molekülen viralen Ursprungs zeigten eine Interaktion des RdRp-Komplexes mit den konservierten 5' und 3' Enden. Abbildung 1.12 (C) zeigt eine 3D-Rekonstruktion eines rekombinanten mini-RNPs in Schräg- und Seitenansicht mit 27 Å Auflösung (Martin-Benito *et al.* 2001). Der Komplex besteht aus neun NP Monomeren und einer Kopie der RdRp, welche an der „Panhandle“ gebunden ist.

In Abbildung 1.12 (D) sind die funktionellen Domänen des Influenza NP dargestellt (gezeichnet nach Portela *et al.* 2002). Der RNA-Bindungsbereich ist blau dargestellt, wichtige Domänen für die Interaktion mit anderen Nukleokapsidproteinen grün. Gelbe Bereiche können mit PB2, einer Polymerase-Untereinheit, interagieren. Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäurereste. Die C-terminale saure Region ist rot eingezeichnet. Sie repräsentiert die Bindung von PB2 an das NP. Die horizontalen schwarzen Balken geben Regionen an, welche an zelluläre Polypeptide binden: Actin (Digard *et al.* 1999), BAT1/UAP56 (mögliche Funktion in der Transkription; Momose *et al.* 2001), Importin α (NLS I; O'Neil *et al.* 1995) und / oder Kernlokalisierungssignal (NLS I und II), cytoplasmatisches Akkumulationssignal (CAS).

Die Abbildung 1.13 erläutert die aktuellen Modelle für die Synthese positivsträngiger Influenza RNA (Portela *et al.* 2002). In (A) wird die mRNA-Synthese dargestellt. Die Bindung der trimeren RdRp an die „Panhandle“-Struktur der vRNA stimuliert deren „cap“-Bindungs- und Endonuklease-Aktivität, wodurch ein kurzes, „gecaptes“ RNA-Fragment (blaue Linie) aus einer Wirtszellen-mRNA entsteht. Dieses dient als Primer für die Initiation der Virustranskription (grüne Linie). Die Polymerase bleibt während der Transkription am 5' Ende der vRNA gebunden, was schliesslich zu einer sterischen Hinderung der Transkription am „Polyuridine Stretch“ und zum Anhängen eines poly(A)-Schwanzes führt (Zheng *et al.* 1999). Im Teil (B) der Abbildung 1.13 werden die möglichen Rollen des NP in der cRNA-Synthese erklärt. Dazu gibt es zwei Modelle. Die „Polymerase Modifikations-Hypothese“ besagt, dass eine Interaktion zwischen NP und RdRp eine „ungeprimte“ Transkriptionsinitiation bewirkt. (Mena *et al.* 1999) untersuchten 20 Mutanten des Influenza A Virus NPs. Die Autoren vermuteten, dass diese mutierten NPs eine verringerte Fähigkeit zur Interaktion mit dem Polymerase-Komplex haben und dass diese NP – Polymerase Interaktion für den Wechsel von mRNA zu cRNA Synthese (Transkription zu Replikation) verantwortlich ist. Die „Template Modifikations-Hypothese“ hingegen postuliert, dass NP die „Panhandle“-Struktur auflöst (Baudin *et al.* 1994) und so die Polymerase zu einer „ungeprimten“ Transkriptionsinitiation bringt. Die „Produktenkapsidierungs-Hypothese“ schliesslich besagt, dass NP notwendig ist, um die entstehende cRNA co-transkriptionell zu verpacken. Die Synthese der cRNA hört erst nach dem Readthrough des „Polyuridin-Stretches“ und der Herstellung einer Vollängen-Kopie des Genoms auf.

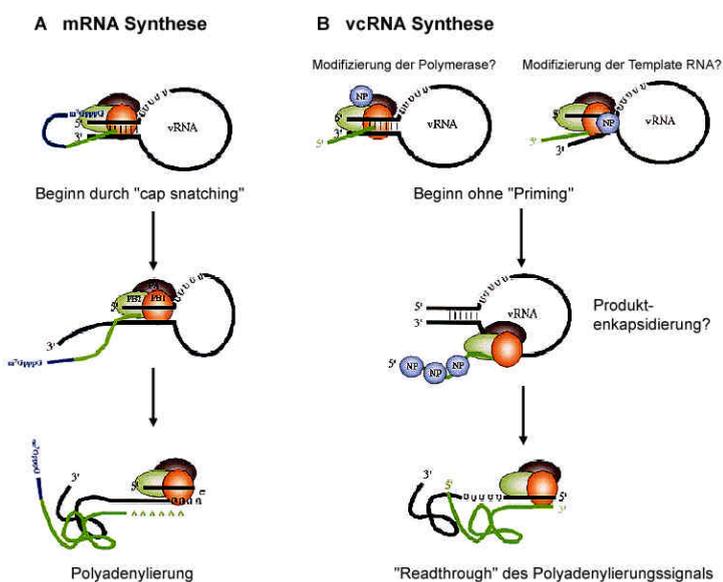


Abb. 1.13 Modelle für die Positivstrang RNA-Synthese des Influenza Virus (Portela and Digard 2002).

(A) mRNA-Synthese

(B) Mögliche Rollen des NP in der vcRNA-Synthese
Details siehe Text.

Hinweise auf eine Homo-Oligomerisierung des Influenza NP ergaben sich bereits aus frühen Arbeiten, in denen die physikalischen Charakteristika der RNPs nach Entfernung der RNA untersucht wurden (Kingsbury *et al.* 1969; Pons *et al.* 1969). Durch Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass gereinigtes, RNA-freies NP Strukturen ausbilden kann, welche authentischen RNPs ähneln (Ruigrok *et al.* 1995). Durch Deletionsmutagenese wurden zwei Regionen identifiziert, welche für die Ausbildung von NP – NP Interaktionen wichtig sind. Diese sind in Abbildung 1.12 (D) als NP-1 und NP-2 beschriftet (Elton *et al.* 1999). Interessanterweise erniedrigen die C-terminalen 23 Aminosäuren des NP dessen Fähigkeit zur Oligomerisierung.

Defekte genomische Influenza A Virus RNAs enthalten mindestens 80-90 Nukleotide am 5' Ende, wohingegen das 3' Ende bis zu 25 Nukleotide kurz sein kann (Jennings *et al.* 1983). Ausserdem wurde berichtet, dass die 150 5'-terminalen Nukleotide für die Replikation und Enkapsidierung von Influenza Virionen in Zellkultur notwendig sind (Duhaut *et al.* 2000; Duhaut *et al.* 2002). Daher wird vermutet, dass der „Origin of Assembly“ bei Influenza am 5' Ende der genomischen RNAs liegt.

1.6 Zielsetzung

Es wird allgemein angenommen, dass die Verpackung von viralen Genomen einen geordneten Prozess darstellt. Im Fall von RNA-Viren sollte einerseits eine Unterscheidung des viralen Genoms von viraler mRNA und andererseits von zellulären RNAs erfolgen. Die vorliegende Dissertation soll experimentelle Grundlagen und Daten für ein Modell der Enkapsidierung der S RNA von TSWV liefern, wobei unter Enkapsidierung die Verpackung des Genoms durch viele Kopien des N Proteins verstanden wird. Die zentrale Aufgabe bestand also darin, die TSWV N Protein – RNA Interaktionen im Hinblick auf deren Stärke und Spezifität zu untersuchen. Bisher wurde nur eine allgemeine RNA-Bindungs-fähigkeit des TSWV N Proteins publiziert (Richmond *et al.* 1998).

Ausserdem sollte die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss die Homopolymerisierung des N Proteins auf dessen Fähigkeit zur RNA-Bindung hat. Die Untersuchung der N Protein-Komplexe sollte Auskunft darüber geben, ob bestimmte Oligomerisierungszustände bevorzugt auftreten. Diese könnten als Zwischenstufen in der Verpackung der genomischen (und antigenomischen) RNA dienen. Ausserdem sollte durch Expression und Reinigung mutanter N Proteine untersucht werden, ob sich die vorgeschlagenen Interaktionsdomänen des N Proteins (Uhrig *et al.* 1999) mit biochemischen Methoden bestätigen lassen. Mit Hilfe der N Protein Mutanten liesse sich auch die RNA-Bindungsregion des N Proteins genauer charakterisieren.

Kapitel 2 - Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Chemikalien und Medienzusätze wurden reinst oder in p.A.-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), J.T. Baker Chemicals (Deventer), Biomol (Hamburg), Roche Biochemicals (Mannheim), Difco Laboratories (Detroit), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe; früher GIBCO BRL, Gaithersburg), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Riedel de Haën (Seelze), Biozym Diagnostics (Oldendorf) oder Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen. Enzyme stammten von Roche Biochemicals (Mannheim), GIBCO BRL (Gaithersburg), New England Biolabs (Schwalbach), USB (Cleveland), Stratagene (La Jolla) und ICN Biomedicals (Eschwege). Filter, Membranen und Säulenmaterialien wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Millipore (Bedford), Nalgene (Rochester), Satorius (Göttingen), Whatman (Maidstone) und Calbiochem (La Jolla) angeschafft. Kodak Eastman (Rochester) lieferte das benutzte Filmmaterial (BioMax MR Super Rapid).

Für die Aufreinigung von Plasmiden aus *E. coli* wurden das „Plasmid Mini Kit“ sowie das „Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) sowie das „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen benutzt.

Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und Invitrogen (früher GibcoBRL / Life Technologies) bezogen. Radioaktive Isotope ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{CTP}$ und $[\alpha^{33}\text{P}]\text{UTP}$) wurden von Amersham Biosciences geliefert.

Für die denaturierende Auftrennung von Proteingemischen mittels Gelelektrophorese wurden vorgegossene 12% Novex Tris-Glycine Gele der Firma Invitrogen (Carlsbad) verwendet. Da diese kein SDS enthalten, wurden die SDS-Gele zum Teil auch selber gegossen. Die Komponenten dazu wurden von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) geliefert. Von der gleichen Firma wurden Dialyseschläuche bezogen (Marke „Visking“ aus regenerierter Zellulose, MWCO 14 kDa). Pierce Mini-Dialysiereinheiten wurden von der KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar) geliefert. Die zur Proteinaufreinigung benutzte Ni-NTA Agarose wurde von Qiagen hergestellt.

Zum Abspalten der N-terminalen (His)₆-Fusion von pET28a-exprimierten Proteinen wurde das „Thrombin Cleavage Capture Kit“ von Novagen verwendet.

Das zur Immunolokalisierung des TSWV N Proteins verwendete Antiserum wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bereitgestellt (TSWV AS-0580, raw antiserum). Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper stammten von Amersham Pharmacia Biotech.

Für BN-PAGE und Gelfiltrationsanalysen des TSWV N Proteins wurde z.T. das zwitterionische Detergens Lauryl sulfobetaine SB-12 (N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate, $C_{17}H_{37}NO_3S$, MW 335.5) verwendet:



Alle hitzebeständigen Lösungen sowie Glas- und Plastikmaterialien wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert.

2.1.2 Laborgeräte

Die folgenden zwei Photometer wurden verwendet: Amersham Biosciences Ultrospec 1000 UV/Visible Spectrophotometer und Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS Spectrophotometer. Letzteres bietet die Möglichkeit, Scans über grosse Wellenlängenbereiche durchzuführen und auszudrucken. Es wurden Zentrifugen der Firmen Beckman Instruments (München), Eppendorf GmbH (Hamburg), Heraeus Christ (Osterode), Hettich (Tuttlingen) und Sorvall Du-Pont (Bad Nauheim) benutzt. Ein Agilent 2100 Bioanalyzer (Lab-on-a-Chip™ Technologie) diente zur Quantifizierung und Grössenbestimmung von DNA und RNA (Agilent Technologies, Böblingen). Zur Quantifizierung von Radioaktivität wurden ein Storm 860 beta imager (Amersham Lifesciences) sowie ein LS 6500 Multi-Purpose Scintillationszähler (Beckman Instruments) verwendet.

Für die CD-Spektroskopie wurden folgende Geräte verwendet: Jasco J-715 Spectropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt), Jasco Spectropolarimeter Power Supply PS-150J, Jasco PTC-348WI (Thermostat-Kontrolleinheit), Julabo F25 (Thermostat). Die Messungen wurden im Labor von Dietmar Schomburg (Universität zu Köln, Institut für Biochemie) durchgeführt.

Für die Gelfiltration wurde eine Sephacryl S-200 HR Säule verwendet (Amersham Biosciences). Diese hat gemäss Herstellerangaben (Amersham Biosciences) einen Anwendungsbereich von 5 kDa – 250 kDa (bezogen auf globuläre Proteine). Ausserdem wurden eine Pharmacia Biotech Pump P-1 und eine Pharmacia Optical Unit UV-1 zur UV-Absorptionsmessung ($\lambda=280$ nm) eingesetzt. Zur Fluoreszenzmessung diente ein Shimadzu RF-535 Fluorescence HPLC Monitor (Anregung bei 260 nm, Emission bei 290 nm). Aufgezeichnet wurde mit einem LKB Bromma 2210 Recorder.

2.1.3 Viren und Organismen

Tomato Spotted Wilt Virus

TSWV Isolat L3 aus Bulgarien, isoliert aus Salat, DSMZ-Nr. PV-0182 (Adam *et al.* 1991)

Escherichia coli

BL21(DE3) F^+ , *dcm ompT hsdS(rB^mB)* *gal* λ (DE3) (Stratagene)

BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>dcm ompT hsdS(rB^mB) gal λ</i> (DE3) [pLysS Cam ^r] (Stratagene)
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	F ⁻ , <i>ompT hsdS(rB^mB) dcm⁺ Tet^r gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [argU, ileY, leuW Cam ^r] (Stratagene)
DH5α	F ⁻ <i>f80dlacZ DM15 D(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻-m_k⁺) deoR thi-1 supE44 I- gyrA96 relA1</i> (Hanahan 1983)
ER2566	F ⁻ <i>λ fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 D(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-- TetS)2 R(zgb-210::Tn10) (TetS) endA1 [dcm]</i> (New England Biolabs)
HMS174(DE3)	F ⁻ <i>recA hsdR(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) Rif^r</i> (DE3) (Novagen)
JM109	F ⁻ <i>traD36 proA⁺B⁺ lac^f D(lacZ)M15/ D(lac-proAB) glnV44 e14 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
M15[pREP4]	F ⁻ <i>Na^s Str^s rif^s lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ recA⁺ uvr⁺</i> (Qiagen) pREP4: Repressor-Plasmid, abgeleitet von pACYC (Qiagen)

2.1.4 Vektoren

Escherichia coli Plasmide zur schnellen Klonierung von PCR-Fragmenten

- pCR4Blunt-TOPO Vektor mit Ampicillin- und Kanamycinresistenz zur Sequenzierung von PCR-Produkten. In einer 5minütigen Reaktion werden die Fragmente mit glatten Enden in den „aktivierten“ Vektor kloniert, an dessen 3' Ende die Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus kovalent gebunden ist. (Invitrogen)
- pCR-Blunt II-TOPO Ähnlich dem obigen Vektor, aber mit Kanamycin- und Zeocinresistenz sowie T7 Promoter.

Escherichia coli Plasmide zur Proteinexpression

- pET16b Vektor zur IPTG-induzierbaren Expression von (His)₆-fusionierten Proteinen in *E. coli*-Stämmen, die das DE3 Lysogen (Studier *et al.* 1986) chromosomal integriert haben (Novagen). Er wird mit Ampicillin selektioniert. Davon abgeleitet: pET16b-ARF1 mit N-terminaler (His)₁₀-Fusion (Uhrig 1996) und pET16b-N NΔ39 mit N-terminaler, nicht entfernbare (His)₆-Fusion.
- pET28a Analog pET16b, aber mit Kanamycin-Resistenzgen. Davon abgeleitet: pET28a-N wt, pET28a-N NΔ22, pET28a-N NΔ39, pET28a-N NΔ223, pET28a-N CΔ26, pET28a-N F242A, pET28a-N F246A und pET28a-N F242_246A. Die exprimierten Proteine besitzen eine mit Thrombin abspaltbare N-terminale (His)₆-Fusion. Von pET28a-N CΔ26 gibt es ausserdem eine Version mit C-terminaler, nicht entfernbare (His)₆-Fusion.

pGJ203	Vektor zur Expression von GFP-S65C mit einer N-terminalen (His) ₆ -Fusion (Reichel <i>et al.</i> 1996). Ausserdem wurde CAT-GFP mit und ohne N-terminale (His) ₆ -Fusion von Guido Jach zur Verfügung gestellt.
pQEC	<i>Xho</i> I / <i>Bam</i> HI Fragment des Promoter-Operator-Elements sowie der synthetischen Ribosomen Bindungsstelle der QIAexpress pQE Vektoren, kloniert in pQE9 (Minke 1998). pQE9 ist ein Derivat von pDS56/RBSII (Qiagen, Hilden). Von pQEC abgeleitet sind die Expressionsvektoren pQEC-N wt, pQEC-N F242A und pQEC-N F246A, welche Proteine mit C-terminaler (His) ₆ -Fusion exprimieren.

Escherichia coli Plasmide zur RNA *in vitro* Transkription

pBS-KS(±)/SK(±)	pBluescript II; multifunktionelle Klonierungsvektoren, u.a. auch zur <i>in vitro</i> Transkription (Stratagene)
pBS-SY ₃₀₅₀₋₃₄₃₉	Derivat des Vektors pBS-KS ⁺ , in dem sich die Nukleotide 3050-3439 der RNA 2 des Barley Yellow Mosaic Bymovirus (BaYMV) befinden (Davidson <i>et al.</i> 1991). <i>In vitro</i> Transkription des <i>Dra</i> I / <i>Nhe</i> I Fragments ergibt eine RNA von 173 b Länge.
pTSWV-S	S RNA von TSWV L3 in pUC9 (Heinze <i>et al.</i> 2001) ⁴
pUC19	Ein multifunktionaler Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenz (Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985). Derivate zur <i>in vitro</i> Transkription von TSWV Genom- und Antigenomteilen: pUC-5'-Ende enthält 198 Basen des 5' Endes der TSWV S RNA, pUC-3'-Ende 198 Basen des 3'-Endes der TSWV S RNA und pUC-panS eine von der S RNA abgeleitete Mini-Panhandle (je 96 Basen des 5' Endes und 96 Basen des 3' Endes, fusioniert über 6 Nukleotide einer <i>Sma</i> I-Schnittstelle). In allen Fällen wurde über <i>Eco</i> RI und <i>Bam</i> HI kloniert (Minke 1998).

2.1.5 Oligonukleotide

Eine Auflistung aller verwendeter Oligonukleotide findet man im Anhang (Kap. 7.1).

⁴ Das Plasmid pTSWV-S wurde von Dr. Cornelia Heinze (Universität Hamburg) kloniert und zur Verfügung gestellt. Es enthält das gesamte TSWV S Genomsegment sowie einen modifizierten T7 Promoter am 5' Ende. Da keine Sequenzinformationen vorlagen, wurde das TSWV S RNA Segment samt flankierenden Bereichen sequenziert. Ein Vergleich mit der publizierten Sequenz (Maiss *et al.* 1991) brachte im für die IVTs relevanten Bereich einen einzigen Unterschied zu Tage: A→G an Position 62.

Zur IVT der Vollängen S RNA wird eine PCR mit einem der drei Oligonukleotide pBI-T7, pBI-T7G oder pBI-T7GG für das 5' Ende sowie dem Oligonukleotid TSWV3v für das 3' Ende durchgeführt (vgl. Kap. 7.1). Das PCR-Produkt dient nach Phenol / Chloroformextraktion als Template für die IVT. Alternativ kann das Plasmid mit *Kpn* 2I linearisiert und das gereinigte Produkt direkt in der IVT eingesetzt werden. Damit entstehen allerdings keine perfekten viralen Enden.

2.1.6 Lösungen, Kulturmedien und Puffer

Lösungen wurden entsprechend den Anweisungen aus Sambrook *et al.* (1989), Ausubel (1987) bzw. laut Herstellerangaben mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore) hergestellt und – soweit möglich – bei 125 °C für 20 min autoklaviert oder mittels einer Nalgene Filtereinheit (0,22 µm; Nalgene) steril filtriert. Die Verwendung von Diethylene Pyrocarbonate (DEPC) zur Inaktivierung von RNAsen war nicht notwendig. Autoklavierung reicht aus, um einen substanziellen Anteil der RNAsen irreversibel zu inaktivieren (Ambion Technical Bulletin 178, 2002). Hinzu kommt, dass Lösungen, die Tris enthalten (wie z.B. die für GEMSAs verwendeten TB und TBP Puffer), nicht mit DEPC behandelt werden dürfen. DEPC inaktiviert RNAsen durch Alkylierung von Histidinresten im aktiven Zentrum und reagiert generell mit primären Aminen.

Medien für *Escherichia coli*

Medien für Bakterien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder laut Herstelleranweisungen hergestellt und für 20 min bei 125 °C autoklaviert. Die Zusammensetzung der wichtigsten ist im folgenden beschrieben:

YT-Medium:	Bacto-Trypton:	0.8% (w/v)
	Bacto Yeast Extract:	0.5% (w/v)
	NaCl:	0.25% (w/v)
	pH-Wert mit NaOH auf 7.0	
DYT-Medium:	Bacto-Trypton:	1.6% (w/v)
	Bacto Yeast Extract:	1.00% (w/v)
	NaCl:	0.5% (w/v)
	pH-Wert mit NaOH auf 7.0	
SOC-Medium:	Bacto-Trypton:	2.0% (w/v)
	Bacto Yeast Extract:	0.5% (w/v)
	NaCl:	0.05% (w/v)
	250 mM KCl-Lösung	1%
	pH-Wert mit NaOH auf 7.0	

Nach dem Autoklavieren wurden 20 ml einer sterilfiltrierten 1 M Glucose-Lösung zugeben.

Kurz vor Gebrauch wurden 5 ml einer sterilen 2 M MgCl₂-Lösung zugeben.

Puffer zur Reinigung und Aufbewahrung von Proteinen

pQEC-N Puffer zur Aufbewahrung von N Protein mit C-terminalem (His)₆ aus pQEC

„pQEC Lysis“: 300 mM NaCl, 50 mM NaP_i, pH 8.0 in H₂O_{dest}

„pQEC Wash“: wie pQEC Lysis, aber mit 20 mM Imidazol

„pQEC Elution I“: wie pQEC Lysis, aber mit 250 mM Imidazol

„pQEC Elution II“: wie pQEC Lysis, aber mit 1 M Imidazol

Es wurde ein 5fach pQEC-N Puffer angesetzt.

pET28a-N Puffer zur Aufbewahrung von N Protein mit oder ohne N-terminalem (His)₆ aus pET28a

„pET Lysis“: 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 8.0), 50 mM (NH₄)₂SO₄, 10% Glycerin in H₂O_{dest}

„pET Wash“: wie pET Lysis, aber mit 20 mM Imidazol

„pET Elution I“: wie pET Lysis, aber mit 250 mM Imidazol

„pET Elution II“: wie pET Lysis, aber mit 1 M Imidazol

Es wurde ein 3fach pET28a-N Puffer angesetzt.

Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

10x Laufpuffer = Tris: 250 mM

10x TGS Glycin: 1919 mM

SDS: 1% (w/v)

2x Probenpuffer: 100%iges Glycerin: 4 ml

β-Mercaptoethanol: 2 ml

10% SDS: 8 ml

1 M Tris/HCl pH 6.8: 2.5 ml

0,1 %iges Bromphenolblau: 1 ml

mit H₂O_{dest} auf 20 ml

Färbelösung: Coomassie brilliant blue R: 0.15% (w/v) (filtriert)

Ethanol: 45% (w/v)

Essigsäure: 10% (w/v)

H₂O_{dest} 44.85% (w/v)

Entfärbelösung: Ethanol: 45% (w/v)

Essigsäure: 10% (w/v)

H₂O_{dest} 45% (w/v)

Puffer, Lösungen und Proteinstandards für die BN-PAGE

4x Gelpuffer: Bistris/HCl pH 7.0: 200 mM

6-Aminocapronsäure: 2 M

2x Probenpuffer: Glycerin: 30% (w/v)

Bistris/HCl pH 7.0: 100 mM

Kathoden-Puffer: Tricine: 50 mM

Bistris/HCl pH 7.0: 15 mM

Coomassie Blue G-250:⁵ 0.02% (w/v)

⁵ Wichtig: Das Coomassie wird erst unmittelbar vor dem Gellauf dazugegeben!
Es wurde „SERVA Blue G (research grade)“ verwendet

Anoden-Puffer: Bistris/HCl pH 7.0: 50 mM

Standardproteine aus dem Sigma Molecular Weight Marker Kit MW-GF-200:

C 7150 Cytochrom c aus Pferdeherz (12.4 kDa), Rinderserumalbumin (BSA, 66 kDa), Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Hefe (150 kDa), β -Amylase aus Süsskartoffel (200 kDa), Apoferritin aus Pferdemicke (443 kDa)

Ausserdem: Sigma β -Laktoglobulin A aus Kuhmilch (35 kDa)

Standardproteine von ICN Biochemicals and Reagents:

Trypsinogen aus Rinder-Bauchspeicheldrüse (24 kDa) und Laktatdehydrogenase (LDH) aus Hühnerherz (140 kDa bzw. 280 kDa: Dimer)

Puffer und Lösungen für GEMSA's

Repel-Silane: Pharmacia Biosciences, Nr. 17-1332-01 (Dimethyldichlorosilane solution, 2% w/v, in octamethyl-cyclotetrasiloxane)

Lösung für natives 4% 0.5x TB

Polyacrylamid Gel: 2.5% Glycerin
 4% PAA 79:1
 in H_2O_{dest}
 1 Spatelspitze APS
 0.07% TEMED (unmittelbar vor dem Giessen)

5x PAA, 20%: 65.75% Lösung A
 12.5% Lösung B
 21.75% H_2O_{dest}
 Steril filtriert

Lösung A: 30% Acrylamid, Rotiphorese Gel A; Nr. 3037.1, 1l, Roth

Lösung B: 2% Bisacrylamid, Rotiphorese Gel B; Nr. 3039.2, 250ml, Roth

5x TB: 450 mM Tris-Base

(=10x Laufpuffer) 450 mM Borsäure
 in H_2O_{dest}

10x TBP: 900 mM Tris-Base

(= 10x Proteinpuffer) 900 mM Borsäure
 1.5 M KCl
 in H_2O_{dest}

10x Gelladepuffer: 5x TB

50% Glycerin
 0,05% Bromphenolblau
 0,05% Xylencyanol
 in H_2O_{dest}

Radioaktive Proben wurden zur Quantifizierung mit dem Scintillationszähler in je 10 ml Econofluor-2 (Du Pont) aufgenommen.

Puffer, Lösungen und Materialien für DIBAs und Western Blots

TBS(137):	Tris/HCl pH 7.6:	20 mM
	NaCl:	137 mM
TBS(274):	Tris/HCl pH 7.6:	20 mM
	NaCl:	274 mM
TBST(137):	Tris/HCl pH 7.6:	20 mM
	NaCl:	137 mM
TBST(274):	Tris/HCl pH 7.6:	20 mM
	NaCl:	274 mM
Blocking-Puffer:	2.5 g Magermilchpulver pro 100 ml TBS Puffer (d.h. 2.5% w/v)	
25x Transfer-Puffer =	Tris:	300 mM
25x TG:	Glycin:	2400 mM
Stripping-Puffer:	Tris/HCl pH 6.8	62.5 mM
	SDS	2%
	β-Mercaptoethanol	100 mM

Für Dot Blots wurde ein „Hybri-Dot Manifold“ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) mit 96 Löchern verwendet. Für DIBAs wurde eine Immobilon-P PVDF Transfermembran (Millipore) mit 0.45 µm Porengröße verwendet. Für die Immobilisierung von Protein – RNA Komplexen wurde eine BA85 Protran Nitrocellulose Nukleinsäure- und Protein-Transfermembran von Schleicher & Schuell mit ebenfalls 0.45 µm Porengröße benutzt. Ungebundene RNA wurde mit einer darunterliegenden Hybond-N+ Nukleinsäure-Transfermembran von Amersham zurückgehalten.

Immunoblots wurden mit einer „XCell SureLock Mini-Cell“ (Invitrogen) mit „XCell II Blot Module Kit“ geblottet.

2.2 Methoden

2.2.1 Rekombinante DNA-Techniken

Standardmethoden der Molekularbiologie wie Restriktionen, Ligationen, Dephosphorylierungen von Plasmid-DNA, Agarosegelelektrophorese, Transformation und Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens*, Phenol/Chloroformextraktion und Fällung von DNA wurden entsprechend den Anweisungen aus Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1987) oder den Herstellerangaben gemacht. Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mit Hilfe von QIAprep Spin Columns sowie QIAGEN-tips der Größe 500 und 2500 der Firma QIAGEN (Hilden) isoliert.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen (Mullis *et al.* 1987) wurden - soweit nicht anders angegeben - in einem Volumen von 100 µl folgendermassen angesetzt: 10-50 ng Template DNA, 10 mM Tris/HCl pH 8.85, 25 mM KCl, 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , je 30 pmol Oligonukleotide und 2.5 Units *Pwo* DNA Polymerase (Roche Molecular Biochemicals). Zum Teil wurde auch *Pfu* Polymerase (Promega) benutzt. Für unkritische Anwendungen (ohne anschliessende Klonierung), bei denen hohe Ausbeute an PCR Produkt wichtig war, wurde die „HotStar“ Taq-Polymerase (Qiagen) benutzt. Standardreaktionen wurden auf einer „HYBAID OmniGene“ PCR-Maschine (MWG-Biotech) mit folgendem Programm durchgeführt: 2 min 94°C, danach 30 Zyklen (45 sec 94°C, 45 sec 55°C, 2 min 72°C), 7 min 72°C. Je nach Beschaffenheit der Oligonukleotide und der Länge der zu amplifizierenden Sequenz wurde die Anlagerungstemperatur bzw. die Elongationszeit angepasst. Zur Berechnung der Schmelztemperaturen wurde der „Oligonucleotide Properties Calculator“ (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) verwendet. Standardmässig wurden die PCRs 4°C unterhalb der von diesem Programm berechneten „salzangepassten“ Temperatur gefahren.

2.2.3 Sequenzanalyse

DNA Sequenzierungen wurden durch die ADIS-Abteilung (Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung) am MPI für Züchtungsforschung durchgeführt. Als Sequenziergeräte dienten Abi Prism 377 und 3700 von Applied Biosystems (Weiterstadt). Die auf der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) basierende BigDye-Terminator™ Chemie des gleichen Herstellers wurde benutzt.

2.2.4 Analyse von DNA- und RNA-Proben mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer

Der Agilent 2100 Bioanalyzer ist momentan das einzige Gerät, welches sowohl Nukleinsäuren als auch Proteine und Zellen analysieren kann. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde es für die qualitative und quantitative Analyse von DNA und RNA benutzt. Im Vergleich zur Agarose-Gelelektrophorese bietet das Gerät folgende Vorteile: Es ist rascher, sensitiver, digitalisiert die Daten und kommt mit winzigen Probenmengen (1 µl) aus. Ausserdem ist das Gerät sehr platzsparend gebaut.



Abb. 2.1 Ein LabChip™ zur Analyse von DNA (Agilent Technologies).

Die Analyse erfolgt auf Chips, wobei es DNA-, RNA- und Proteinchips gibt. Abbildung 2.1 zeigt einen DNA LabChip™. Zu dessen Herstellung werden Mikrofabrikationstechniken ähnlich wie bei der Produktion von Halbleitern verwendet. Die Chips bestehen aus miteinander verbundenen Flüssigkeitsreservoirs und Minikanälen. Die Bewegung von Flüssigkeiten kann durch verschiedene Kräfte beeinflusst werden. Für Zell-Assays wird die Flüssigkeitsbewegung im Chip durch Druck kontrolliert. Für molekulare Assays (DNA, RNA und Proteine) wird die Bewegung der

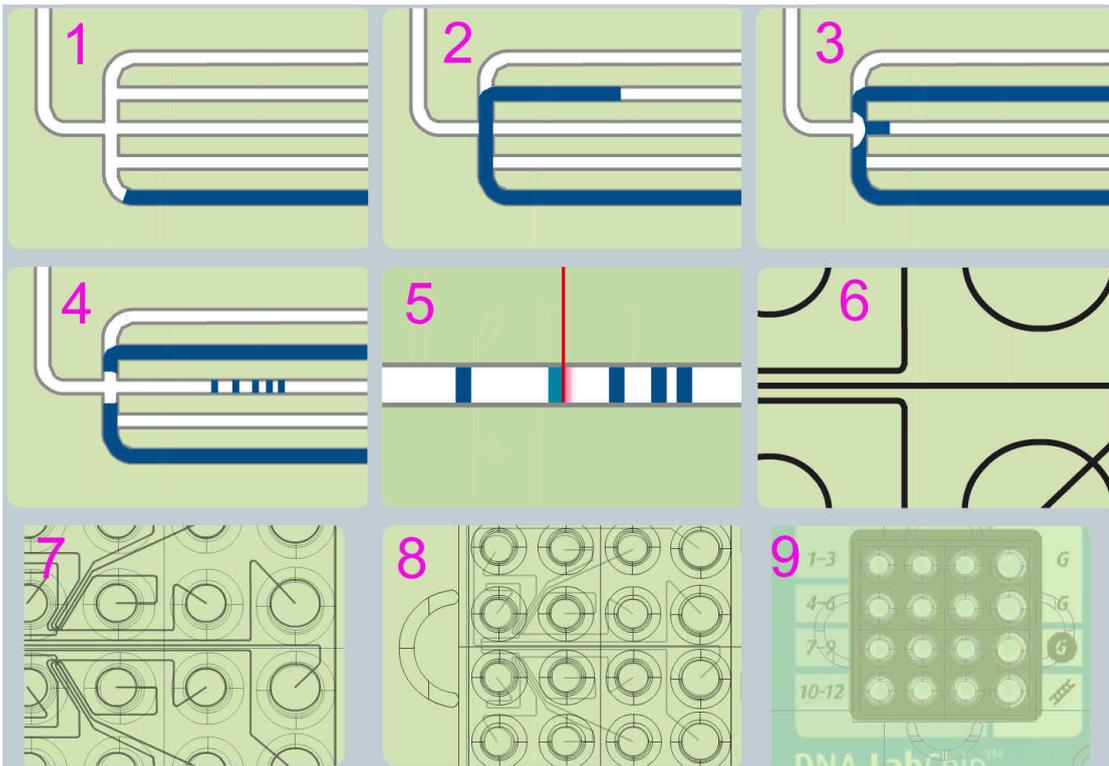


Abb. 2.2 Funktionsweise eines Agilent LabChips™. Erläuterungen siehe Text.

Flüssigkeit durch Elektroden gesteuert, welche elektrokinetische Kräfte entwickeln⁶. Diese Kräfte lenken den Flüssigkeitsstrom durch bestimmte Kanäle, ähnlich wie Flüssigkeiten bei der Kapillarelektrophorese durch einen Spannungsgradienten zwischen den Elektroden bewegt werden. Durch Regulierung der Spannung können Geschwindigkeit und Richtung der Flüssigkeitsbewegung kontrolliert werden. Durch die miniaturisierten Weglängen werden die Analysezeiten verkürzt und die starken elektrokinetischen Kräfte führen zu einer hohen analytischen Auflösung.

Abbildung 2.2 zeigt, wie die Analyse von DNA oder RNA auf einem Agilent LabChip™ funktioniert. Die Proben werden nacheinander von den Vorratsgefässen aus in die Mikrokanäle bewegt (1,2). Auf ihrem Weg durch den zentralen Separationskanal hindurch (3) werden sie der Grösse nach aufgetrennt (4) und passieren schliesslich den Ort, wo ein Laserstrahl die farbstoffmarkierte Nukleinsäure quantifiziert (5). Die Bilder (6) bis (9) veranschaulichen die Grössenverhältnisse. Ein Mikrokanal hat einen Durchmesser von 80 µm und ist 10 µm tief.

⁶ Elektrokinetisch angetriebener Transport ist die Summe aus elektrophoretischen und elektroosmotischen Kräften. Im Falle der Elektrophorese bewegen sich Ionen durch einen Spannungsgradienten in einem flüssigen Medium auf eine entgegengesetzt geladene Elektrode zu. Eine Auftrennung erfolgt durch unterschiedliche Migrationszeiten der Proben. Bei der Elektroosmose erzeugen Ladungen in den Wänden der Transportkanäle eine Schicht von Gegenionen in der angrenzenden Flüssigkeit, wodurch die ganze Flüssigkeitssäule und die gelösten Stoffe darin als Reaktion auf den Spannungsgradienten bewegt werden.

2.2.5 Überexpression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Eine Vorkultur transformierter *E. coli*-Zellen in YT-Medium wurde nach Zugabe von Antibiotikum über Nacht bei 37°C und 220 rpm herangezogen. Davon wurden am Morgen 10 ml in eine 300 ml Hauptkultur (in 2 Liter-Kolben) überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 28-37°C schüttelnd in YT-Medium unter selektiven Bedingungen wachsen gelassen. Die optimalen Expressionstemperaturen sind in Tabelle 3.1 angegeben. Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0.2 bis 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG). Vor der Induktion sowie nach der Expression wurden Proben für die SDS-PAGE genommen. Die Bakterien wurden nach 4-5 Stunden herunterzentrifugiert, wobei bei niedriger Temperatur länger inkubiert wurde. Die Pellets wurden oftmals eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverwendet. Das Bakterienpellet wurde in kaltem H₂O_{dest} gewaschen und in Puffer („pQEC“ oder „pET“ Puffer) aufgenommen. Zur Inhibierung von Proteasen wurde in Gegenwart von 1 mM PMSF (in Isopropanol) und 2 mM Benzamidin (in H₂O_{dest}) gearbeitet. Ausserdem wurde Lysozym hinzugegeben. Zur Scherung der genomischen DNA wurde die *E. coli*-Suspension mehrmals durch eine Spritze mit Kanüle gepresst. Die auf einem Gemisch aus Wasser und Eis gekühlten Zellen wurden in einem Corex Röhrchen mittels Sonifizierung aufgeschlossen.

2.2.6 Native Reinigung von (His)₆-Fusionsproteinen und Abspaltung des Peptides

Nach dem Abzentrifugieren von Zellresten wurde der Überstand auf eine äquilibrierte Ni-NTA Säule gegeben. Die Puffer sind in Kapitel 2.1.6 angegeben. Nach dem Waschen wurde in zwei Schritten mit 250 mM und 1 M Imidazol eluiert, wobei beim ersten Schritt das meiste Protein eluiert wurde. Die Qualität der gereinigten Proteine wurde auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel überprüft.

Zur Entfernung des Imidazols wurde über Nacht bei 4°C gegen 3 bis 5 Liter des entsprechenden Puffers dialysiert. Durch Rühren wurde der Austausch des Puffers beschleunigt.

Das Wegdialysieren des Imidazols ist sehr wichtig für die folgende Inkubation mit Thrombin. Laut Herstellerangaben werden mindestens fünfmal mehr Thrombin benötigt, falls die Reaktion direkt im imidazolhaltigen Elutionspuffer durchgeführt wird. Bei einer Inkubationstemperatur von 4°C wird doppelt soviel Enzym benötigt. In Gegenwart von 0.5 bis 1 M NaCl wird ebenfalls die doppelte Menge Thrombin verbraucht. Daher wurde normalerweise bei RT inkubiert. Das biotinylierte menschliche Thrombin von Novagen erkennt die Sequenz LeuValProArg↓GlySer, welche sich zwischen der N-terminalen (His)₆-Fusion von pET28a-N und dem Methionin des TSWV N Proteins befindet. Die Schnittstelle ist mit einem Pfeil angegeben. Es ist wichtig, das Enzym zu Beginn der Reaktion durch vorsichtige Bewegung gleichmässig zu verteilen. Während der Inkubation darf aber die Lösung auf keinen Fall geschüttelt oder rotiert werden, weil ansonsten das N Protein ausfällt. Die Ergebnisse eines Versuches mit TSWV N Protein sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1 Die optimalen Inkubationszeiten für die Entfernung der N-terminalen Polyhistidin-Fusion von TSWV N mit Thrombin sind für verschiedene Bedingungen angegeben. Das Experiment wurde bei RT mit pET28a-N wt, N F242A und N F246A durchgeführt, wobei die Mutanten gleich effizient wie das Wildtyp Protein geschnitten wurden. Die Angaben beziehen sich auf den „pET“ Puffer. Die Quantifizierung erfolgte über SDS-PAGE. Angegeben sind die Prozent geschnittenes Protein.

Thrombin: a) 0.004 units / μg Protein b) 0.0005 units / μg Protein

Inkubationszeit	Detergens			
	Keines	10 mM SB 12	0.01% SDS	0.5% Lauroylsarcosine ⁷
2h	a) 100%	a) 100%	a) >95%	a) 70%
	b) 90%	b) 50%	b) 90-95%	b) 5%
4h	a) 100%	a) 100%	a) 99%	a) 95%
	b) >95%	b) 70%	b) >95%	b) 35%
8h	a) 100%	a) 100%	a) 100%	a) 99%
	b) 99-100%	b) 90-95%	b) 99%	b) 45%
22h	a) 100%	a) 100%	a) 100%	a) 100%
	b) 100%	b) 100%	b) 100%	b) 60-70%

Das biotinylierte Thrombin wurde durch Streptavidin Agarose gebunden. Nach einer halben Stunde Inkubation bei RT und langsamem Rotieren wurde die Streptavidin Agarose durch Spin-Filtration abgetrennt. Das N-terminale (His)₆ Fragment wurde durch Dialyse entfernt. Damit war N Protein (bzw. Mutante) ohne (His)₆-Fusion zur biochemischen Charakterisierung vorhanden.

2.2.7 Dialyse und Umpuffern von Proteinen

Die Dialyseschläuche wurden 10 Minuten in einem grossen Volumen mit 2% (w/v) NaHCO₃ und 1 mM EDTA (pH 8) gekocht. Danach wurden die Schläuche gründlich mit H₂O_{dest} gewaschen und weitere 10 Minuten in 1 mM EDTA (pH 8) gekocht. Anschliessend wurden sie in eine frische 1 mM EDTA Lösung mit 0.02% NaN₃ überführt und bei 4°C aufbewahrt.

Kleinere Volumina wurden mit MF-Millipore Membranfiltern (0.025 μm Porengrösse) oder mit „Slide-A-Lyzer“ Mini-Dialysiereinheiten von Pierce (10 kDa MWCO) umpuffert.

Eine andere Möglichkeit zum Umpuffern und vor allem auch zum Aufkonzentrieren von Proteinlösungen besteht im Einsatz von Zentrifugenfiltern. Von Millipore wurden die Ultrafree-Filter verwendet, die es in drei verschiedenen Grössen gibt (bis 0.5 ml, bis 4 ml bzw. bis 15 ml Volumen). Die Ultrafree-Filter mit 50 kDa MWCO wurden zur Trennung von N Protein Monomer (im Durchfluss) und Multimer (im Überstand) verwendet.

2.2.8 Messung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden gemäss der Methode von Bradford (1976) mit dem „Protein Assay Dye Reagent“ (Bio-Rad) bestimmt. Dieser basiert auf der Farbveränderung von „Coomassie Brilliant Blue G-250“ in Gegenwart von Protein. Der Farbstoff bindet vorwiegend an basische (v.a. Arginin) und aromatische Aminosäuren. Rinderserumalbumin (BSA) diente als Standard.

⁷ Natrium-Laurylsarcosin ist ein anionisches Detergens. Jana Hackbusch zeigte, dass 0.5% Na-Laurylsarcosin in einem Polyacrylamidgel ausreichen, um TSWV N mit C-terminaler (His)₆-Fusion vollständig in seine monomere Form überzuführen.

2.2.9 Suche nach geeigneten Puffern zur Aufbewahrung des TSWV N Proteins

Für den Löslichkeitstest des TSWV N Proteins wurden zusätzlich zu den 30 von Lindwall *et al.* (2000) publizierten Puffern 18 weitere hergestellt. 50 ml eines jeden Puffers wurden in Anwesenheit von 0.1% Natriumazid (NaN_3) aufbewahrt, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden. Im Gegensatz zum Ansatz von Lindwall und Kollegen wurde die Löslichkeit von gereinigtem Protein untersucht. Die Autoren bewahrten lösliche Rohaufschlüsse von sechs verschiedenen Proteinexpressionen in den Puffern auf und analysierten die Überstände mittels SDS-PAGE.

Sowohl pET28a-N wt (mit N-terminaler, entfernbare Polyhistidin-Fusion) als auch pQEC-N wt (mit C-terminaler Polyhistidin-Fusion) wurden getestet. Die Proteine mussten aufkonzentriert werden, um eine Endkonzentration von 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in je 200 μl Puffer zu erreichen. Zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 5, 10 und 17 Tagen) wurde unlösliches Protein herunterzentrifugiert und die verbliebenen Überstände im Bradford-Test gemessen (vgl. Kap. 2.2.8). Für einen zweiten Durchlauf wurden die geeigneten Puffer modifiziert und erneut getestet (nach 6, 12, 20 und 38 Tagen). Die besten gefundenen Puffer sind in Kapitel 2.1.6 genannt.

2.2.10 SDS-PAGE und Proteinfärbung

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) auf 12% Tris-Glycine Gele (Novex) bei 130 V und 30 mA. Die Proben wurden für 10 min mit Probenpuffer in einem Wasserbad aufgekocht. Handelte es sich bei den Proben um ganze Zellen, so folgte nach dem Aufkochen noch ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt, um Zellwandbestandteile zu pelletieren. Die Proben wurden dann mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit dem „XCell SureLock™ Mini-Cell System“ (Invitrogen) bei einer Spannung von 120 V und 30 mA Stromstärke durchgeführt. Der Probenpuffer enthielt den Farbstoff Bromphenolblau, an Hand dessen Wanderung man den Fortgang der Elektrophorese abschätzen konnte.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel aus dem Träger entnommen und die Proteine durch eine Färbung mit „Coomassie Brilliant Blue“ (Sigma) sichtbar gemacht (vgl. Kap. 2.1.6). Das Gel wurde für mindestens 2 h unter ständigem Rühren in der Färbelösung inkubiert. Anschliessend wurde es zweimal für mindestens 30 min in die Entfärbelösung gelegt. Das Gel wurde dann in Wasser geschüttelt, das mehrere Male ausgewechselt wurde, bis der blaue Hintergrund weggewaschen war.

2.2.11 Blue Native PAGE

Mit Hilfe der Blue Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE) können Proteinkomplexe nativ ihrer Grösse nach aufgetrennt werden (Schägger *et al.* 1991). Die klassische Anwendung der Methode besteht darin, native Membranprotein-Komplexe in enzymatisch aktiver Form aus dem Gel zu reinigen (Schägger 1994). Während die negative Ladung bei der Gel-Elektrophorese nach

Laemmli (1970) durch das denaturierende Detergens SDS eingebracht wird, stellt bei der BN-PAGE der nicht denaturierende Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue“ die negative Ladung bereit. Er bindet relativ unspezifisch die Oberflächen von Proteinen und sorgt dafür, dass sogar basische Proteine wie das TSWV N Protein bei der Elektrophorese zur Anode wandern. Ausserdem reduziert die eingebrachte Ladung die Aggregation von Proteinen im Gel, die vor allem bei Membranproteinen ein grosses Problem darstellt. Zu demselben Zweck befindet sich im Gel das sehr schonende Detergens 6-Aminocaprinsäure. Da ganze Proteinkomplexe, die sich unter Umständen in ihrem Molekulargewicht erheblich voneinander unterscheiden, im Gel voneinander getrennt werden sollen, verwendet man bei der BN-PAGE Gradienten-Gele mit einem recht weiten Konzentrationsbereich. In dieser Arbeit wurden 5-18%ige Gradientengele verwendet. Für diese wurden eine 5%ige Acrylamid-Lösung und eine 18%ige Acrylamidlösung wie in Tabelle 2.2 angegeben zusammenpipettiert.

Tabelle 2.2 Zusammensetzung eines 5-18%-Gradientengels für die Blue Native Elektrophorese (BN-PAGE).

	Sammelgel 4% T	Gradienten-Trenngel 5% T 18% T	
AB (40% T, 3% C)	159 µl	572 µl	1743 µl
4x Gelpuffer (4x)	385 µl	1154 µl	962 µl
87% Glycerin	-	-	718 µl
APS (10%)	12.8 µl	25.6 µl	12.8 µl
TEMED	1.3 µl	2.6 µl	1.3 µl
H ₂ O _{dest}	982 µl	2846 µl	413 µl
Gesamtvolumen	1.54 ml	4.60 ml	3.85 ml

A: Acrylamid

B: Bisacrylamid

%T: Totale Konzentration beider Monomere

%C: Prozentualer Anteil von „Crosslinker“ zur Gesamtmenge Monomer

Diese Lösungen wurden in die beiden Kammern eines Gradienten-Giessers gefüllt, der bei 4°C auf einem Magnetrührer stand. In der vorderen Kammer mit der 18%igen Lösung befand sich ein magnetischer Rührfisch. Dann wurde der Magnetrührer angestellt und die Verbindungsröhre zwischen den Kammern geöffnet. Die Gel-Lösung floss in einen abgedichteten Gelständer, der unterhalb des Gradienten-Giessers plaziert war. War der Gelständer zu etwa 9/10 voll, wurde der Schlauch des Gradienten-Giessers abgeklemmt und das Gel im Ständer mit Hilfe einer Pipette mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach einer ca. einstündigen Polymerisation des Gels, die bei RT stattfand, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel in den Ständer eingefüllt. Dessen Zusammensetzung ist der Tabelle 2.2 zu entnehmen. In das flüssige Gel wurde dann ein passender Kamm eingesetzt. Die Positionen der Taschen wurden auf der äusseren Glasplatte mit einem wasserfesten Stift markiert, da wegen des dunkelblauen Kathodenpuffers beim Laden weder die Probe noch die Nadel der Hamilton-Spritze sichtbar sind. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit 1x Gelpuffer überschichtet. In Frischhaltefolie verpackt konnte das Gel bei 4°C längere Zeit aufbewahrt werden.

Es wurden – sofern genug Protein vorhanden war - ca. 50-100 µg Protein pro Tasche geladen. Für die Elektrophorese wurde das Gradienten-Gel bei 4°C in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt

und der Raum an der Kathode mit Kathoden-Puffer so weit aufgefüllt, dass die Geltaschen bedeckt waren. Der Raum an der Anode wurde bis zur Hälfte mit Anodenpuffer befüllt. Während zur Auftrennung von Membranproteinen der Coomassie-Farbstoff schon im Probenpuffer vorhanden sein sollte, muss man ihn bei der Auftrennung von wasserlöslichen Proteinen nur in den Kathodenpuffer geben (Schägger *et al.* 1994). Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt. Bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel wurde eine Spannung von 100 V angelegt, die dann auf 300 V (= maximale Spannung) erhöht wurde. Ein Gellauf dauerte ca. 3 Stunden.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel wie unter Abschnitt 2.2.10 beschrieben mit „Coomassie Brilliant Blue R“ gefärbt.

2.2.12 CD-Spektroskopie

Mittels Circular Dichroismus Spektroskopie kann die Sekundärstruktur eines Proteins in Lösung bestimmt werden. Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung eines rechts und eines links drehenden zirkular polarisierten Lichtstrahles beschrieben werden. Beim Durchdringen einer optisch aktiven Substanz werden diese Lichtstrahlen um verschiedene Winkel gedreht und unterschiedlich absorbiert. Das austretende Licht kann als elliptisch polarisiert beschrieben werden. Die molare Elliptizität $[\Theta]_{\lambda}$ ist ein Maß für die unterschiedliche Schwächung des rechts und links zirkular polarisierten Lichtes beim Durchtritt durch eine chirale Verbindung. Dabei bringt jeder Sekundärstrukturanteil einen eigenen Anteil in das CD-Spektrum eines Proteins ein. Durch die Verwendung verschiedener Algorithmen können aus der molaren Elliptizität die Anteile an α -Helix, β -Faltblatt, Schleifen und ungeordneter Struktur eines Proteins abgeschätzt werden.

Die CD-Spektren wurden in Quarz-Küvetten bei 20°C aufgenommen. Die Temperatur wurde mit einem Thermostaten konstant gehalten. Das Spectropolarimeter wurde eine halbe Stunde vor Beginn der Messungen mit flüssigem Stickstoff abgekühlt. Es wurde eine Küvette mit Schichtdicke 1 mm benutzt. Alle Proteine wurden zur Messung in denjenigen Puffern gelassen, in denen sie normalerweise biochemisch charakterisiert wurden: pQEC-N Puffer (300 mM NaCl, 50 mM NaP_i, pH 8) für Proteine mit C-terminaler (His)₆-Fusion und 1x TBP Puffer (90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 150 mM KCl) für Proteine mit oder ohne N-terminale (His)₆-Fusion.

Zuerst wurde ein Spektrum des Puffers aufgenommen, welches dann von den Proteinspektren subtrahiert wurde. Es wurde zwischen 198 nm und 250 nm gemessen. Kürzere Wellenlängen konnten wegen des Salzgehaltes der Probenpuffer nicht gemessen werden. Ideal wäre 5 mM Phosphat-Puffer, mit dem man bis 180 nm kommt, doch unter diesen Bedingungen fällt das TSWV N Protein aus. Für eine Messung benötigt man 0.2 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 0.1 bis 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Konzentration muss genau bekannt sein, da sie in die Berechnungen einfließt.

Jeweils 10 Scans wurden gemittelt, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Die korrigierten Spektren wurden geglättet, die spezifischen Elliptizitäten berechnet und mit Hilfe der Programme

Contin (Provencher *et al.* 1981) und k2d (Andrade *et al.* 1993) analysiert. Contin analysiert Daten zwischen 190 und 240 nm. Es vergleicht das erhaltene Spektrum mit einem Basissatz Spektren von Proteinen, deren Struktur bekannt ist. Das Programm k2d benötigt zur Auswertung lediglich Daten von 200 bis 240 nm. Es wertet die CD-Spektren mit einem neuronalen Netzwerk aus.

2.2.13 DIBA (Dot Immuno Binding Assay)

Das Dot Blot-Verfahren dient zur raschen Quantifizierung relativ grosser Probenmengen (bis zu 96 pro Blot). Es wurde zum Nachweis des TSWV N Proteins in Fraktionen aus Gelfiltrationsexperimenten eingesetzt (vgl. Kapitel 3.5). Gegen das N Protein sind spezifische Antikörper vorhanden.

Zuerst wurde ein zurechtgeschnittenes Stück Immobilon-P PVDF Membran von Millipore (Porengrösse 0.45µm) durch kurzes Eintauchen in Methanol aktiviert. Das Methanol macht die ansonsten hydrophobe Membran benetzbar. Anschliessend wurde die Membran 5 Minuten in H₂O_{dest} und 5 Minuten in pET Puffer inkubiert. Die zu untersuchenden Proben (je 100-400 µl) wurden mit Hilfe einer Dot Blot Apparatur unter Anlegung eines Vakuums auf die Membran gesaugt. Unter der Membran befanden sich zwei Whatman Filterpapiere, welche für die Planlage der Membran sorgten.

Im nächsten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen für Proteine auf der Trägermembran durch eine 1½stündige Inkubation mit Blocking-Puffer abgesättigt. Anschliessend wurde 1 Stunde in Anwesenheit des Primär-Antikörpers (ungereinigtes anti-TSWV-IgG aus Kaninchen, DSMZ TSWV AS-0580) unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Antikörper wurde 1:1'000 in Blockingpuffer verdünnt. Zum Abwaschen nicht gebundener Antikörper wurde die Membran einmal für 15 min und dann viermal für 5 min in einen TBS (137)-Puffer⁸ gelegt und geschüttelt.

Der Sekundär-Antikörper (kovalent an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Kaninchen Antikörper NIF 824 aus Ziege von Amersham) wurde 1:5'000 in Blockingpuffer verdünnt und für 40 min zur Membran gegeben. Zum Abwaschen nicht gebundener Sekundär-Antikörper wurde zweimal für 5 min mit TBS(137)-Puffer und zweimal 5 min mit TBS(274)-Puffer unter Schütteln inkubiert.

Die Membran wurde dann in eine aufgeschnittene Plastiktüte gelegt und mit einem Filterpapier trocken getupft. Die Lösungen ECL1 und ECL2 aus dem ECL-Detektions-Kit der Firma Amersham wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmässig auf der Membran verteilt. Die Detektion des Sekundär-Antikörpers und damit des TSWV N Proteins erfolgte über die Reaktion der Meerrettichperoxidase mit H₂O₂. Die ECL1-Lösung enthält H₂O₂, und die ECL2-Lösung stellt die Verbindung Luminol bereit. Die bei der Mischung der Lösungen entstehenden Sauerstoffradikale reagieren mit Luminol, das detektierbares blaues Licht abgibt.

⁸ Beachte: Bei den DIBAs wurde generell ohne das Detergens Tween-20 gearbeitet.

Nach einer Minute wurde die Membran aus der Lösung genommen und überschüssige Flüssigkeit abgetropft. Dann wurde die Membran wieder in den Plastikbeutel gelegt und dieser zwischen zwei Glasplatten im Lumi-Imager (eine hochempfindliche CCD-Kamera von Boehringer Mannheim, jetzt Roche) gelegt. Die Daten wurden mit der LumiAnalyst 3.0 Software erfasst und mit ImageQuant™ 5.1 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

2.2.14 Immunoblot

Gellauf und Aktivierung der PVDF-Membran (Immobilon™-P, Millipore) wurden bereits beschrieben (Kap. 2.2.10 und 2.2.13). Zum Proteintransfer wurden 4 Polster in 1x TG eingeweicht und alle Luftblasen herausgedrückt. Blot-Aufbau:

(Kathode) - 2 Blotting-Polster - Filterpapier - 1. Gel - PVDF-Membran - Filterpapier - (Blotting-Polster - Filterpapier - 2. Gel - PVDF-Membran - Filterpapier -) 2 Blotting-Polster - (Anode)

Das Blotmodul wurde (innen) mit ca. 100 ml 1xTG gefüllt und die Kammer (d.h. aussen) zur Kühlung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgefüllt. Es wurde bei einer konstanten Spannung von 30 V mit dem „XCell II™ Blot Module“ (Invitrogen) geblottet. Die Stromstärke begann bei ca. 280 mA, fiel schnell auf ca. 150 mA ab und stieg dann wieder an. Mit dem Blotten wurde erst aufgehört, als die Stromstärke wieder (nahezu) den Anfangswert erreicht hatte. Das geblottete Gel wurde zur Kontrolle des Transfers mit Coomassie gefärbt. Auf die Immunodetektion wurde bereits in Kap. 2.2.13 eingegangen.

2.2.15 Gelfiltration

Das Säulenmaterial wurde in soviel $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt und gerührt, bis eine zähflüssige Masse entstand. In eine Sephacryl S200 HR Säule der Firma Pharmacia wurde das untere Ventil eingesetzt und die Gelmasse nach und nach in die Säule gegossen. Hatte sich das Säulenmaterial bis oben hin gesetzt, wurde mit Hilfe der Pumpe ein wenig Druck ausgeübt. Packte sich daraufhin das Gel weiter, wurde weiteres Material zugegeben. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis das Gel bis zum oberen Bereich der Säule stand und einem bestimmten Druck standhielt.

Mit Hilfe von Blue Dextran, einem Dextran der ungefähren Grösse von 2000 kDa, wurde das Ausschlussvolumen V_0 bestimmt. Diese Grösse entspricht dem Volumen ausserhalb der porösen Kügelchen. Cytochrom c mit einer Grösse von 12.4 kDa diente als Substanz zur Feststellung des Gesamtvolumen V_t der Säule. Für die Proteine Aldolase (158 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Chymotrypsinogen (25 kDa) wurden an Hand der Absorptionskurve des Schreibers die Elutionsvolumina, welche zwischen V_0 und V_t lagen, ermittelt. Aus diesen Werten wurde eine Eichgerade erstellt.

Die Proben hatten ein Volumen von maximal 0.67ml, damit möglichst scharfe Peaks entstanden. Es wurden 0.33 bis 4.16 mg Protein geladen. Die Pumpe war auf eine Geschwindigkeit von 0.2 ml/min eingestellt. Diese relativ langsame Durchflusszeit wirkte sich ebenfalls positiv auf die

Auflösung aus. Die Durchflussrate betrug 5 min / Fraktion. Die Fraktionen zu 1 ml wurden gesammelt und zum Teil in DIBAs quantifiziert (vgl. Kap. 2.2.13).

2.2.16 RNA *in vitro* Transkription

Als Templates für *in vitro* Transkriptionen wurden linearisierte Plasmide, PCR-Produkte und Oligo-Dimere verwendet. Plasmide und PCR-Produkte wurden Phenol/Chloroform extrahiert, um RNase-Freiheit zu erreichen. Danach wurden sie mit einem Agilent 2100 Bioanalyser quantifiziert. Pro *in vitro* Transkription wurden ca. 200 ng PCR-Produkt oder 2 µg Plasmid DNA eingesetzt. Entscheidend ist die Molekülmenge, welche zur Initiation der Transkription zur Verfügung steht. Optimale Bedingungen werden in der Literatur genannt (Ambion 1997).

Linearisierte Plasmide mit überhängenden 3' Enden (produziert z.B. durch *Kpn* I oder *Pst* I) können zur Synthese grosser Mengen langer RNA-Moleküle führen, welche aberrant an den Enden der Template DNA initiiert wurden (Schenborn *et al.* 1985, Sambrook *et al.* 1989, S. 10.29). Falls ein Restriktionsenzym benutzt werden muss, welches überhängende 3' Enden erzeugt, so sollte die geschnittene DNA mit dem Klenow Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I behandelt werden. Das Klenow Fragment besitzt die Fähigkeit zur Polymerisation und hat 3' → 5' Exonuklease Aktivität. Die 5' → 3' Exonuklease Aktivität hingegen ist nicht vorhanden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ausschliesslich die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 benutzt. Sie erkennt mit hoher Spezifität die folgende Promoter-Sequenz:

+1
TAATACGACTCACTATACGGGAGA

Die Base +1 ist die erste, welche während der Transkription in die RNA eingebaut wird. Die unterstrichene Sequenz ist die minimale Konsensus-Promotersequenz.

Ein typischer Transkriptionsansatz sah folgendermassen aus:

RNase-free ddH ₂ O (Ambion)	5.6 µl
10x Transcription Buffer (Ambion)	2.2 µl
NTP-Mix Ambion/ ³³ P ⁹	6.1 µl
Template DNA (PCR-Produkt, mit Bioanalyser quantifiziert), 200 ng	2.0 µl
T7 MEGAshortscript Enzyme Mix	2.2 µl
[α- ³³ P]UTP (Amersham, 10 µCi/µl), 20 µCi	2.0 µl
Gesamtvolumen	20.1 µl

Es wurde bei RT pipettiert. Das Gemisch wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden 1.9 µl UTP (75 mM) hinzugegeben. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurden 10 units DNase I (Roche Molecular Biochemicals, RNase-frei, 10 units/µl) zugeben. Nach 15minütiger Inkubation bei 37°C wurden die T7 RNA-Polymerase und DNase I für 15 Minuten bei 65°C deaktiviert.

⁹ NTP-Mix Ambion/³³P: 50 µl ATP (75 mM, Ambion)+ 50 µl CTP (75 mM) +50 µl GTP (75 mM) +2.5 µl UTP (75 mM) mischen, d.h. je 24.59 mM bzw. 1.23 mM (UTP).

Die *in vitro* Transkripte wurden durch Gelfiltrations-Chromatographie von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Falls ein grosses Elutionsvolumen (400 µl) erwünscht war, wurden die Nick-Columns (Sephadex G-50, Amersham Biosciences) verwendet. Ansonsten wurden zur Reinigung die mini Quick Spin RNA-Säulen von Roche Molecular Biochemicals verwendet, die mit einem RNase-freien Sephadex G-50-Material gefüllt sind. Dabei wurden stets die Herstellerangaben befolgt. Es wurde mit 1x TBP Puffer gearbeitet.

Die eluierte RNA wurde 15 min bei 65°C inkubiert. Danach wurde die Energieversorgung abgeschaltet und die RNA im Heizblock gelassen, bis RT erreicht war. Dadurch wurden die Transkripte langsam auf RT abgekühlt, und die thermodynamisch günstigsten Sekundärstrukturen bildeten sich aus. Die Transkripte wurden bei -70°C aufbewahrt.

Um doppelsträngige RNA-Moleküle zu erhalten, wurden KS und SK RNA-Transkripte (komplementäre Transkripte aus pBluescript II KS und pBluescript II SK) im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und langsam auf RT abgekühlt (Soellick *et al.* 2000). Es wurde ohne RNase gearbeitet. Die KS und SK Transkripte erhielt man durch *in vitro* Transkription auf mit *Kpn* I bzw. *Sac* I verdauten pBluescript-Plasmiden, welche einen T7 Promoter enthalten.

2.2.17 GEMSA (Gel Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Die nativen 4% Polyacrylamid-Gele wurden selber gegossen. Dazu wurden Glasplatten der Grösse 10 x 10 cm mit Glas-Seitenspacern (Geldicke = 1 mm) verwendet. Die schwarze Gummidichtung stammte aus dem Modellbaubedarf. Beide Glasplatten wurden mit fuselfreien Kimwipes (Kimberly-Clark, Mainz) und 70% Ethanol (vergällt) gereinigt und die Innenseite der Öhrchenplatte silanisiert (Repel-Silane). Ein 10er Kamm von Novex-Fertiggelen wurde verwendet. Pro Gel wurden 10ml PAA-Lösung zubereitet: 0,5xTB, 2,5% Glycerin, 4% PAA 79:1. Die PAA-Lösung und eine Spatelspitze APS wurden in eine kleine Saugflasche mit Gummipropfen und Rührfisch gegeben und für 5 Minuten unter Vakuum entgast. 7µl TEMED wurden pro Gel zugegeben und die Lösung mit einer 10ml-Pipette zwischen die Glasplatten gefüllt. Nachdem der Kamm eingesetzt war, liess man das Gel für mindestens eine Stunde polymerisieren. Anschliessend wurden Gummidichtung und Kamm entfernt, der untere Gelrand mit Kimwipes trocken gewischt und das Gel unten mit 1% Agarose in 0,5xTB abgedichtet. Die Slots wurden mit 0.5x TB gefüllt, damit sie nicht austrockneten. Das N Protein wurde für GEMSAs stets gegen 1x TBP dialysiert.

RNA und Protein wurden in 10 µl 1x TBP während 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Jedes Sample wurde mit 1 µl Gelladepuffer versetzt und geladen. Normalerweise wurden die GEMSAs bei RT durchgeführt. Die Gelkammer wurde mit 0,5x TB gefüllt und die Spannung auf 110 Volt eingestellt. Ein Gellauf dauerte etwa 1¼ bis 1½ Stunden.

Der Geltrockner wurde vorgeheizt, die Öhrchenplatte abgenommen, das Gel mit einem feuchten 3MM-Papier abgezogen und mit Saran-Folie abgedeckt. Zwei weitere 3MM-Papiere wurden unterlegt und das ganze während einer knappen Stunde trocknen lassen (80°C in Vakuum).

Zuerst wurde der Gelrockner abgeschaltet, währenddem die Vakuumpumpe noch lief. Erst, nachdem der Gelrockner auf RT abgekühlt war, wurde die Pumpe abgestellt.

Als Proteinkontrollen für die GEMSAs dienten (His)₆-GFP (Reichel *et al.* 1996), (His)₁₀-ARF1 (Uhrig 1996) und BSA.

2.2.18 Filterbindungsversuche

Mit [$\alpha^{33}\text{P}$]UTP markierte RNA wurde in 10 μl 1x TBP-Puffer mit steigenden Mengen gereinigten TSWV N Proteins 15 Minuten bei RT inkubiert. Kurz vor dem Laden wurde das Volumen mit je 90 μl 1x TBP auf insgesamt 100 μl ergänzt, damit gleichmässig geladen werden konnte. Die Protein – RNA Komplexe wurden unter Vakuum auf eine BA85 Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell) gesogen (Osborne *et al.* 2000). Eine darunterliegende Hybond-N+ Nukleinsäure-Transfermembran (Amersham Biosciences) hielt ungebundene RNA zurück. Beide Membranen waren mit 1x TBP Puffer angefeuchtet worden. Die Filter wurden mit je 400 μl 1x TBP gewaschen und getrocknet. Bei den Versuchen zur Salz- und RNase-Stabilität hatte der Waschpuffer jeweils genau die gleiche Zusammensetzung wie der Inkubationspuffer. Mit Hilfe eines Storage Phosphor Screens (Low Energy, Molecular Dynamics) und eines Storm 860 beta imagers (Amersham Lifesciences) wurden die Spots detektiert. Die absoluten RNA-Mengen in den *in vitro* Transkripten waren mit dem Agilent 2100 Bioanalyser und die Radioaktivitäten mit einem LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman Instruments) bestimmt worden. Daraus wurde für jedes Transkript ein Verhältnis von Counts zu RNA-Menge (in pmol) berechnet. Die radioaktiven Punkte wurden mit dem Programm ImageQuant™ 5.1 for Windows NT (Molecular Dynamics, 1999) quantifiziert und die Daten in Microsoft Excel 2000 exportiert.

Die in Abbildung 3.14 angegebene relative Anzahl gebundener RNA-Moleküle (y) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$y = (RS - RS_0) / (\text{CPM}/(\text{pmol}/\mu\text{l}))$$

Hierbei gibt „RS“ das radioaktive Signal des Punktes an und „RS₀“ das radioaktive Signal des RNA-Punktes ohne Proteinzugabe (d.h. Hintergrund: RNA + Puffer auf dem Filter). Der Divisor (CPM/(pmol/ μl)) ist ein Korrekturfaktor, der für jedes RNA-Substrat verschieden ist und von der Effizienz der *in vitro* Transkription abhängt. Dabei gibt „CPM“ die „counts per minute“ an, die mit dem Scintillationszähler gemessen wurden und (pmol/ μl) die RNA-Konzentration in Anzahl Molekülen pro Volumen, wie sie mit dem Agilent Bioanalyser bestimmt wurde (vgl. Kap. 2.2.4). Der y-Wert ist also ein Mass dafür, wieviele Moleküle RNA durch eine gegebene Molekülzahl N Protein (Abb. 3.14: x-Achse, in pmol) auf dem Filter zurückgehalten werden.

2.2.19 Computer-Software und Datenbanken

Zur Erstellung von Plasmidkarten wurde das Programm „Clone Manager 5 for Windows 95“, Version 5.1 benutzt. Es ist Teil von „Sci Ed Central for Windows 95“ (Scientific & Educational

Software, Durham, NC). Die Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen erfolgte auch mit den Programmen des Wisconsin Package Version 10.0 der *Genetics Computer Group* (GCG; Madison, Wisconsin). Für Homologiesuchen wurde BLAST am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD) verwendet. Zur Berechnung von RNA-Sekundärstrukturen wurde das Programm MFOLD (Walter *et al.* 1994) am Institut Pasteur (Paris) benutzt („advanced MFOLD form“ mit der Möglichkeit zur Temperaturwahl). Ausserdem wurden Photoshop 6.0 (Adobe) zur Grafikbearbeitung, Endnote 4.0 (ISI Research Soft, Berkeley, CA) für die Verwaltung der Literaturzitate und Microsoft Office 2000 verwendet. Literaturrecherchen wurden mit PubMed (NCBI) und dem „ISI Web of Science“ (Thomson Scientific) durchgeführt.

Kapitel 3 - Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung von N Protein und Mutanten

Für biochemische Analysen der TSWV N Protein – Protein Interaktionen sowie für Protein – RNA Bindungsversuche mussten Wildtyp N Protein und Mutanten in möglichst reiner Form vorliegen. Um den Hintergrund bakterieller Proteine niedrig zu halten, wurde eine starke Expression angestrebt. Diese sollte allerdings nicht zur Bildung von unlöslichen Einschlüssen („inclusion bodies“) führen, da nativ gereinigtes Protein für biochemische Versuche eingesetzt werden sollte. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden verschiedene Expressionszellen und –bedingungen getestet. Die heterolog in *Escherichia coli* exprimierte Proteine sind schematisch in Abb. 3.1 gezeigt. Protein – Protein Interaktionsdomänen sind gemäss den Erkenntnissen von Uhrig *et al.* (1999) grau (N-Terminus) bzw. grün (C-Terminus) gefärbt. Lila gefärbt sind Bereiche, welche nicht in die Homopolymerisierung involviert sind. Phenylalanine, welche in Mutanten durch Alanine ersetzt wurden, sind als rote „A“ markiert.



Abb. 3.1 Schematische Darstellung von Wildtyp N Protein (links oben) und Mutanten, welche heterolog in *E. coli* exprimiert wurden. Die Nterminale Protein – Protein Bindungsregion ist grau gefärbt, die C-terminale grün. Einzelne ausgetauschte Aminosäuren sind rot markiert (F242A, F246A). Nicht in die homotypische Interaktion involvierte Bereiche des N Proteins sind lila gefärbt.

Mit dem Expressionsvektor pQEC (vgl. Tabelle 3.1) konnten sehr hohe Mengen an TSWV N wt, N F242A und N F246A Protein löslich exprimiert und über die C-terminale (His)₆-Fusion mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Säulen gereinigt werden (vgl. Kap. 2.2.6). Ursprünglich wurden Gel-Retardations-Assays (GEMSAs = Gel Electrophoretic Mobility Shift Assays) mit diesen Proteinen durchgeführt. Die Analyse von Kontrollexperimenten ergab jedoch, dass Proteine ohne bekannte RNA-Bindungseigenschaft unspezifisch mit RNA-Substraten interagieren können, wenn sie eine Polyhistidin-Fusion tragen (vgl. Kapitel 3.8.2). Die Doppelpunktmutante N F242_246A konnte mit dem Vektor pQEC unter Verwendung von *E. coli* M15 [pREP4] nicht exprimiert werden, wie aus der Tabelle 3.1 hervorgeht. Diese Mutante war aber für biochemische Untersuchungen äusserst wichtig, da sie in Hefe Zwei-Hybrid-Experimenten eine stark abgeschwächte Selbstinteraktion zeigte (Uhrig *et al.* 1999). Aus diesen Gründen musste ein neues Expressionssystem gefunden werden, mit dem die Reinigung von TSWV N Protein und Mutanten ohne Hexahistidin-Fusion möglich ist.

Tabelle 3.1 Übersicht der wichtigsten in dieser Doktorarbeit verwendeten Expressionsvektoren, -zellen und -bedingungen zur Herstellung von TSWV N Protein und Mutanten.

Die Referenzen geben an, von wem die Vektoren kloniert wurden: CM – Christoph Minke, CP - Christina Philipp, GB – Gregor Bucher, JU – Joachim Uhrig, KR – Klaus Richter, TS – Tim Söllick

Abkürzungen: (l) lösliches Protein, (nl) nicht lösliches Protein

Expressionsvektor	Modifikation(en)	Expressionszellen	Expressionsbedingungen ¹⁰
pET28a-N wt (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(l): 37°C (220 rpm)
pET28a-N N?22 (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(l): 30°C (220 rpm)
pET28a-N C?26 (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(nl): 30°C (220 rpm)
pET28a-N C?26 (GB)	(His) ₆ (C-terminal) (nicht entfernenbar)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(nl): 30°C (220 rpm) 0,2 mM IPTG Erfolgreich zurückgefaltet (l)
pET28a-N N?39 (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(l): 30°C (220 rpm)
pET28a-N N?223 (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Nicht / sehr niedrig exprimiert
pET28a-N F242A (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(l): 37°C (220 rpm)
pET28a-N F246A (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(l): 37°C (220 rpm)
pET28a-N F242_246A (CP)	(His) ₆ -thrombin (N-terminal)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(l): 28°C (220 rpm)
pET16b-N N?39 (GB)	(His) ₆ (N-terminal) (nicht entfernenbar)	BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	(nl): 30°C (220 rpm) 0,2 mM IPTG
pET16b-Arf (JU)	(His) ₁₀ (N-terminal)	BL21(DE3)	(l): 37°C (220 rpm)
pQEC-N wt-his ₆ (CM)	(His) ₆ (C-terminal)	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	(l): 37°C (220 rpm)
pQEC-N F242A-his ₆ (CM)	(His) ₆ (C-terminal)	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	(l): 37°C (220 rpm)
pQEC-N F246A-his ₆ (CM)	(His) ₆ (C-terminal)	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	(l): 37°C (220 rpm)
pQEC-N F242_246A-his ₆ (CM)	(His) ₆ (C-terminal)	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Nicht / sehr niedrig exprimiert
pQEC-N wt (GB)	Ohne (His) ₆ -Fusion	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	(l): 37°C (220 rpm)
pQEC-N F242A (GB)	Ohne (His) ₆ -Fusion	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	(l): 37°C (220 rpm)
pQEC-N F246A (GB)	Ohne (His) ₆ -Fusion	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	(l): 37°C (220 rpm)
pQEC-N F242_246A (GB)	Ohne (His) ₆ -Fusion	<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	(l): 37°C (220 rpm), niedrig!

Der *E. coli* Vektor pET28a erlaubt die heterologe Expression von Proteinen mit einer N-terminalen Fusion, welche ein Hexahistidin zur Reinigung über Ni-NTA Säulen und eine Thrombin-Schnittstelle umfasst. Diese befindet sich zwischen (His)₆-Fusion und Start-Methionin des TSWV N Proteins. Mit diesem Vektor wurden TSWV N wt, N_Δ22, N_Δ39, F242A, F246A und F242_246A in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL löslich exprimiert (vgl. Tabelle 3.1 und Abb. 3.2). Mit biotinyliertem Thrombin wurden die (His)₆-Fusionen weggeschnitten und das Thrombin durch Inkubation mit Streptavidin Agarose entfernt (vgl. Kap. 2.2.6). Die entstandenen Proteine unterscheiden sich nur durch die sieben Aminosäuren GSHMAMD am N-Terminus von der exakten Wildtyp N Proteinsequenz. Die Tabelle 2.1 zeigt, dass sehr geringe Mengen an Thrombin für eine vollständige Entfernung der (His)₆-Fusion ausreichen. Dies liegt daran, dass es eine der aktivsten sequenzspezifischen Proteasen ist (Lottenberg *et al.* 1981; Chang *et al.* 1985). Das durch die Spaltung entstehende N-terminale Peptid wurde durch Dialyse entfernt.

Die meisten der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden mit N Protein und Mutanten durchgeführt, welche wie oben gesagt hergestellt wurden. Andernfalls wird explizit auf die Anwesenheit einer Polyhistidinfusion hingewiesen.

¹⁰ Falls nicht anders vermerkt, wurde 1 mM IPTG zur Induktion der Expression verwendet.

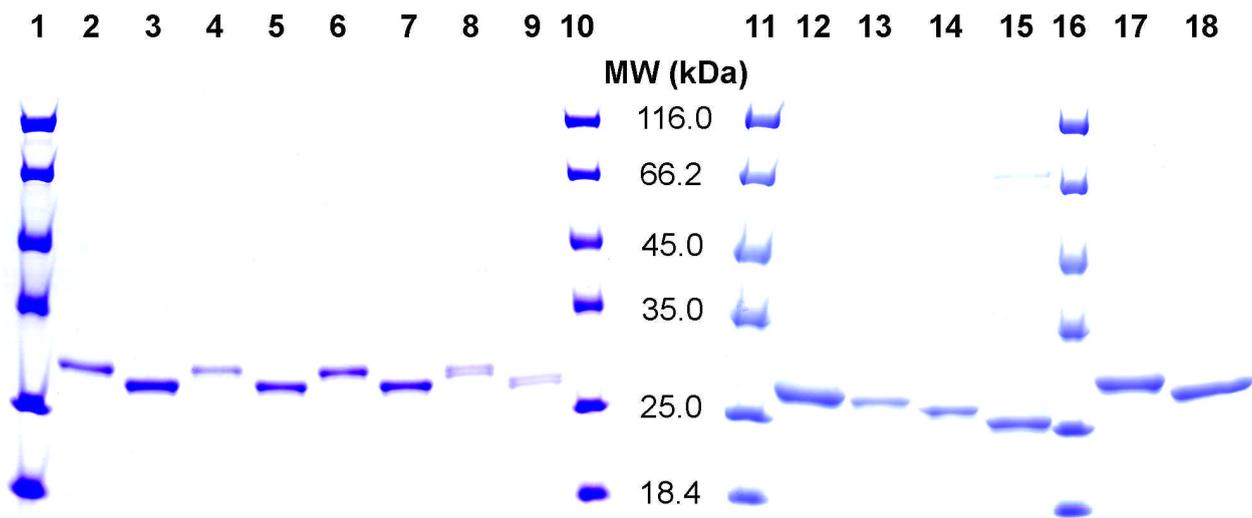


Abb. 3.2 Gereinigtes TSWV N Protein und Mutanten: Mit „Coomassie brilliant blue R“ gefärbte SDS-Gele. Zur Expression wurden *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL verwendet.

- | | |
|--|--|
| 1. Proteingrößenmarker (MBI Fermentas) | 11. Proteingrößenmarker (MBI Fermentas) |
| 2. pET28a-N wt mit (His) ₆ -Fusion (31.5 kDa) | 12. pET28a-N NΔ22 mit (His) ₆ -Fusion (29.1 kDa) |
| 3. pET28a-N wt ohne (His) ₆ -Fusion (29.6 kDa) | 13. pET28a-N NΔ22 ohne (His) ₆ -Fusion (27.2 kDa) |
| 4. pET28a-N F242A mit (His) ₆ -Fusion (31.4 kDa) | 14. pET28a-N NΔ39 mit (His) ₆ -Fusion (27.1 kDa) |
| 5. pET28a-N F242A ohne (His) ₆ -Fusion (29.6 kDa) | 15. pET28a-N NΔ39 ohne (His) ₆ -Fusion (25.2 kDa) |
| 6. pET28a-N F246A mit (His) ₆ -Fusion (31.4 kDa) | 16. Proteingrößenmarker (MBI Fermentas) |
| 7. pET28a-N F246A ohne (His) ₆ -Fusion (29.6 kDa) | 17. pET28a-N wt mit (His) ₆ -Fusion (31.5 kDa) |
| 8. pET28a-N F242_246A mit (His) ₆ -Fusion (31.4 kDa) | 18. pET28a-N wt ohne (His) ₆ -Fusion (29.6 kDa) |
| 9. pET28a-N F242_246A ohne (His) ₆ -Fusion (29.5 kDa) | |
| 10. Proteingrößenmarker (MBI Fermentas) | |

3.2 Optimierung der Puffer zur Lagerung von N Protein

Die beschränkte Haltbarkeit des bakteriell exprimierten TSWV N Proteins war ein schwieriges Problem, das es zu lösen galt. Dabei ging es nicht nur darum, möglichst lange mit dem Protein arbeiten zu können, sondern es war auch wichtig, sicherzustellen, dass das N Protein korrekt gefaltet vorlag und damit seine biologischen Funktionen (Homopolymerisierung, RNA-Bindung) *in vitro* erfüllen konnte.

Lindwall und Kollegen gaben eine Liste von Puffern an, welche ein möglichst breites Spektrum an Bedingungen (pH, Salzart und -konzentration sowie Zusätze wie Detergenzien, Glycerin, Dextransulfat) abdecken sollte (Lindwall *et al.* 2000). Das Ziel der Autoren war, den „Löslichkeitsraum“ („solubility space“) durch eine „spärliche Matrix“ („sparse matrix“) zu repräsentieren, wobei der „Löslichkeitsraum“ durch akzeptierte Theorien der Proteinlöslichkeit und -faltung gegeben war. Für den Löslichkeitstest des TSWV N Proteins wurden zusätzlich zu den 30 in der Publikation genannten Puffern 18 weitere hergestellt (vgl. Kap. 2.2.9). Danach stand der in Kapitel 2.1.6 genannte „pET“ Puffer als der bestgeeignete fest.

PET28a-N wt Protein, welches im GEMSA-Puffer (1x TBP, vgl. Kap. 2.1.6) aufbewahrt wurde, befand sich nach 38 Tagen (und 90minütiger Zentrifugation bei 13'000 rpm und 4°C) noch zu 73% im Überstand. Zur Aufbewahrung wurde fortan der „pET“ Puffer benutzt (100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄

(pH 8.0), 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10% Glycerin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$), was eine nahezu verlustfreie Lagerung des N Proteins über Monate hinweg ermöglichte. In Gel-Retardations-Assays konnte kein Verlust der RNA-Bindungsfähigkeit von korrekt gelagertem N Protein beobachtet werden.

3.3 Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der Circular Dichroismus (CD-) Spektroskopie (vgl. Kap. 2.2.12) sollte die Frage geklärt werden, ob sich die Sekundärstrukturanteile der mutierten TSWV N Proteine von denen des Wildtyp Proteins unterscheiden. Es wird vermutet, dass die Interaktionsdomänen des N Proteins durch α -Helices gebildet werden (vgl. Abb. 1.9). Der Austausch von Aminosäuren in den Punktmutanten könnte zu einer Destabilisierung von Sekundärstrukturen führen. Ausserdem sollten Mutanten mit fehlender Interaktionsdomäne niedrigere Anteile an α -Helices besitzen, falls die erwähnte Hypothese stimmt. Ein ungeeigneter Puffer könnte sich negativ auf die Stabilität des gefalteten Zustands und damit auf geordnete Strukturen auswirken (Gazit 2001).

Um diese Fragen zu klären, wurde die CD-Spektroskopie eingesetzt, welche Informationen über die Struktur biologischer Makromoleküle liefern kann. In einem CD-Spektrum wird die Differenz zwischen der Absorption von links- und rechtsherum zirkular polarisiertem Licht als Funktion der Wellenlänge gemessen.

Es wurden CD-Spektren von TSWV wt N mit C-terminaler $(\text{His})_6$ -Fusion (pQEC-N) sowie wt N mit und ohne N-terminaler $(\text{His})_6$ -Fusion (pET28a-N) gemessen. Ausserdem wurden die CD-Spektren der von pET28a-Vektoren exprimierten Punktmutanten N F242A, N F246A und N F242_246A - jeweils mit und ohne N-terminaler $(\text{His})_6$ -Fusion – gemessen. Schliesslich wurden auch die Deletionsmutanten N Δ 22 und N Δ 39 (mit und ohne N-terminaler $(\text{His})_6$ -Fusion) untersucht, welche ebenfalls von pET28a-Vektoren exprimiert wurden. Die Tabelle 3.2 gibt die α -helikalen Anteile der einzelnen Proteinvarianten sowie das verwendete Puffersystem an.

Tabelle 3.2 Auswertung der CD-Spektren. Die prozentualen Anteile der α -Helices sowie die verwendeten Puffer sind angegeben.

Protein (Mutante)	Puffer-system	α -Helix	Protein (Mutante)	Puffer-system	α -Helix
pQEC-N- $(\text{His})_6$ wt	pQEC-N	23%	pET28a-N F242_246A mit $(\text{His})_6$	1x TBP	1%
pET28a-N wt mit $(\text{His})_6$	1x TBP	20%	pET28a-N F242_246A ohne $(\text{His})_6$	1x TBP	20%
pET28a-N wt ohne $(\text{His})_6$	1x TBP	38%			
pET28a-N F242A mit $(\text{His})_6$	1x TBP	6%	pET28a-N Δ 22 mit $(\text{His})_6$	1x TBP	18%
pET28a-N F242A ohne $(\text{His})_6$	1x TBP	29%	pET28a-N Δ 22 ohne $(\text{His})_6$	1x TBP	41%
pET28a-N F246A mit $(\text{His})_6$	1x TBP	17%	pET28a-N Δ 39 mit $(\text{His})_6$	1x TBP	4%
pET28a-N F246A ohne $(\text{His})_6$	1x TBP	26%	pET28a-N Δ 39 ohne $(\text{His})_6$	1x TBP	11%

Das Wildtyp N Protein mit C-terminaler $(\text{His})_6$ -Fusion wurde in „pQEC“-Puffer untersucht (vgl. Kap. 2.1.6), die Proteine mit oder ohne N-terminaler $(\text{His})_6$ -Fusion in 1x TBP Puffer. Die pET28a-exprimierten Proteine wurden also unter den Bedingungen gemessen, die in GEMSAs herrschen. Wegen der relativ hohen Salzkonzentration konnte nur zwischen 198 nm und 250 nm gemessen

werden. Die errechneten Anteile an β -Faltblättern (" β -sheets"), β -Schleifen (" β -turns") und ungeordneten Strukturen ("random coils") waren daher fehlerbehaftet und sind in Tabelle 3.2 nicht aufgeführt. Die Anteile an α -Helices konnten jedoch sauber gemessen werden, da bei 222 nm nur diese zum CD-Spektrum beitragen (Sreere *et al.* 1969).

Bei den Proteinen ohne Nterminale (His)₆-Fusion wurden für das Wildtyp N Protein sowie für N Δ 22 die höchsten Anteile an α -Helix gemessen (38 bzw. 41%). Die Punktmutanten N F242A und N F246A (jeweils ohne (His)₆-Fusion) hatten etwas niedrigere α -helikale Anteile (29 bzw. 26%). Für die Doppelpunktmutante N F242_246A (ohne (His)₆-Fusion) wurde nur noch ein etwa halb so grosser Anteil an α -Helix wie beim Wildtyp N Protein gemessen. Die N-terminal um 39 Aminosäuren verkürzte Mutante N Δ 39 hatte nur einen Anteil von 11% α -Helix, verglichen mit den 38% des Wildtyp N Proteins.

Ein anderes Bild ergab sich beim Messen der Proteine, bei denen die Nterminale (His)₆-Fusion nicht durch Thrombinspaltung entfernt worden war. Deren α -helikale Anteile lagen durchwegs deutlich unter denen der Proteine ohne (His)₆-Fusion. Am deutlichsten war der Unterschied im Fall der Mutanten N F242_246A (1% α -Helix mit Polyhistidin-Fusion, 20% ohne).

3.4 Spektralanalyse des heterolog exprimierten TSWV N Proteins

Weil das TSWV N Protein eine allgemeine RNA-Bindungsfähigkeit besitzt, stellte sich die Frage, ob nativ aus *E. coli* gereinigtes N Protein RNA enthält. Deshalb wurden mit einem UV-VIS Photometer Absorptionsspektren von heterolog in *E. coli* exprimiertem TSWV N Protein aufgenommen. Ein typisches Protein-Absorptionsspektrum hat ein Maximum bei 275-280 nm, ein Minimum bei ca. 250 nm und zeigt keine Absorption über 310 nm (Abb. 3.3 (A)). Das Maximum bei 280 nm wird im wesentlichen von der aromatischen Aminosäure Tryptophan (Trp, W) bestimmt. Das N Protein enthält aber keinen Tryptophan-Rest. Deshalb wird die aromatische Aminosäure Tyrosin, welche siebenmal vorkommt, zum dominierenden Faktor, der das Absorptionsspektrum bestimmt. Für reines N Protein ist also keine Absorption oberhalb von ca. 295 nm zu erwarten (bei Anwesenheit von Tryptophan wäre Absorption bis 310 nm zu messen) und der Absorptions-Peak sollte sich durch die Abwesenheit von Tryptophan von 280 auf 274 nm verschieben. Die Abbildungen 3.3 (B) und (C) zeigen die Absorptionsspektren von nativ aufgereinigtem pET28a-N wt Protein mit (B) bzw. ohne (C) Nterminale (His)₆-Fusion. Für (B) wurde ein Verhältnis $A_{260} : A_{280}$ von 1.87 berechnet, für (C) ein Verhältnis von 1.69. Damit enthielten beide Proteinpräparationen Nukleinsäure. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um *E. coli* RNA handelt. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm.

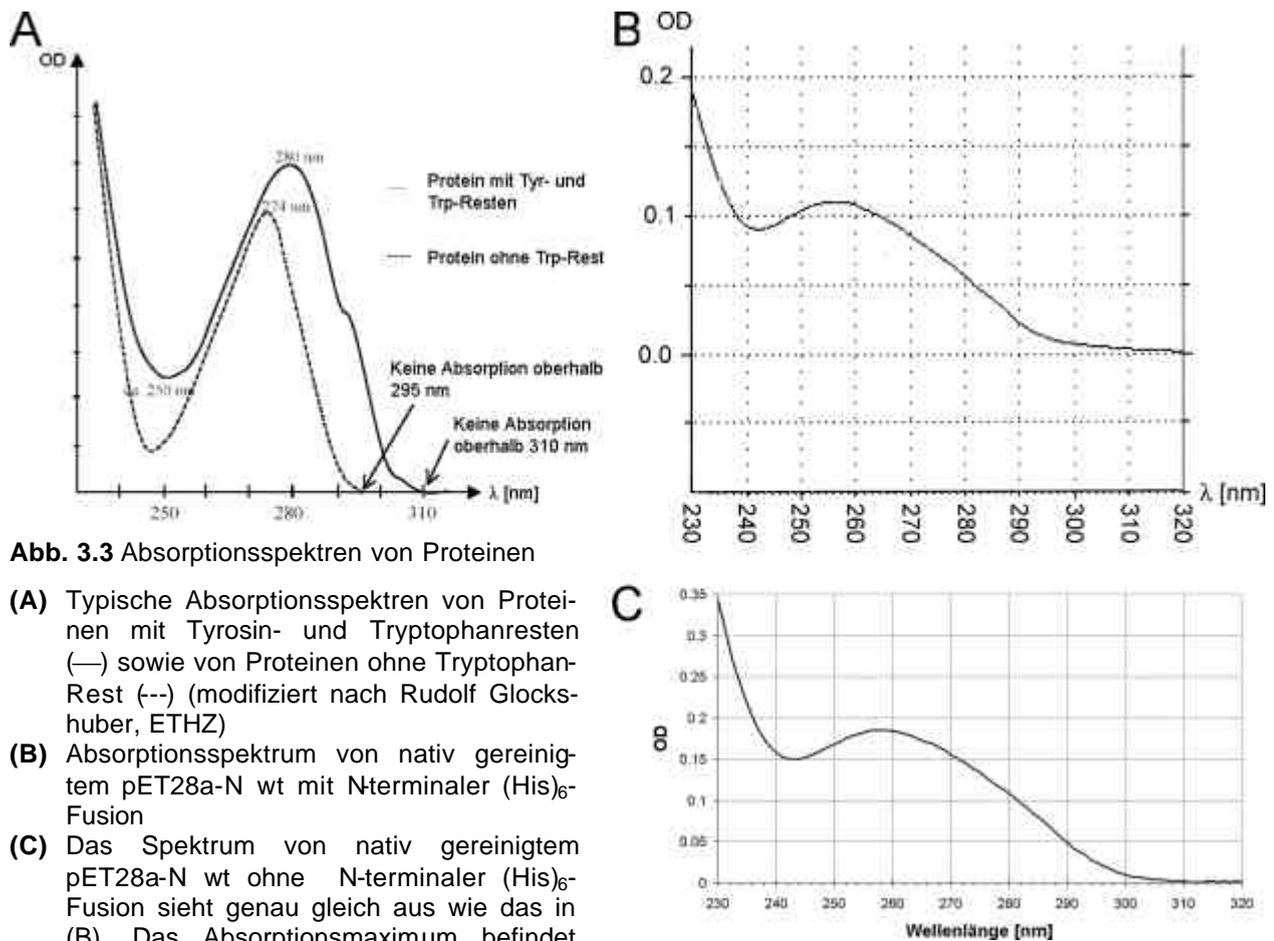


Abb. 3.3 Absorptionsspektren von Proteinen

- (A) Typische Absorptionsspektren von Proteinen mit Tyrosin- und Tryptophanresten (—) sowie von Proteinen ohne Tryptophan-Rest (---) (modifiziert nach Rudolf Glockshuber, ETHZ)
- (B) Absorptionsspektrum von nativ gereinigtem pET28a-N wt mit N-terminaler (His)₆-Fusion
- (C) Das Spektrum von nativ gereinigtem pET28a-N wt ohne N-terminaler (His)₆-Fusion sieht genau gleich aus wie das in (B). Das Absorptionsmaximum befindet sich bei 258 nm, was auf die Anwesenheit von Nukleinsäure schliessen lässt.

In der Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse von weiteren Spektralanalysen zusammengefasst. Es wurde stets mit pET28a-N wt Protein ohne (His)₆-Fusion gearbeitet. Das Ziel dieser Experimente war, herauszufinden, ob es möglich ist, mittels RNase-Behandlung die *E. coli* RNA in der N Protein Präparation zu entfernen. Es wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass in Gegenwart von 20 mM Lauryl Sulfobetain (SB-12) die hochmolekularen N Protein-Komplexe zum Teil in niedrigmolekulare Komplexe und auch Monomer umgewandelt werden (Hackbusch 2001). Durch Inkubation mit dem Detergens könnte die RNase A eventuell Zugang zur RNA erhalten, welche durch das N Protein gebunden wird. In früheren Experimenten war nämlich festgestellt worden, dass sich das Absorptionsspektrum des N Proteins nach Zugabe von RNase und Entfernung allfällig entstandener Nukleotide nicht veränderte.

Das Experiment Nr. 1 entspricht dem Spektrum (C) in Abbildung 3.3. Mit dem Experiment Nr. 2 wurde gezeigt, dass sich in Gegenwart von 20 mM SB-12 Absorptionsspektren messen lassen und dass das Detergens – wenn es auch in der Referenzküvette in gleicher Konzentration vorhanden ist - keinen Einfluss auf das Spektrum hat. Nach Zugabe von SB-12 wurde die Monomerfraktion vom Multimer abgetrennt. Deren Absorptionsspektren wurden individuell gemessen und es stellte sich heraus, dass pro µg N Protein-Monomer deutlich mehr RNA gebunden war als pro µg N Protein-Multimer (Experimente Nr. 3 und 4). Schliesslich wurde getestet, ob sich die *E. coli* RNA in Anwesenheit von 20 mM SB-12 mit RNase A wegverdauen lässt. Dazu wurden 72 µg N Protein 1

h lang bei 30°C mit 10 µg RNase A inkubiert (Experiment Nr. 6.). Auch nach Abtrennung eventuell freigesetzter Nukleotide hatte sich am Verhältnis $A_{260} : A_{280}$ nichts geändert.

Damit können wir festhalten, dass (1) nativ aus *E. coli* gereinigtes TSWV N Protein Nukleinsäure enthält. Es handelt sich mit grösster Wahrscheinlichkeit um *E. coli* RNA. (2) Durch Inkubation mit dem Detergens SB-12 gebildetes N Protein-Monomer bindet quantitativ mehr *E. coli* RNA als N Protein-Multimer. (3) Selbst grosse Mengen an RNase A können auch in Gegenwart von SB-12, welches die Komplexe teilweise auflöst, die Nukleinsäure nicht verdauen. Es wird spekuliert, dass das N Protein bei der Interaktion mit RNA eine Konformationsänderung erfährt und danach die Nukleinsäure fest umschliesst. Es kann gefolgert werden, dass die in Gelfiltrationsanalysen (Kap. 3.5) detektierten Komplexe und die in BN-PAGE Gelen (Kap. 3.6) beobachteten Banden tatsächlich durch Protein – Protein Interaktionen und nicht durch unspezifische Bindung an RNA gebildet wurden. Dabei wird davon ausgegangen, dass RNase A auch in 20 mM SB-12 noch aktiv ist. Die Beobachtung, dass das in Anwesenheit von Detergens gebildete N-Monomer pro µg Protein mehr RNA bindet als N-Multimer kann dadurch erklärt werden, dass ein N Protein mit gebundener RNA sich durch die negative Ladung der RNA eher vom Komplex (der vermutlich auch N Protein ohne gebundene RNA enthält) löst als ein N Protein ohne gebundene Nukleinsäure.

Tabelle 3.3 Spektralanalysen von heterolog in *E. coli* exprimiertem N wt Protein ohne (His)₆-Fusion. Die Zahlenverhältnisse geben Aufschluss über den Nukleinsäuregehalt (RNA-Gehalt) der Proben. Da TSWV N auf Grund des Fehlens der Aminosäure Tryptophan ein erwartetes Absorptionsmaximum bei 274 nm hat, ist zusätzlich zum üblichen Verhältnis $A_{260} : A_{280}$ auch das Verhältnis $A_{260} : A_{274}$ angegeben.

Experiment Nr.	Analysierte Probe	$A_{260} : A_{280}$	$A_{260} : A_{274}$
1	30 µl = 108 µg in pET Puffer	1.69 : 1	1.33 : 1
2	30 µl = 108 µg in pET Puffer + 20 mM SB-12	1.73 : 1	1.35 : 1
3	Monomerfraktion in pET Puffer + SB-12	3.97 : 1	2.60 : 1
4	Multimerfraktion in pET Puffer + SB-12	1.66 : 1	1.34 : 1
5	Multimerfraktion in pET Puffer (SB-12 entfernt)	1.51 : 1	1.28 : 1
6	20 µl = 72 µg in pET Puffer + 20 mM SB-12 + 10 µg RNase A (1h bei 30°C inkubiert)	1.71 : 1	1.32 : 1
7	20 µl = 72 µg in pET Puffer + 20 mM SB-12 + 10 µg RNase A (1h bei 30°C inkubiert) nach Filtration (Entfernung eventuell vorhandener Nukleotide)	1.69 : 1	1.35 : 1

3.5 Gelfiltrationsanalysen von TSWV N Protein und Mutanten

Die Selbstinteraktion des TSWV N Proteins wurde in *in vivo* und *in vitro* Studien belegt (Uhrig *et al.* 1999; Soellick 2000). Mittels Gelfiltration (vgl. Kap. 2.2.15) sollten die Komplexgrössen bestimmt werden. Ausserdem sollte geklärt werden, ob und wie weit sich die Oligomerisierungszustände der erstmals in *E. coli* exprimierten N Protein Mutanten F242_246A von denen des Wildtyp Proteins unterscheiden. Es wurde vermutet, dass das Wildtyp N Protein wegen seiner Fähigkeit zur Homopolymerisierung in hochmolekularer Form vorliegt. Hingegen sollte die Doppelpunktmutante N F242_246A auf Grund der in Hefe-Interaktionsexperimenten gefundenen stark reduzierten Dimerisierung zumindest teilweise als Monomer vorliegen. Ein monomeres N Protein wäre für Protein – RNA Interaktionsstudien von grossem Wert, weil damit die Frage beantwortet werden

könnte, ob N als Monomer RNA binden kann oder ob nur höhermolekulare Aggregate dazu fähig sind. Die Proteinmengen im Eluat der Gelfiltrationen wurden mittels UV- ($\lambda=280$ nm) und Fluoreszenzmessung (Anregung bei 260 nm, Emission bei 290 nm) bestimmt. Falls die Proteinlösungen stark verdünnt waren, so dass UV- und Fluoreszenzmessung keine sauberen Daten lieferten, wurden die Fraktionen mittels „Dot Immuno Binding Assays“ (DIBAs, vgl. Kap. 2.2.13) auf N Protein-Gehalt untersucht.

Der Tabelle 3.4 kann entnommen werden, dass Wildtyp N Protein in Abwesenheit von Detergens hauptsächlich als hochmolekularer Komplex und in geringer Menge als Tetramer und Trimer vorlag (Experiment Nr. 1). Es ist bekannt, dass das N Protein des mit TSWV nahe verwandten Sin Nombre Virus nach heterologer Expression in *E. coli* und nativer Aufreinigung Nukleinsäure gebunden hat (Jonsson *et al.* 2001). Spektralanalysen hatten gezeigt, dass dies auch für das TSWV N Protein der Fall ist (vgl. Kap. 3.4). Es wurde spekuliert, dass diese RNA einen Einfluss auf den Multimerisierungsgrad des N Proteins haben könnte. Darum wurden Proteinpräparationen mit RNase A inkubiert, um in Gelfiltrationsanalysen ein mögliches Auflösen multimerer Komplexe beobachten zu können. In Experiment Nr. 2 wurden 2.0 mg N Protein ohne (His)₆-Fusion über Nacht bei RT mit einer ca. 100fach geringeren Molekülmenge RNase A inkubiert. Wiederum

Tabelle 3.4 Übersicht: Mittels Gelfiltration bestimmte Polymerisierungszustände von TSWV Wildtyp N Protein und N F242_246A unter verschiedenen Bedingungen. Die Spalte „RNase“ gibt an, ob das Protein mit RNase inkubiert worden war. „Hochmolekular“ bedeutet, dass die Grössen der Proteinaggregate nicht mehr bestimmt werden konnten, da sie im Ausschlussvolumen der Säule eluierten. Die Zahlen geben die Reihenfolge der Peakgrössen wieder (1 = grösster Peak, 2 = zweitgrösster Peak etc.). Werte in Klammern geben an, dass nur geringe Mengen in „Dot Immuno Binding Assays“ (DIBAs) gefunden wurden. Wenn sich eine Zahl zwischen zwei Spalten befindet, bedeutet dies, dass der Peak nicht eindeutig zugeordnet werden konnte bzw. von der Säule nicht aufgelöst wurde.

Exp. Nr.	Protein	(His) ₆ -Fusion	RNase A	SB-12	Hochmolekular	Pentamer	Tetramer	Trimer	Dimer	Monomer
1	pET28a-N wt	-	-	-	1		2	3		
2	pET28a-N wt	-	+	-	1		2	3		
3	pET28a-N wt	-	+++ ¹	-	1		2	3		
4	pET28a-N wt	-	-	+ ²	2			1		3
5	pET28a-N wt	+	+	+ ³	5		2	1	4	3
6	pET28a-N wt	+	+	+ ⁴	3			1		2
7	pET28a-N F242_246A	-	-	-	1		(5)	3	(4)	2
8	pET28a-N F242_246A Polymerfraktion	-	-	-	1		3	2	(5)	4
9	pET28a-N F242_246A	-	+	-	1		4	3		2

¹ pET28a-N wt ohne (His)₆ und RNase A und wurden im Molekülverhältnis 1 : 2 eingesetzt.

² 30 mM SB-12 im Probenpuffer und 10 mM SB-12 im Laufpuffer

³ 40 mM SB-12 im Probenpuffer (aber nicht im Laufpuffer)

⁴ 40 mM SB-12 im Probenpuffer und 10 mM SB-12 im Laufpuffer

wurden hauptsächlich hochmolekulare Komplexe sowie etwas Tetramer und Trimer gefunden. In Experiment Nr. 3 wurden zur gleichen N-Menge gar 2.0 mg RNase A gegeben, was einem molaren Verhältnis von 1:2 entspricht. Es wurde 1 h bei 30°C und anschliessend über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Ergebnis war genau das gleiche wie nach Inkubation mit wenig RNase A.

In Experiment Nr. 7 wurden 1.2 mg N F242_246A ohne (His)₆-Fusion (und ohne RNase Inkubation) auf die Säule geladen. Aus der Tabelle 3.4 ist ersichtlich, dass nach wie vor hochmolekulare Komplexe vorherrschten, deren genaue Grösse nicht bestimmt werden konnte. Allerdings stellte der zweitgrösste Peak das N Monomer dar, gefolgt vom Trimer. Dimer und Tetramer / Pentamer konnten nur im DIBA schwach nachgewiesen werden. Ein ähnliches Ergebnis lieferte Experiment Nr. 9, bei dem das N F242_246A Protein vor dem Laden über Nacht bei RT mit RNase A inkubiert worden war (Molekülverhältnis N F242_246A : RNase A \approx 100 : 1).

Es wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Sulfobetain SB-12 (Gonenne *et al.* 1978) in Blue Native PAGE (BN-PAGE) Experimenten Komplexe von Wildtyp N Protein auflösen kann, so dass zum Teil Monomer entsteht (Hackbusch 2001). SB-12 ist ein zwitterionisches Detergens, das in seiner Struktur dem SDS sehr nahe kommt (vgl. Kap. 2.1.1). Es hat eine cmc von 3.6 mM und eine Aggregationszahl von ca. 55. SB-12 wurde verwendet, weil es im Gegensatz zu SDS keine denaturierende Wirkung auf Proteine hat. Bei Verwendung von 30 mM SB-12 im Probenpuffer und 10 mM SB-12 im Laufpuffer wurden Trimer und Tetramer zu den dominanten Polymerisierungszuständen des Wildtyp N Proteins ohne (His)₆-Fusion (Experiment Nr. 4). Der zweitgrösste Peak wurde von hochmolekularen Komplexen gebildet, gefolgt vom Monomer. Etwas unterschiedliche Ergebnisse lieferten die Experimente Nr. 5 und 6, bei denen Wildtyp N Protein mit N-terminaler (His)₆-Fusion verwendet wurde. In beiden Fällen wurde die Proteinpräparation vor dem Säulenlauf mit RNase A inkubiert, und zwar jeweils in einem molekularen Verhältnis N Protein : RNase A von ca. 100 : 1. Das Trimer war in beiden Experimenten der vorherrschende Polymerisierungszustand. In Experiment Nr. 5 wurde die Probe mit 40 mM SB-12 inkubiert, aber kein Detergens im Laufpuffer verwendet. Als zweithäufigste Population wurde das Tetramer identifiziert, gefolgt von Monomer und Dimer. Beim Experiment Nr. 6 befand sich auch 10 mM SB-12 im Laufpuffer. Das Trimer war immer noch der vorherrschende Polymerisierungszustand, diesmal aber direkt gefolgt vom Monomer. Dimer und Tetramer wurden nicht beobachtet, dafür war aber ein - relativ geringer - Teil des N Proteins im hochmolekularen Zustand.

Es stellte sich die Frage, ob sich die verschiedenen Multimerisierungszustände des N Proteins in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Daher wurde die hochmolekulare Fraktion (mindestens Hexamer) aus dem Experiment Nr. 7 (pET28a-N F242_246A ohne (His)₆-Fusion) aufkonzentriert und nochmals über eine Gelfiltration aufgetrennt (Experiment Nr. 8). Wie beim ersten Durchlauf (Experiment Nr. 7) befand sich das meiste N Protein im hochmolekularen Zustand. Es waren aber auch Trimer, Tetramer und Monomer im DIBA zu erkennen. Im Unterschied zur ersten Gelfiltration war in der zweiten nur sehr wenig Monomer vorhanden. Die Säulen-Elutionsprofile und DIBAs werden in Abbildung 7.1 (Anhang) gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nativ gereinigtes TSWV N Protein vor allem als sehr hochmolekularer Komplex vorlag. Ausserdem wurde in Gelfiltrationsanalysen mit N Protein ohne (His)₆-Fusion Tetramer und Trimer, aber kein Dimer oder Monomer gefunden. Durch die Zugabe des nicht denaturierenden Detergens SB-12 wurden die Komplexe teilweise aufgelöst, und es

entstand hauptsächlich Trimer, aber auch Tetramer und Monomer. Wiederum wurde fast kein Dimer gefunden. Die Doppelpunktmutante N F242_246A lag vor allem als hochmolekularer Komplex vor, doch eluierte sie auch als Monomer, Trimer und Tetramer. Inkubation mit RNase A führte in keinem Fall zu einer Veränderung der Multimerisierungszustände.

3.6 Analyse der N Protein-Multimerisierung mittels Blue Native PAGE

Laemmli-SDS und Tricin-SDS PAGE sind die populärsten Methoden zur eindimensionalen Auftrennung und Analyse von Proteingemischen. Damit werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Für die Untersuchung der Protein – Protein Interaktionen des TSWV N Proteins sollten die Komplexe unter nativen Bedingungen separiert werden. BN-PAGE ist die erste Standardmethode, bei der das durch den Einsatz nichtionischer Detergenzien sowohl mit hydrophilen als auch mit hydrophoben Proteinkomplexen möglich ist. Im Gegensatz zur SDS-PAGE wird der Farbstoff Coomassie vor der Elektrophorese dazugegeben. Er bindet an die Proteine und führt dadurch negative Ladungen ein.

Mit dem Vektor pET exprimiertes TSWV Wildtyp N Protein sowie die Mutanten N Δ 22 und N Δ 39 zeigten auf Blue Native Gelen keine deutlichen Bandenmuster, wenn sie die N-terminale (His)₆-Fusion enthielten (Abb. 3.4, Spuren (a) 1, (b) 1 und 3). Erst nach Abspaltung der (His)₆-Fusion

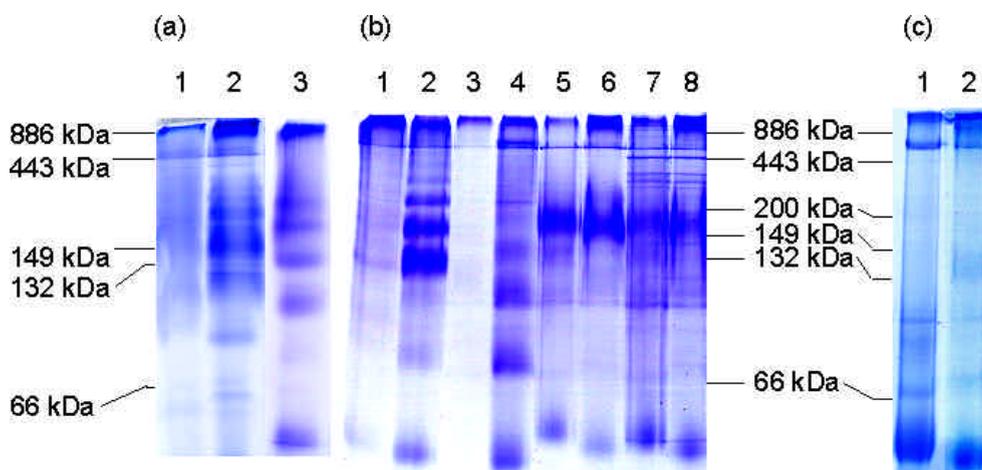


Abb. 3.4 Analyse der Multimerisierungszustände von heterolog in *E. coli* exprimiertem TSWV N Protein und Mutanten mittels Blue Native PAGE (BN-PAGE).

(a)				
Spur	Protein	(His) ₆ -Fusion	MW (Da)	Menge
1	pET28a-N wt	+	31515	100 µg
2	pET28a-N wt	-	29632	100 µg
3	pQEC-N wt	+	30081	42 µg

(b)				
Spur	Protein	(His) ₆ -Fusion	MW (Da)	Menge
1	pET28a-N N Δ 22	+	29100	52 µg
2	pET28a-N N Δ 22	-	27217	52 µg
3	pET28a-N N Δ 39	+	27054	14 µg
4	pET28a-N N Δ 39	-	25171	52 µg
5	pET28a-N F242A	+	31439	52 µg
6	pET28a-N F242A	-	29556	48 µg
7	pET28a-N F246A	+	31439	78 µg
8	pET28a-N F246A	-	29556	78 µg

(c)				
Spur	Protein	(His) ₆ -Fusion	MW (Da)	Menge
1	pET28a-N F242_246A	+	31363 Da	40 µg
2	pET28a-N F242_246A	-	29480 Da	46 µg

Die mit dem Vektor pQEC exprimierten Proteine enthalten eine nicht entfernbare (His)₆-Fusion am C-Terminus. Die N-terminale (His)₆-Fusion von Proteinen, welche mit dem Vektor pET28a exprimiert wurden, kann durch Thrombin-Spaltung entfernt werden. Anwesenheit einer (His)₆-Fusion wird mit einem (+) Zeichen symbolisiert. Proteine ohne Modifizierung werden mit einem (-) gekennzeichnet.

waren scharfe Banden zu sehen (Abb. 3.4, Spuren (a) 2, (b) 2 und 4), welche unterschiedliche Oligomerisierungszustände der Proteine darstellen. Im Falle der Mutanten N F242A, N F246A und N F242_246A unterschieden sich die Bandenmuster deutlich vom Wildtyp N Protein, doch nicht so stark zwischen Proteinen mit und ohne N-terminaler (His)₆-Fusion. Das Wildtyp N Protein mit C-terminaler (His)₆-Fusion bildete ein dem N Protein ohne Modifikation vergleichbares Muster aus, doch unterscheiden sich die molekularen Grössen der Komplexe.

Unter Standardbedingungen war monomeres Wildtyp N Protein ohne Hexahistidin-Fusion nur in geringen Mengen vorhanden (Abb. 3.4, Spur (a) 2). Hingegen enthielten die Mutanten N F242A, N F246A und N F242_246A deutliche Monomeranteile (Abb. 3.4, Spuren (b) 58 und (c) 1, 2). Quantifizierung mit ImageQuant™ 5.1 (Molecular Dynamics) ergab, dass etwa 25% des ins Gel einlaufenden N F242_246A Proteins (ohne (His)₆-Fusion) als Monomer vorlag. Interessanterweise bildeten die Punktmutanten N F242A und N F246A eine prominente Bande aus, welche einem Hexamer entsprechen könnte und N F242_246A eine Bande auf Tetramerhöhe. Diese ist besonders deutlich in Abbildung 3.13 (Spur 2) zu sehen, was durch das höhere Alter des Proteins bedingt sein könnte. Ansonsten waren – abgesehen von wenigen ganz schwachen Banden - nur Monomer und ein sehr hochmolekularer Komplex zu erkennen.

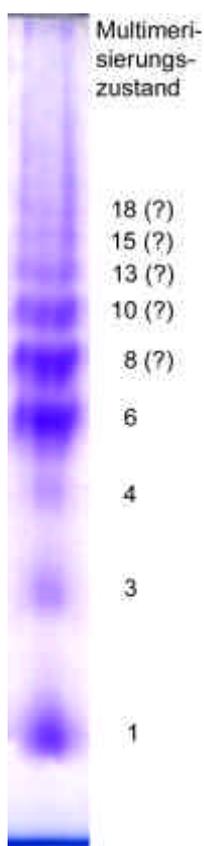


Abb. 3.5 Analyse der Multimerisierung von TSWV N NΔ22 ohne (His)₆-Fusion mittels BN-PAGE.

Aus Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten ging hervor, dass die Mutante N NΔ22 nicht in ihrer Interaktionsfähigkeit mit anderen N Proteinen gestört ist (Uhrig *et al.* 1999). Tatsächlich zeigte N NΔ22 nach Abspaltung der (His)₆-Fusion auch auf BN-Gelen eine sehr ähnliche Musterbildung wie das Wildtyp N Protein (Abb. 3.4, Spur (b) 2). Allerdings war auch etwas Monomer zu sehen. Die Banden sind leicht nach unten verschoben, da die Mutante ein geringeres Molekulargewicht (27.2 kDa) als das Wildtyp N Protein (29.6 kDa) hat.

Die Mutante N NΔ39 ohne (His)₆-Fusion scheint immer noch eine gewisse Fähigkeit zur Multimerisierung zu besitzen, doch ist die Monomerbande deutlicher ausgeprägt als bei N NΔ22 (Abb. 3.4, Spur (b) 4).

Um eine höhere Auflösung zu erreichen, wurden zwei grosse (je knapp 20 cm lange) BN-Gele gegossen. Das laut Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten (Uhrig *et al.* 1999) wie Wildtyp N Protein mit sich selber interagierende N NΔ22 (ohne (His)₆-Fusion) Protein bildete scharfe Banden aus (Abb. 3.5), welche vermutlich den Multimerisierungszuständen Octadecamer, Pentadecamer, Dodecamer oder Tridecamer, Decamer, Octamer, Hexamer, Tetramer, Trimer und Monomer entsprechen. Allerdings konnte der Multimerisierungszustand grosser Komplexe (grösser als ca. Hexamer) aus der Eichgeraden nicht mehr mit Sicherheit abgelesen werden. Daher wurden diese Komplexgrössen in Abbildung 3.5 mit einem Fragezeichen versehen. Im Fall von pET28a-N wt ohne (His)₆-Fusion konnten selbst sehr hochmolekulare Komplexe, welche

gemäss Eichgerade ungefähr 26 bis 40 N Proteinmolekülen entsprechen, unterschieden werden. Die nächstkleineren Banden repräsentierten vermutlich Decamer, Octamer, Hexamer (prominenteste Bande) und Pentamer. Die Mutanten F242A und F246A (beide ohne (His)₆-Fusion) bildeten schlecht aufgelöste hochmolekulare Komplexe sowie deutliche Hexamer- und Monomerbanden. Die Doppelpunktmutante N F242_246A war hauptsächlich als Monomer zu sehen. Die Mutante mit fehlender N-terminaler Bindungsstelle, pET28a-N NΔ39 ohne (His)₆-Fusion, war als grosser Komplex (Icosamer?) sowie als Decamer (?), Tetramer, Trimer und Monomer zu sehen. Durch BN-PAGE Analyse wurde also gezeigt, dass das TSWV N Protein hochmolekulare Komplexe bildet, wobei diskrete Oligomerisierungszustände unterschieden werden können. Mutanten, welche gemäss Hefe-Interaktionsstudien eine abgeschwächte homotypische Bindungsfähigkeit aufweisen sollten, lagen zwar zum Teil auch als Oligomere vor, doch war deren Monomeranteil grösser als beim Wildtyp N Protein. In keinem Fall wurden deutliche Dimerbanden gefunden.

3.7 RNA *in vitro* Transkripte für Protein – RNA Interaktionsstudien

Für die Suche nach möglichen vom TSWV N Protein erkannten Enkapsidierungssignalen sollte RNA *in vitro* transkribiert werden. Um die Zahl der *in vitro* Transkripte handhabbar zu halten, musste eine Auswahl von Sequenzen getroffen werden. Untersuchungen des Bunyamwera Virus, eines Mitglieds der Gattung *Bunyavirus* in der Familie der *Bunyaviridae*, ergaben, dass sowohl dessen vRNA als auch die vcRNA enkapsidiert werden. Enkapsidierte virale oder nichtvirale mRNA sowie andere zelluläre RNAs wurden nicht gefunden (Jin *et al.* 1993). Daraus kann geschlossen werden, dass nichtcodierende Bereiche der genomischen und antigenomischen RNA ein oder mehrere Enkapsidierungssignale enthalten. Sowohl das 5' und 3' Ende als auch die intergenische Region kommen dazu in Frage. Weil jedoch die meisten *Bunyaviridae* mit Ausnahme der Gattungen *Phlebovirus* und *Tospovirus* keine intergenische Region haben und diese auch bei der TSWV L RNA fehlt, beschränkte sich diese Studie auf die Analyse terminaler genomischer und antigenomischer RNAs.

Die terminalen konservierten Enden der genomischen TSWV RNAs bilden sogenannte „Panhandle“-Strukturen aus, wie sie auch bei anderen Mitgliedern der Familie der *Bunyaviridae* (Elliott 1990) sowie bei weiter entfernt verwandten Viren wie Influenza (Familie der *Orthomyxoviridae*; Hsu *et al.* 1987) gefunden wurden. Diese terminalen Sequenzen der *Bunyaviridae* sind spezifisch für jede Gattung, aber für die drei Genomsegmente innerhalb eines Virus konserviert, weshalb ihnen in dieser Studie besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Bei TSWV sind die ersten acht Nukleotide vollständig und die ersten 15 hoch konserviert.

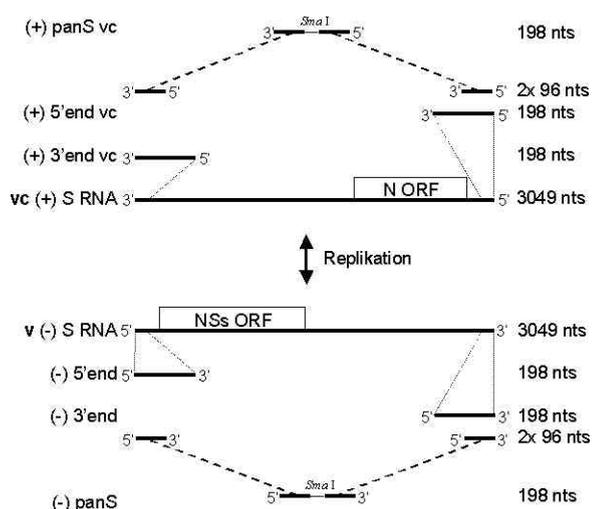


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Positionen der wichtigsten TSWV *in vitro* Transkripte (modifiziert und ergänzt nach Minke 1998). Die Konstrukte panS und panSvc (sowie panS 3'-24 und panS 5'-24, welche hier nicht dargestellt sind) wurden über einen sechs Nukleotide langen *Sma* I Linker fusioniert.

Nukleotide am 5' bzw. 3' Ende fehlen. Ausserdem wurden Konstrukte hergestellt, welche dem viral-komplementären (vc) Genom entsprechen: 5'endvc, 3'endvc und panSvc. Die IVTs 5'end_40-235 und 5'end_77-272 repräsentieren Sequenzen in der Nähe des 5' Endes der TSWV S RNA (Nukleotide 40-235 bzw. 77-272) und haben Längen von je 198 nts (inklusive der zwei Guanosine, welche durch den T7 Promoter am 5' Ende eingefügt werden). Die beiden letztgenannten Konstrukte wurden hergestellt, um den Einfluss eines vom Programm MFOLD (Walter *et al.* 1994) vorhergesagten „Stem-Loops“ am 5' Ende der S RNA (vgl. Kap. 3.10) auf die Interaktion mit dem N Protein zu untersuchen. Bei der Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) RNA 2 handelte es sich um eine Kontroll-RNA aus einem positivsträngigen RNA-Virus der Familie *Potyviridae*. Nichtvirale Kontrollen waren KS und SK RNA, welche durch *in vitro* Transkription auf einem PCR-Produkt entstanden, das mit den in Tabelle 3.5 angegebenen Primern gemacht wurde. Die Tabelle listet auch die verwendeten Plasmid Templates und die Sequenzen der entstehenden RNAs auf. Durch Denaturierung von KS und SK RNA und anschliessende Hybridisierung im Verhältnis 1:1 entstand dsRNA, welche ebenfalls für Bindungsversuche eingesetzt wurde.

Die drei Konstrukte am Ende von Tabelle 3.5 stellen den bereits erwähnten, vom RNA-Faltungsprogramm MFOLD für das 5' Ende der TSWV S RNA vorhergesagten „Stem-Loop“ bzw. zwei mutierte Versionen davon dar. In diesen Fällen wurde die *in vitro* Transkription (IVT) direkt auf Oligonukleotid-Dimeren durchgeführt, welche am 5' Ende den T7 Promoter enthielten und durch Hitzedenaturierung und langsames Abkühlen hybridisiert worden waren.

Bei Verwendung der publizierten T7 Promotersequenz werden in das entstehende *in vitro* Transkript zwei Guanosine am 5' Ende eingebaut (Milligan *et al.* 1987). Ein verkürzter T7 Promoter, dem die zwei Guanosine am 3' Ende fehlten, war in vielen Fällen (5'end, panS, panS 3'-24, panS 5'-24, panS vc, 5'end vc) für eine erfolgreiche IVT ausreichend. Damit entstand die

Mit *in vitro* transkribierten RNAs, welche virale Sequenzen repräsentieren, wurden Protein – RNA Bindungsversuche gemacht, die in den Kapiteln 3.8 und 3.9 beschrieben werden. Die Positionen der wichtigsten *in vitro* Transkripte (IVTs) auf der TSWV S RNA sind in Abb. 3.6 dargestellt. Die Konstrukte 5'end, 3'end und panS („Mini-Panhandle“ der S RNA) haben jeweils eine Länge von 198 nts, wobei sich das panS Konstrukt aus je 96 Nukleotiden des 5' und 3' Endes zusammensetzt, welche durch einen *Sma* I Linker (6 nts) verbunden sind. Die beiden Konstrukte panS 5'-24 und panS 3'-24 sind 174 nts lang und können keinen Doppelstrang ausbilden, da ihnen jeweils 24

genaue virale RNA-Sequenz. In anderen Fällen (3'end, 3'end vc) war der vollständige Konsensus T7 Promoter (5' – TAATACGACTCACTATAGG – 3') Voraussetzung für die „run-off“ Synthese der RNA.

Tabelle 3.5 Oligonukleotide und Plasmide, welche zur Herstellung von Templates für die *in vitro* Transkription benutzt wurden sowie die Sequenzen der dabei entstehenden RNA-Moleküle sind aufgelistet. Die Oligonukleotidsequenzen sind in Kapitel 7.1 nachzulesen. Die Plasmide pUC-panS, pUC-5' Ende und pUC-3' Ende wurden von Christoph Minke kloniert.

Name der RNA	Länge	Plasmid Template	PCR-Primer	RNA-Sequenz
panS	198 b	pUC-panS	Pan5vT7 oder Pan5vT7GG und Pan3v	AGAGCAAUUG UGUCAGAAUU UUGUUCAUAA UCAAACCUCA CUUAGAAAAU CACAAUACUG UAAUAAGAAC ACAGUACCAA UAACCAUAAU GUCUUCGCCG GGCAACUCUG UAUUCCGCAG UCGUUUCUUA GGGUUUUAAU GUGAUGAUUU GUAAGACUGA GUGUUAAAGU AUGAACACAA AAUUGACACG AUUGCUCU
panSvc	198 b	pUC-panS	Pan3vc T7 oder Pan3vc T7GG und Pan5vc	AGAGCAAUCG UGUCAAUUUU GUGUUCAUAC CUUAACACUC AGUCUUACAA AUCAUCACAU UAAAACCCUA AGAAACGACU GCGGAAUACA GAGUUGCCCG GGGAAGACAU UAUGGUUAUU GGUACUGUGU UCUUUAUACA GUUUUGUGAU UUUCUAAGUG AGGUUUUAUU AUGAACAAAA UUCUGACACA AUUGCUCU
panS3'-24	174 b	pUC-panS	Pan5vT7 oder Pan5vT7GG und 3'-24	AGAGCAAUUG UGUCAGAAUU UUGUUCAUAA UCAAACCUCA CUUAGAAAAU CACAAUACUG UAAUAAGAAC ACAGUACCAA UAACCAUAAU GUCUUCGCCG GGCAACUCUG UAUUCCGCAG UCGUUUCUUA GGGUUUUAAU GUGAUGAUUU GUAAGACUGA GUGUUAAAGU AUGA
panS5'-24	174 b	pUC-panS	5vT7-24 oder 5vT7GG-24 und Pan3v	UCAUAAUCAA ACCUCACUUA GAAAUCACAA AUACUGUAAU AAGAACACAG UAACCAUAAAC CAUAAUGUCU UCCCCGGGCA ACUCUGUAAU CCGCAGUCGU UUCUUAGGGU UUUAAUGUGA UGAUUUGUAA GACUGAGUGU UAAGGUUAUGA ACACAAAAUU GACACGAUUG CUCU
5'end	198 b	pUC-5'-Ende	Pan5vT7 oder Pan5vT7GG und 6072_long	AGAGCAAUUG UGUCAGAAUU UUGUUCAUAA UCAAACCUCA CUUAGAAAAU CACAAUACUG UAAUAAGAAC ACAGUACCAA UAACCAUAAU GUCUUCAAAGU GUUUUAGAGU CGAUCAUUCA GACAAGAGCU UCAGUCUGGG GAUCAACUGC AUCUGGUAAA CGUCUUGUAG AUUCUUCACG GAUUCUUGAA CUUGGUAC
3'end	198 b	pUC-3'-Ende	3endGGG5T7 und Pan3v	GGGCAAAGCA ACAUAGCUUU CCUUGAGAG CUUAACCUUA GACAUGAUGA UUGUAGAGU UGUUAUAUGC UUUGACCGUA UGUUAUUCAA GGUCGAAAG UGCAACUCUG UAUUCCGCAG UCGUUUCUUA GGGUUUUAAU GUGAUGAUUU GUAAGACUGA GUGUUAAAGU AUGAACACAA AAUUGACACG AUUGCUCU GGGCGAATTG GAGCTCCACC GCGGTGGCGG CCGTCTAGA ACTAGTGGAT CCCCCGGGCT GCAGGAATTC GATATCAAGC TTATCGATAC CGTCGACCTC GAGGGGGGGC CCGGTACCCA
KS	120 b	pBluescript II KS	T7-22mer und KS_left	GGGCGAATTG GGTACCGGGC CCCCCCTCGA GGTGCACGGT ATCGATAAGC TTGATATCGA ATTCCTCGAG CCCGGGGGAT CCACTAGTTC TAGAGCGGCC GCCACCGCGG TGGAGCTCCA
SK	120 b	pBluescript II SK	T7-22mer und SK_left	UAAAUUACCC GCAAUUGCAU UAUCGUUUUG CCAUCAAAAGU GUGGUUCGUU UCAUCAACAU CUCGUCGCAU GAUUGGGUGU AUGGGGCCAG UGUUGUUUUU GGUAUGGAAA UUGAUUGGUG AGAAUUGAAU CUUCUCACCA UGAGUUUUCC AGGGGAUAAG CUCGGUGCUA CAG
BaYMV RNA 2	173 b	pBS K BY35 = pBS-SY ₃₀₅₀₋₃₄₄₉ , <i>Nhe</i> I geschnitten	IVT direkt auf die Phenol/Chloroform extrahierte Plasmid DNA (ohne PCR)	AGAGCAAUCG UGUCAAUUUU GUGUUCAUAC CUUAACACUC AGUCUUACAA AUCAUCACAU UAAAACCCUA AGAAACGACU GCGGAAUACA GAGUUGCACU UUCGCACCUU GAAUUACAUA CGGUCAAAGC AUUAACAAC UUCUCAAAUC AUCAUGUCUA AGGUUAAGCU CACUAAGGAA AGCAUUGUUG CUUUGUUG
5'endvc	198 b	pUC-3'-Ende	5end_vc T7_2 oder 5end_vc T7GG_2 und 5end_vc_1	GUACCAAGUU CAUGAAUCCA GUAAGAAUCU ACAACAGCUU UACCAGAUGC AGUUGAUCC CAGACUGAAG CUCUUGUCUG AAUGAUCGAC UCAUAAACAC UUGAAGACAU UAUGGUUAUU GGUACUGUGU UCUUUAUACA GUUUUGUGAU UUUCUAAGUG AGGUUUUAUU AUGAACAAAA UUCUGACACA AUUGCUCU
3'endvc	198 b	pUC-5'-Ende	3end_vc T7_2 oder 3end_vc T7G_2 und 3end_vc_1	GGACUUAGAA AAUCACAUAU CUGUAUAUAG AACACAGUAC CAAUAACCAU AAUGUCUUCA AGUGUUUAUG AGUCGAUCAU UCAGACAAGA GCUUCAGUCU GGGGAUCAAC UGCAUCUGGU AAAGCUGUUG UAGAUCUUA CUGGAUUCAU GAACUUGGUA CUGGUUCUCU ACUAGUUCAA ACCCAGCUGU AUUCUGAU GGCCAUAAC CAUAAUGUCU UCAAGUGUUU AUGAGUCGAU CAUUCAGACA AGAGCUUCAG UCUGGGGAUC AACUGCAUCU GGUAAAGCUG UUGUAGAUUC UUACUGGAUU CAUGAACUUG GUACUGGUUC UCUACUAGUU CAAACCCAGC UGUAUUCUGA UUCAAGAAGC AAAAGUAGCU UUGGCUAUAC UGCAAAGG ACUUAGAAAA UCACAAUACU GUAUAAGAA CACAGUACCA AUAA
Hairpin_40-83	44 b	Die IVTs wurden direkt	Hairpin40 und Hairpin83	ACUUAGAAAA UCACAAUGCC GCAAUAAGAA CAAAUUACCA AUAA
Hairpin_40-83mut	44 b	auf Oligonukleotid-	Hairpin40mut und Hairpin83mut	ACUUAGAAAA UCACAAUGCC GCAAUCAGAA CAAAUUACCA AUAA
Hairpin_40-83mut2	44 b	Dimeren durchgeführt.	Hairpin40mut2 und Hairpin83mut2	ACUUAGAAAA UCACAAUGCC GCAAUCAGAA CAAAUUACCA AUAA

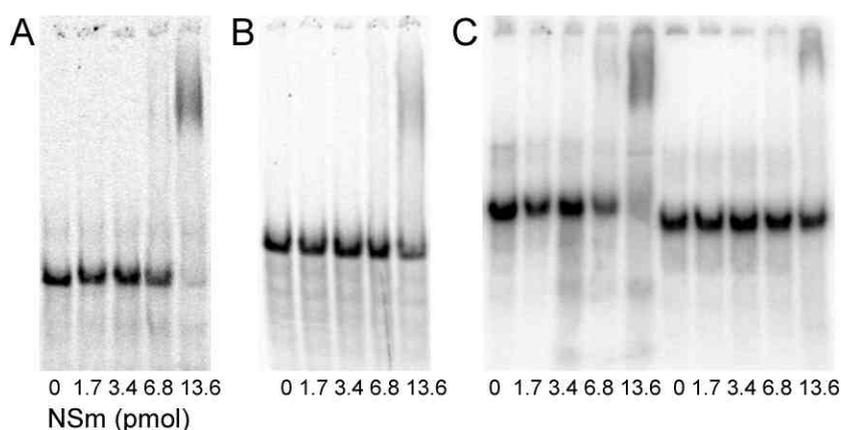
3.8 Gel-Retardations-Assays (GEMSAs)

3.8.1 Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaften des TSWV NSm Proteins

Die in diesem Unterkapitel erwähnten Daten wurden zum Teil bereits publiziert (Soellick *et al.* 2000). Das (His)₆-NSm Protein wurde von Tim Söllick exprimiert, denaturierend gereinigt und durch schrittweise Dialyse renaturiert (Soellick 2000).

Die RNA-Bindungseigenschaften des TSWV Movementproteins NSm wurden mittels Gel-Retardations-Assays (GEMSAs = "Gel Electrophoretic Mobility Shift Assays") auf nativen 4% Polyacrylamid-Gelen untersucht. Dazu wurden radioaktiv markierte RNA und unmarkiertes Protein verwendet (vgl. Kapitel 2.2.16 und 2.2.17). Die Komplexbildung führt zu einer Veränderung der Laufgeschwindigkeit, da sich Masse und Ladung gegenüber der freien RNA ändern.

Sowohl TSWV-Transkripte als auch Kontroll-RNAs (BaYMV RNA 2, KS RNA) bildeten Komplexe mit dem rekombinanten TSWV NSm Protein, was zur Entstehung von Banden mit niedrigerer elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit führte. Die Abbildung 3.7 (A) zeigt eine Interaktionsstudie von NSm mit der panS RNA. Hier tritt Retardation (Komplexbildung) ab einer



Proteinmenge von 6.8 pmol ein. Bei der doppelten Menge an NSm ist deutlich ein hochmolekularer Komplex zu erkennen, und die Bande freier RNA ist fast vollständig verschwunden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem BaYMV RNA 2 Transkript erhalten (Abb. 3.7, (B)). Hier zeigten sich Banden mit niedrigerer Migrationsgeschwindigkeit ebenfalls ab 6.8 pmol NSm Protein, jedoch war bei 13.6

Abb. 3.7 Gel-Retardations-Assays mit rekombinantem (His)₆-NSm Protein. Das Movementprotein NSm zeigt eine allgemeine ssRNA-Bindungsfähigkeit und hat nur eine schwache Affinität zu dsRNA. Die RNA-Substrate waren mit [³³P]UTP (A, B) oder [³²P]CTP (C) markiert und die gebildeten Komplexe wurden auf nativen 4% Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

(A) panS RNA **(B)** BaYMV RNA 2 **(C)** Spuren 1-5, KS RNA; Spuren 6-10, dsRNA (KS und SK RNA 1:1 hybridisiert)

pmol Protein noch deutlich freie RNA sichtbar. Auch einzelsträngige RNA von pBluescript (KS) wurde von NSm gebunden (Abb. 3.7, (C), Spuren 1-5). Doppelsträngige RNA (KS und SK RNA in äquimolaren Mengen hybridisiert) hingegen wurde von den gleichen Mengen an NSm kaum gebunden (Abb. 3.7, (C), Spuren 6-10).

3.8.2 Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaften des TSWV N Proteins mit C-terminaler (His)₆-Fusion

TSWV N Protein mit einer C-terminalen (His)₆-Fusion wurde wie in den Kapiteln 2.2.5 bis 2.2.8 beschrieben in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Ausser dem Wildtyp Protein wurden auch die ebenfalls mit dem Vektor pQEC (Minke 1998) exprimierten Punktmutanten N F242A und N F246A in GEMSAs eingesetzt. Die Doppelpunktmutante N F242_246A konnte mit diesem Vektor nicht exprimiert werden (vgl. Tabelle 3.1).

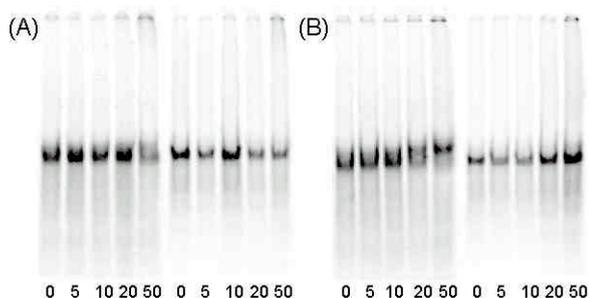


Abb. 3.8 Gel-Retardations-Assays mit N(His)₆ wt (A) und N(His)₆ F242A (B) Protein. In der linken Hälfte wurde jeweils mit 5'end RNA inkubiert, in der rechten Hälfte mit 3'end RNA. Die Zahlen unterhalb der Spuren geben die pmol Protein an.

Die Abbildung 3.8 zeigt GEMSA, welche mit pQEC-exprimierten Proteinen mit C-terminaler (His)₆-Fusion gemacht wurden. In (A) wurde N-(His)₆ wt verwendet, in (B) N-(His)₆ F242A. Sowohl in (A) als auch in (B) wurde jeweils in der linken Hälfte mit 5'end RNA und in der rechten Hälfte mit 3'end RNA inkubiert. Die Zahlen unterhalb der Spuren geben die verwendeten Proteinmengen in Picomol an. Ein Vergleich zwischen (A) und (B) zeigt, dass weniger N-(His)₆ F242A Protein für eine Retardation notwendig ist als N-(His)₆ wt (z.B.

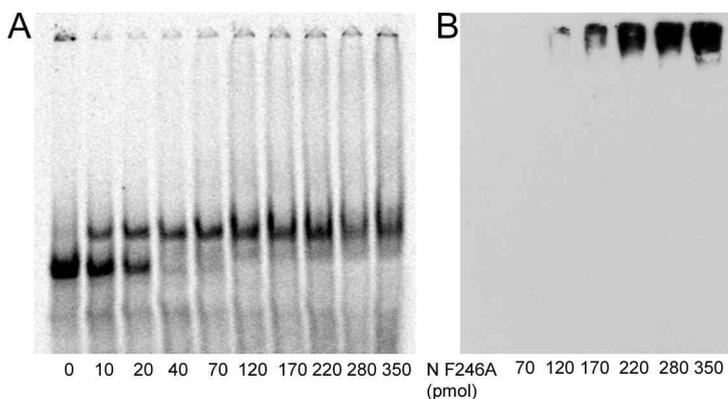
20 pmol N(His)₆ wt & 5'end vs. 20 pmol N(His)₆ F242A & 5'end). In (B) ist auch deutlich zu erkennen, dass das N(His)₆ F242A Protein eine höhere Affinität zur 5'end RNA besitzt als zur 3'end RNA. Eine Retardation tritt mit dem 5'end Konstrukt bei weniger Protein ein als mit der 3'end RNA. Es fällt auch auf, dass bei Inkubation mit der 5'end RNA eine neue, langsamer migrierende Bande entsteht, währenddem die Komplexe, welche mit der 3'end RNA gebildet werden, ganz verschwinden.

Das Kontrollprotein BSA besass im Gel-Retardations-Assay keine RNA-Bindungsfähigkeit (vgl. Abbildung 7.2 (A) im Anhang). In der gleichen Abbildung findet man ausserdem einige weitere GEMSA, welche mit Proteinen mit C-terminaler Hexahistidin-Fusion gemacht wurden. Um eine bessere Lesbarkeit dieses Unterkapitels zu erreichen, werden diese Bilder im Anhang gezeigt. Zusammenfassend wurden folgende Beobachtungen gemacht: Erstens zeigten sowohl das TSWV Wildtyp N Protein als auch die Mutanten N-(His)₆ F242A und N-(His)₆ F246A eine generelle ssRNA-Bindungsfähigkeit. Zweitens wurde dsRNA von keinem der Proteine gebunden, auch nicht bei sehr hohen Proteinmengen. Drittens zeigten alle getesteten Proteine mit C-terminaler (His)₆-Fusion (N wt, N F242A und N F246A) eine höhere Affinität zur 5'end RNA als zur 3'end RNA. Die Bindung der 5'end RNA durch das N Protein oder eine N Protein Mutante führte zu einer Retardation der radioaktiven Bande, währenddem die Interaktion mit der 3'end RNA bei höheren Proteinmengen direkt zu einem Verschwinden des Signals bzw. der Bildung von nicht mehr ins Gel

einlaufenden Komplexen führte. Viertens reichten verglichen mit dem Wildtyp N Protein geringere Mengen an N-(His)₆ F242A oder N-(His)₆ F246A aus, um RNA zu retardieren.

Zugabe von N Protein zum „Mini-Panhandle“ Konstrukt panS bewirkte die Umwandlung einer rasch wandernden RNA-Bande in eine langsamer migrierende Form (Abb. 3.9, (A)). Im Gegensatz zur oben beschriebenen Mobilitätsänderung der 5'end RNA fand keine eigentliche Retardation statt, sondern ein scharfer Übergang. Auch in diesem Fall zeigte sich, dass geringere Mengen an mutiertem N Protein (N-(His)₆ F242A oder N-(His)₆ F246A) als von Wildtyp N Protein ausreichten, um die Umwandlung zu erzeugen.

Es sollte geprüft werden, ob sich in der beschriebenen langsam wandernden Bande von panS N Protein nachweisen lässt. Dazu wurden zwei identische GEMSAs parallel gefahren und einer davon geblottet. Der nicht geblottete Gel-Retardations-Assay ist in Abbildung 3.9 (A) dargestellt. Mit einem polyklonalen Antikörper gelang es nur, das N F242A-(His)₆ Protein ab einer Gesamtmenge von 120 pmol in den Geltaschen nachzuweisen (Abb. 3.9, (B)). Dies schliesst jedoch die Anwesenheit von N F242A Protein auf Höhe der langsam wandernden panS-Bande



nicht aus, da vielleicht die Sensitivität des Immunoblots zu niedrig war, um dieses nachzuweisen.

Abb. 3.9 Gel-Retardations-Assays mit pQEC-N F246A und [α -³³P]UTP markierter panS RNA (A) sowie Immunoblot eines identischen Retardations-Assays (B). Es wurden gegen das TSWV N Protein gerichtete Antikörper verwendet.

Die Strukturumwandlung von panS

warf die Frage auf, ob dieser Effekt spezifisch auf das N Protein zurückzuführen ist oder ob auch andere Proteine dazu fähig sind. Daher wurden GEMSAs mit folgenden Kontrollproteinen durchgeführt: (1) GFP-S65C mit einer N-terminalen (His)₆-Fusion (Reichel *et al.* 1996), (2) pET16b-ARF1 mit N-terminaler (His)₁₀-Fusion (Uhrig 1996) aus *Catharanthus roseus*, (3) CAT-GFP mit N-terminaler (His)₆-Fusion und (4) CAT-GFP ohne Modifizierung. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 3.10 zusammengefasst. In (A) wird gezeigt, wie pET16b-ARF1 mit N-terminaler (His)₁₀-Fusion die Laufeigenschaften der BaYMV RNA veränderte. Für dieses Protein ist weder eine RNA-Bindungseigenschaft beschrieben noch vermutet. In (B) sieht man, wie das gleiche Protein die Mobilität der panS RNA beeinflusste. Bereits bei 10 pmol Protein wurde ein Teil der RNA in eine langsamer migrierende Form umgewandelt. Bei 20 pmol Protein war die gesamte RNA umgewandelt und ab 70 pmol Protein begann die RNA weiter nach oben zu schmieren. Ein ähnliches Ergebnis ist in (C) gezeigt. Hier veränderte CAT-GFP mit N-terminaler (His)₆-Fusion die Laufeigenschaften der panS RNA. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Polyhistidin-Fusion mit der RNA interagiert und so eine Retardation verursachte. CAT-GFP ohne (His)₆-Fusion wurde in gereinigter Form freundlicherweise von Guido Jach (MPIZ, Köln) zur

Verfügung gestellt. In (D) und (E) sieht man dessen Einfluss auf die Laufeigenschaften von panS. Abbildung 3.10 (D) entstand aus einer Überlagerung des Autoradiogramms (schwarz-rot) mit der optisch detektierten GFP-Fluoreszenz (hier weiss dargestellt). In Abbildung (E) ist das GFP-Signal alleine unter UV-Licht gezeigt. Ab einer Proteinmenge von ca. 100 pmol lag die RNA teilweise in einer langsamer migrierenden Form vor. Im Gegensatz zum Experiment in (C), bei dem das GFP eine (His)₆-Fusion trug, fand in diesem Fall allerdings keine eigentliche Retardation zu höhermolekularen Komplexen hin statt, sondern nur eine scharfe Umwandlung. Die Polyhistidin-Fusion von (His)₁₀-ARF1 und (His)₆-CAT-GFP scheint also nicht für die Entstehung der neuen, scharfen Bande verantwortlich zu sein, sondern für die langsame Retardation, wie sie in (B) und (C) bei Proteinmengen grösser als 40 pmol unter Verwendung der panS RNA besonders schön zu

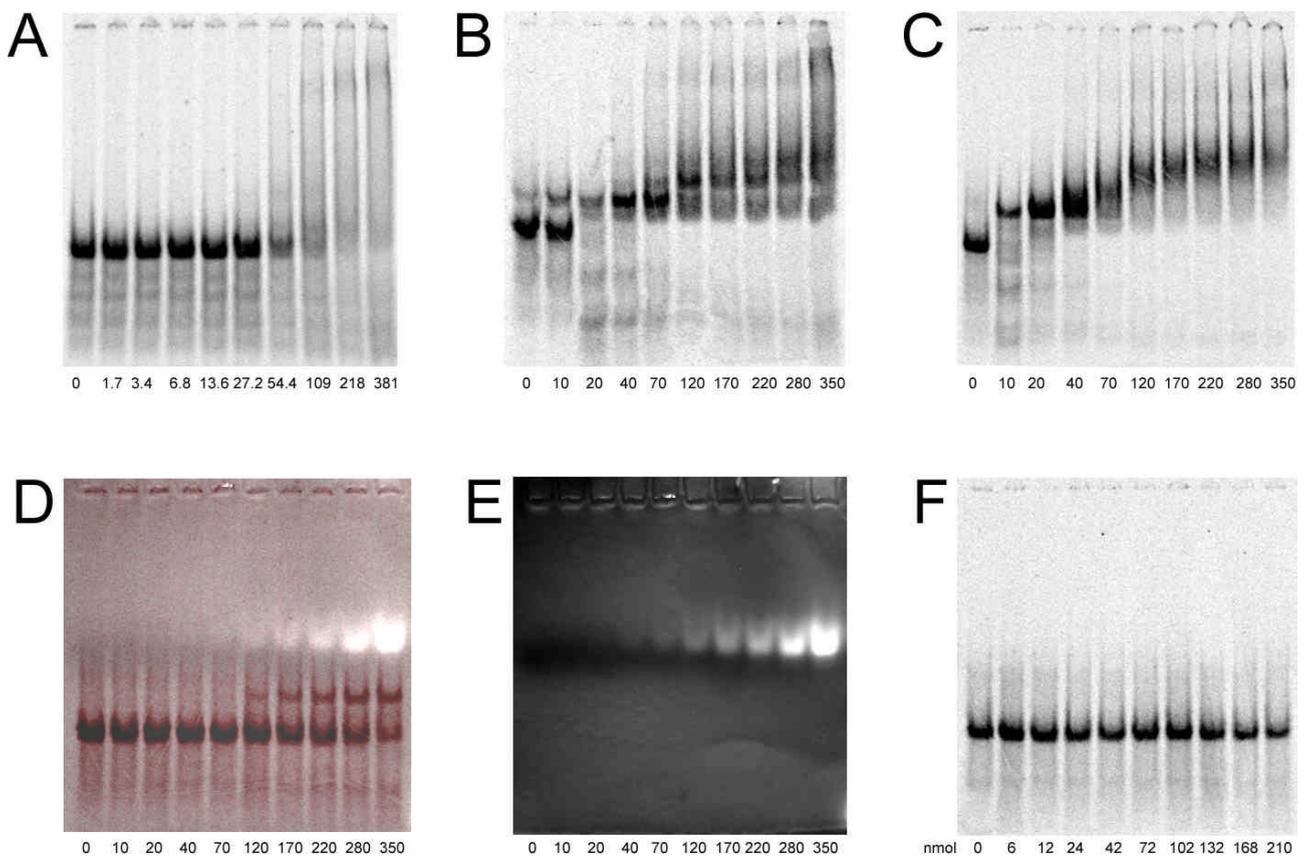


Abb. 3.10 Protein – RNA Interaktionsstudien mit nichtviralen Proteinen.

- (A) (His)₁₀-ARF1 mit BaYMV RNA 2
 (B) (His)₁₀-ARF1 mit panS
 (C) (His)₆-CAT-GFP mit panS RNA
 (D), (E) CAT-GFP ohne (His)₆-Fusion mit panS RNA
 (F) L-Histidin mit panS (Mengenangaben in nmol)

Abbildung (D) ist eine Überlagerung des Gel-Retardations-Assays (schwarz: Radioaktivität) mit einer UV-Aufnahme desselben Gels (weiss: GFP-Fluoreszenz). In (E) ist nur die GFP-Fluoreszenz gezeigt. Mit Ausnahme von (F) wurden die geladenen Proteinmengen in pmol angegeben.

sehen ist. In (F) schliesslich wird gezeigt, dass selbst grosse Mengen (bis 210 nmol wurden getestet) der Aminosäure L-Histidin die Laufeigenschaften der panS RNA nicht beeinflussten. Es wurde also eine unspezifische RNA-Bindungseigenschaft von zwei Proteinen mit N-terminaler Polyhistidin-Fusion gefunden, welche in der Literatur nicht mit RNA-Bindung in Verbindung

gebracht werden. Dies ist ein erstaunliches Ergebnis, wenn man bedenkt, dass die meisten publizierten Protein – RNA Interaktionsstudien mit polyhistidin-fusionierten Proteinen durchgeführt wurden. Mit der panS RNA konnten zwei unterschiedliche Retardationen festgestellt werden: Eine bereits bei niedrigen Proteinmengen auftretende, welche zu einer langsamer migrierenden, scharfen Bande führte sowie einen „Schmier“ bei grösseren Proteinmengen, welcher mit dem Vorhandensein einer Polyhistidin-Fusion in Verbindung zu stehen scheint.

3.8.3 Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaften des unmodifizierten TSWV N Proteins

Auf Grund der in Kapitel 3.8.2 beschriebenen unspezifischen Interaktionen zwischen Kontrollproteinen mit (His)₆-Fusion und RNA musste ein Weg gefunden werden, TSWV N Protein und Mutanten ohne Modifizierung zu reinigen. Eine Beschreibung der Methodik ist in Kapitel 2.2.6 nachzulesen. Proteine wurden mit einer N-terminalen (His)₆-Fusion exprimiert, welche über eine Thrombin-Schnittstelle entfernt werden konnte. Das resultierende N Protein besass eine dem im Tomato Spotted Wilt Virus vorkommenden N Protein sehr ähnliche Aminosäuresequenz. Einzig die sieben Aminosäuren GSHMAMD am N-Terminus unterschieden die mit dem Plasmid pET28a exprimierten und mit Thrombin geschnittenen Proteine vom TSWV Wildtyp Protein. Die ebenfalls aufgereinigten Mutanten wurden in Kapitel 3.1 vorgestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird eine grössere Anzahl GEMSA's erst im Anhang gezeigt (Abb. 7.3).

Bei den Gel-Retardations-Assays mit N Protein ohne (His)₆-Fusion verschwanden die Protein-RNA Komplexe meist vollständig (Abb. 3.11), was auf den hohen isoelektrischen Punkt von N zurückgeführt wurde. Aus Experimenten mit der Doppelpunktmutanten F242_246A ohne (His)₆-Fusion ging hervor, dass tatsächlich Komplexe entstanden und nicht etwa RNase in den Proteinpräparationen vorhanden war (z.B. Abb. 7.3 (Q)). Hier konnten Komplexe in den

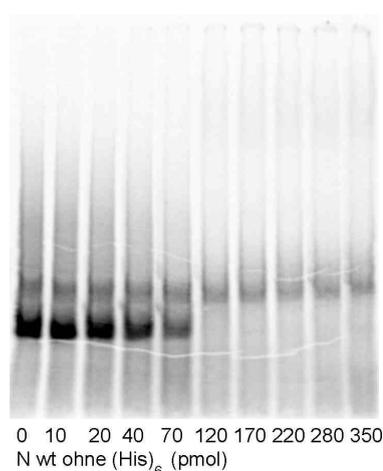


Abb. 3.11 GEMSA mit wt N Protein ohne (His)₆ und panS RNA. Die Bande grösserer Mobilität wird spezifisch gebunden.

Geltaschen detektiert werden. Ausserdem konnten in einem Experiment, bei dem die Polarität der Gelkammer vertauscht wurde, bei hohen Proteinmengen Komplexe gesehen werden, die jedoch kaum ins Gel einliefen. Bei Verwendung von N Protein mit C-terminaler (His)₆-Fusion hingegen wurden die Protein-RNA Komplexe zum Teil nicht vollständig nach oben verschoben, sondern waren auch als langsamer wandernde Bande zu sehen (vgl. Kap. 3.8.2). Dies wurde vor allem bei Verwendung der panS und 5'end RNA beobachtet. Auch die BaYMV RNA 2 zeigte diesen Effekt (Abb. 7.2 (B)).

Die „Panhandle“-Konstrukte panS und panSvc kamen stets in zwei Formen vor (Abb. 3.11 und Abb. 7.3, (C), (D), (G), (L), (M) und (Q)). Dabei handelte es sich um zwei Faltungszustände, da die *in vitro*

Transkripte bei (denaturierenden) Analysen mit dem Agilent Bioanalyzer nur als eine diskrete

Bande zu detektieren waren. Die rascher wandernde Form hatte stets eine wesentlich höhere Affinität zum N Protein als die langsamer migrierende. Dasselbe galt für die Proteinmutanten. Im Gegensatz zum N Protein mit C-terminaler (His)₆-Fusion fand jedoch keine Umwandlung der kompakteren Form von panS in die langsamer migrierende statt. Der kompaktere Faltungszustand von panS und panSvc migrierte rascher als die ebenfalls 198 Basen langen Konstrukte 5'end, 3'end, 5'endvc und 3'endvc. Die an einem Ende um 24 Basen verkürzten Konstrukte panS5'-24 und panS3'-24 hingegen bildeten nur eine Bande aus.

Aus den Experimenten mit unmodifizierten Proteinen gingen folgende Beobachtungen hervor: Erstens waren alle verwendeten Proteine in der Lage, mit ssRNA zu interagieren, und zwar auch mit RNA nichtviralen Ursprungs (Abb. 7.3, (R)). Zusätzlich zu den Mutanten F242A und F246A wurden auch N Δ 22, N Δ 39 und N F242_246A getestet. Obwohl N Δ 26 nach denaturierender Reinigung erfolgreich zurückgefaltet werden konnte (vgl. Tabelle 3.1), wurde es nicht in GEMSA's eingesetzt, da es im BN-PAGE keine sauberen Banden zeigte, was als teilweise Fehlfaltung interpretiert wurde. Zweitens wurde dsRNA nicht gebunden (Abb. 7.3, (F)). Drittens wurde eine höhere Affinität zum 5' Ende als zum 3' Ende oder nichtviralen Kontroll-RNAs beobachtet, und zwar unabhängig ob es sich beim Protein um Wildtyp N oder um eine Mutante handelte (Abb. 7.3, (A) und (B), (J) und (K), (O) und (P)). Zur schneller wandernden Bande von panS wurde eine vergleichbar hohe Affinität beobachtet. Das Konstrukt panS3'-24 wurde bei niedrigeren N Protein Mengen retardiert als panS5'-24 (Abb. 7.3, (H) vs. (I)). Viertens wurde festgestellt, dass - verglichen mit dem Wildtyp N Protein - geringere Mengen an N F242A oder N F246A Mutante für eine Retardation ausreichten (Abb. 7.3, (K) bis (N)). Besonders deutlich wurde dieses Phänomen bei Verwendung der Mutanten N F242_246A (Abb. 7.3, (O) bis (Q), (S), (T)). Die Mutante N Δ 22 hingegen zeigte ein ähnliches RNA-Bindungsverhalten wie das Wildtyp N Protein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich am 5' Ende der TSWV S RNA eine mit überdurchschnittlich hoher Affinität gebundene Sequenz bzw. Sekundärstruktur befindet. Die 5' terminalen 24 Nukleotide scheinen zur Ausbildung dieser Sekundärstruktur notwendig zu sein, nicht aber die terminal komplementären Sequenzen am 3' Ende der S RNA, welche zur Bildung einer „Panhandle“ vorhanden sein müssten. Verglichen mit dem Wildtyp N Protein führten N Protein Mutanten mit eingeschränkter Fähigkeit zur Homopolymerisierung bereits bei niedrigerer Proteinmenge zu einer Retardation im nativen Gel.

Die Gel-Retardations-Assays wurden mit dem Programm ImageQuant™ 5.1 (Molecular Dynamics) quantifiziert. Mit den Daten wurden Hill-Transformationen durchgeführt, d.h. es wurde $\log\left[\frac{1-x}{x}\right]$ (Ordinate) gegen $\log(N)$ (Abszisse) aufgetragen, wobei x das Verhältnis $\frac{[RNA]}{[RNA]_{tot}}$ ist, also die gemessene RNA-Menge dividiert mit der gesamten RNA. Die gesamte RNA wurde durch Quantifizierung der freien RNA-Bande in der ersten Spur bestimmt. Durch die erhaltenen Punkte wurde eine Trendlinie (Regressionsgerade) gelegt, deren Steigung den Hill-Koeffizienten angibt. Dieser Koeffizient gibt Auskunft über die Kooperativität einer Bindung. Die Dissoziationskonstante K_d ist gleich der Proteinkonzentration, bei der halb-maximale Bindung erreicht wird ($\frac{1}{2} V_{max}$). Sie ist

ein Mass dafür, wie gut ein Ligand an ein Makromolekül (in diesem Fall das N Protein an die RNA) bindet: Liganden mit einem niedrigen K_d -Wert binden stark, Liganden mit einem hohen K_d schwach.

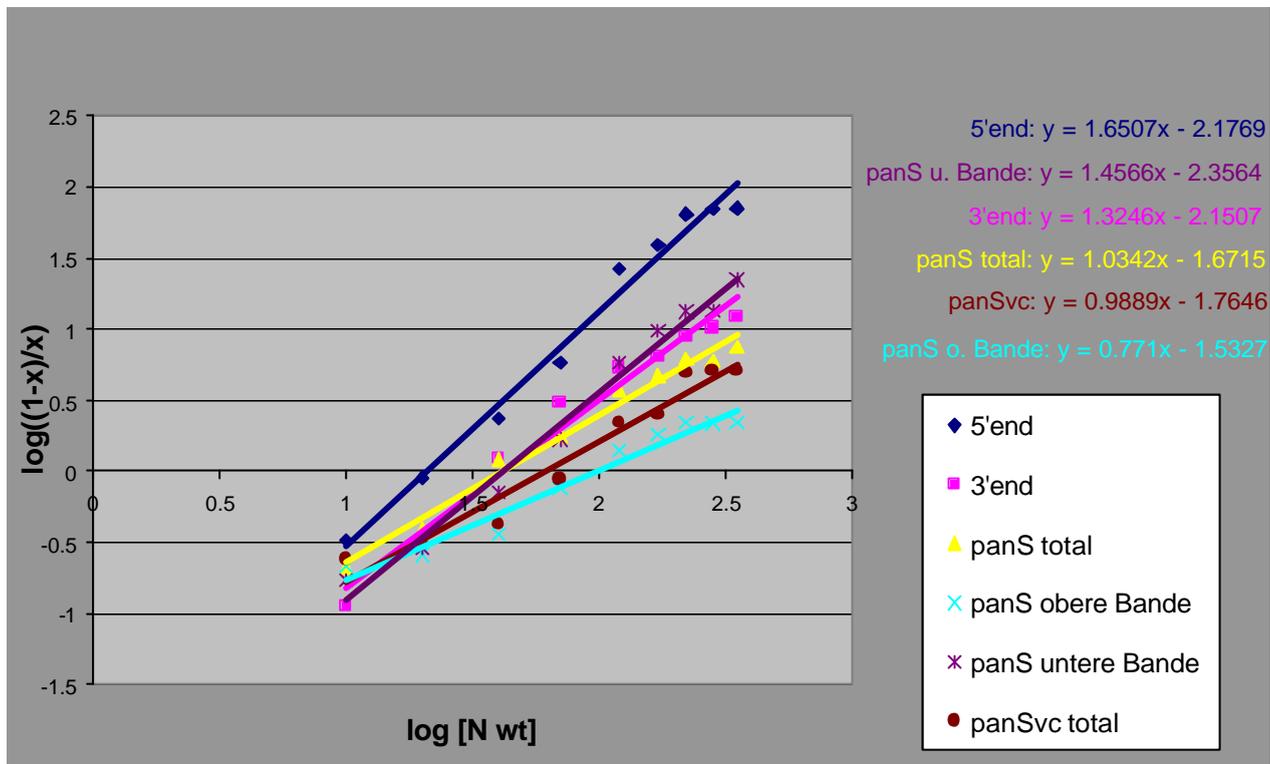


Abb. 3.12 Hill-Diagramm: Auswertung der Gel-Retardations-Assays mit Wildtyp N Protein. Die Steigung der Geraden gibt den Hill-Koeffizienten und damit die Kooperativität der Protein – RNA Bindung an.

Die Abbildung 3.12 zeigt ein Hill-Diagramm, das aus der Analyse von GEMSAs mit Wildtyp N Protein (ohne $(\text{His})_6$ -Fusion) gewonnen wurde. Aus der Steigung der Geraden lässt sich direkt der Hill-Koeffizient und damit die Kooperativität der Bindung bestimmen. Ein Hill-Koeffizient grösser als 1 beschreibt eine kooperative Bindung. Die Auswertung sämtlicher Hill-Diagramme findet man in Tabelle 3.6. Dabei sollte die Anzahl der durchgeführten Experimente (in Klammern) beachtet werden. Die zuverlässigsten Daten wurden für das Wildtyp N Protein und die RNA-Substrate 5'end, 3'end und panS gewonnen. Die grössten Hill-Koeffizienten wurden im allgemeinen für GEMSAs mit der 5'end RNA sowie den jeweils unteren (schneller migrierenden) Banden von panS und panSvc berechnet. Auch für das Konstrukt panS3'-24 wurden hohe Hill-Koeffizienten berechnet. Allerdings wurde dieses nur in drei Experimenten getestet. Am wenigsten Protein zur Erreichung einer halbmaximalen Bindung wurde im allgemeinen bei Verwendung des 5'end Konstruktes benötigt. Für die pBluescript-Transkripte KS und SK wurden niedrige Hill-Koeffizienten und hohe Proteinmengen für halbmaximale Bindung berechnet, das heisst sie wurden schlecht gebunden. Die niedrigste Dissoziationskonstante wurde für die 5'end RNA gefunden. Für die unteren Banden von panS und panSvc wurden ebenfalls niedrige K_d -Werte berechnet. Die niedrigste überhaupt wurde für die Bindung der 5'end RNA an N F242_246A (ohne Polyhistidin-Fusion) errechnet. Die Quantifizierung der GEMSAs unterstützt die bereits beschriebene

Beobachtung der präferentiellen Bindung einer Sequenz am 5' Ende der TSWV S RNA. Für die meisten viralen RNA-Konstrukte wurde eine kooperative Bindung durch das N Protein gefunden.

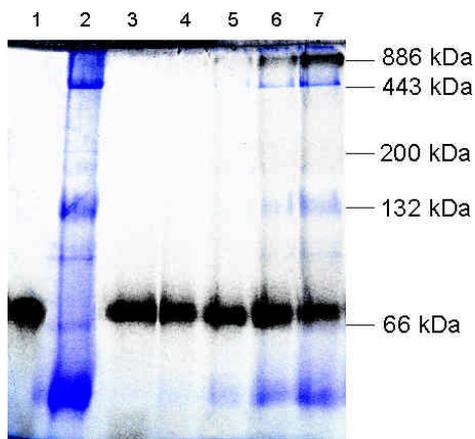
Tabelle 3.6 Auswertung der aus Gel-Retardations-Assays berechneten Hill-Diagramme und Bindungskurven. Die blauen Zahlen geben die Hill-Koeffizienten an, die halbmaximale Bindung (in pmol Protein) wird durch rote Zahlen repräsentiert und die Dissoziationskonstanten K_D (in μM) sind in grün angegeben. Die letzte Zahl in Klammern gibt die Anzahl Experimente an, welche in die Berechnungen einfließen.

RNA-Konstrukt		RNA-Konstrukt															
		5'end	3'end	panS total	panS obere Bande	panS untere Bande	panSvc total	panSvc obere Bande	panSvc untere Bande	panS 3'-24	panS 5'-24	5'end vc	3'end vc	KS	SK		
p r o t e i n	N wt ohne (His) ₆ -	1.65	1.32	1.03	0.77	1.46	0.99	0.63	1.56								
	Fusion	23	37	40	92	52	77	280	65								
	N N?22 ohne (His) ₆ -	1.15	1.85	2.60	4.60	2.00	3.85	14.00	3.25								
	Fusion	(9)	(5)	(6)	(6)	(6)	(1)	(1)	(1)								
	N N?22 ohne (His) ₆ -	1.75	1.37	1.41	1.09	1.86	1.49	0.93	2.37						0.78	0.85	
	Fusion	19	30	31	55	27	91	145	74						213	216	
	N F242A ohne (His) ₆ -	0.95	1.50	2.07	2.75	1.35	4.55	7.25	3.70						10.7	10.8	
	Fusion	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)						(1)	(1)	
	N F242A ohne (His) ₆ -	1.43	0.88	0.73	0.58	0.95	0.92	0.89	1.02	0.89	0.82				0.78	0.86	
	Fusion	19	94	33	57	27	40	290	31	68	102				236	362	
	N F246A ohne (His) ₆ -	0.95	4.70	1.65	2.85	1.35	2.00	14.50	1.55	3.40	5.1				11.8	18.1	
	Fusion	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)				(1)	(1)	
	N F242_246A ohne (His) ₆ -	2.56	1.67	1.12	1.00	1.43	1.56	1.50	1.63	2.03	1.50						
	Fusion	24	27	19	59	18	31	207	24	25	28						
	N F242_246A ohne (His) ₆ -	1.81	1.35	1.42	1.57	2.41	1.61	1.06	2.13			1.60	1.62	1.39	1.54		
	Fusion	10	14	27	94	13	40	227	37			28	14	102	110		
	N N?39 ohne (His) ₆ -	0.50	0.70	1.35	4.70	0.65	2.00	11.35	1.85			1.40	0.70	5.10	5.50		
	Fusion	(5)	(3)	(2)	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)			(4)	(2)	(1)	(1)		
	N N?39 ohne (His) ₆ -	2.03	0.36	1.59	1.46	1.66	1.35	1.28	1.68	1.54	0.99						
	Fusion	17	220	22	68	19	25	100	21	33	53						
		0.85	11	1.10	3.40	0.95	1.25	5.00	1.65	2.65							
		(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)							

3.8.4 Analyse von Protein – RNA Komplexen mittels BN-PAGE

Es wurde versucht, die beiden Techniken BN-PAGE (vgl. Kap. 2.2.11) und GEMSA (vgl. Kap. 2.2.17) zu kombinieren. Der Vorteil dieser neuartigen Methode sollte darin bestehen, dass sowohl die RNA (radioaktiv) als auch das Protein (mit Coomassie gefärbt) gleichzeitig sichtbar gemacht werden können. Die Idee war, das Verschwinden einer oder mehrerer Proteinbanden (Multimerisierungszustände) in Zusammenhang mit dem Auftreten einer RNA-Retardation (Protein – RNA Komplexbildung) zu bringen. Abbildung 3.13 zeigt eine Interaktionsstudie von N F242_246A Protein (ohne (His)₆-Fusion) mit panS RNA in einem 5-18% BN-PAGE Gradientengel. Bei diesem Bild handelt es sich um ein Komposit: Das Coomassie-gefärbte Protein ist blau sichtbar und das Autoradiogramm mit der [α -³³P]UTP markierten RNA (schwarz) wurde überlagert. In Spur (1) wurden 0.6 pmol panS RNA (ohne Protein) geladen. Die radioaktive RNA ist als eine einzige Bande zu sehen. Spur (2) zeigt das Bandenmuster von 2.5 nmol N F242_246A Protein ohne (His)₆-Fusion. Man erkennt den dominanten Monomer-Anteil und ausserdem einen höhermolekularen Komplex, welcher vermutlich einem Tetramer entspricht. Die Spuren (3) bis (7) wurden jeweils mit 0.3 pmol panS RNA und ansteigenden Mengen N F242_246A Protein geladen. Ab einer Proteinmenge von 250 pmol erkennt man ein Komplex von ca. 900 kDa, der bei 1000

pmol N F242_246A Protein deutlich zu sehen ist. Allerdings konnte keine Veränderung im Bandenmuster des Proteins gefunden werden. Somit kann nicht direkt aus der Abbildung auf den



Multimerisierungszustand des Proteins geschlossen werden, welcher mit der RNA interagiert. Dies liegt daran, dass die Bedingungen für Protein – RNA Interaktionen in der BN-PAGE nicht so günstig sind wie in klassischen GEMSA's. Es musste wesentlich mehr Protein eingesetzt werden (ca. Faktor 100), um eine Retardation zu beobachten. Dies liegt vermutlich an den leicht denaturierenden Bedingungen (0.5 M 6-Aminocaprinsäure).

Abb. 3.13 Protein – RNA Interaktion in einem 5-18% BN-PAGE Gradientengel. Es wurde panS RNA mit N F242_246A (ohne (His)₆-Fusion) inkubiert:

- (1) 0.6 pmol panS RNA, ohne Protein
- (2) 2.5 nmol N F242_246A, ohne RNA
- (3) 0.3 pmol panS RNA, 50 pmol N F242_246A
- (4) 0.3 pmol panS RNA, 100 pmol N F242_246A
- (5) 0.3 pmol panS RNA, 250 pmol N F242_246A
- (6) 0.3 pmol panS RNA, 500 pmol N F242_246A
- (7) 0.3 pmol panS RNA, 1000 pmol N F242_246A

Als Grössenstandards dienten Apoferritin (443 / 886 kDa), β -Amylase (200 kDa) und BSA (66 / 132 kDa). Die panS RNA besitzt ein Molekulargewicht von 67.0 kDa.

3.9 Filterbindungsversuche mit Protein - RNA Komplexen

Mit Filterbindungsversuchen konnten Protein – RNA Bindungsstudien im 96 Loch-Format durchgeführt und rasch quantifiziert werden. Die Inkubationsbedingungen waren die gleichen wie bei den Gel-Retardations-Assays. In Abbildung 3.14 wird die Auswertung von sieben Dot Blot-Experimenten mit Wildtyp N Protein ohne (His)₆-Fusion und zehn verschiedenen RNA-Substraten gezeigt. Es wurden je 0.5 pmol RNA mit ansteigenden Proteinmengen inkubiert. Die Methodik und das Verfahren zur Berechnung der angegebenen relativen gebundenen Molekülzahlen RNA wurde in Kapitel 2.2.18 erläutert. Aus Abbildung 3.14 wird ersichtlich, dass das TSWV N Protein zu den RNA-Konstrukten 5'end und panS3'-24 eine deutlich erhöhte Affinität hat. Zur 5'end40-235 RNA hingegen besteht eine wesentlich geringere Affinität. Dieses Konstrukt umfasst die Nukleotide Nr. 40-235 am 5' Ende der S RNA. Das heisst, die 39 Nukleotide am äussersten 5' Ende fehlen (vgl. Kap. 3.7). Es wurden Mittelwerte aus sieben Dot Blot-Experimenten dargestellt, welche auf zwei verschiedene *in vitro* Transkriptionsansätze zurückzuführen sind.

Mit den Mutanten N F242A, N F246A, N F242_246A, N Δ 22 und N Δ 39 wurden weitere Filterbindungsexperimente durchgeführt. Es wurden jeweils die RNA-Konstrukte 3'end, 5'end, panS, panSvc, panS3'-24, panS5'-24, 3'endvc, 5'endvc, 5'end_40-235 und 5'end_77-272 getestet. Dabei ergab sich folgendes Bild: N F242A und N F246A hatten eine deutlich höhere Affinität zur 5'end RNA als zu den anderen RNAs. Es wurde auch eine präferentielle Bindung von panS3'-24

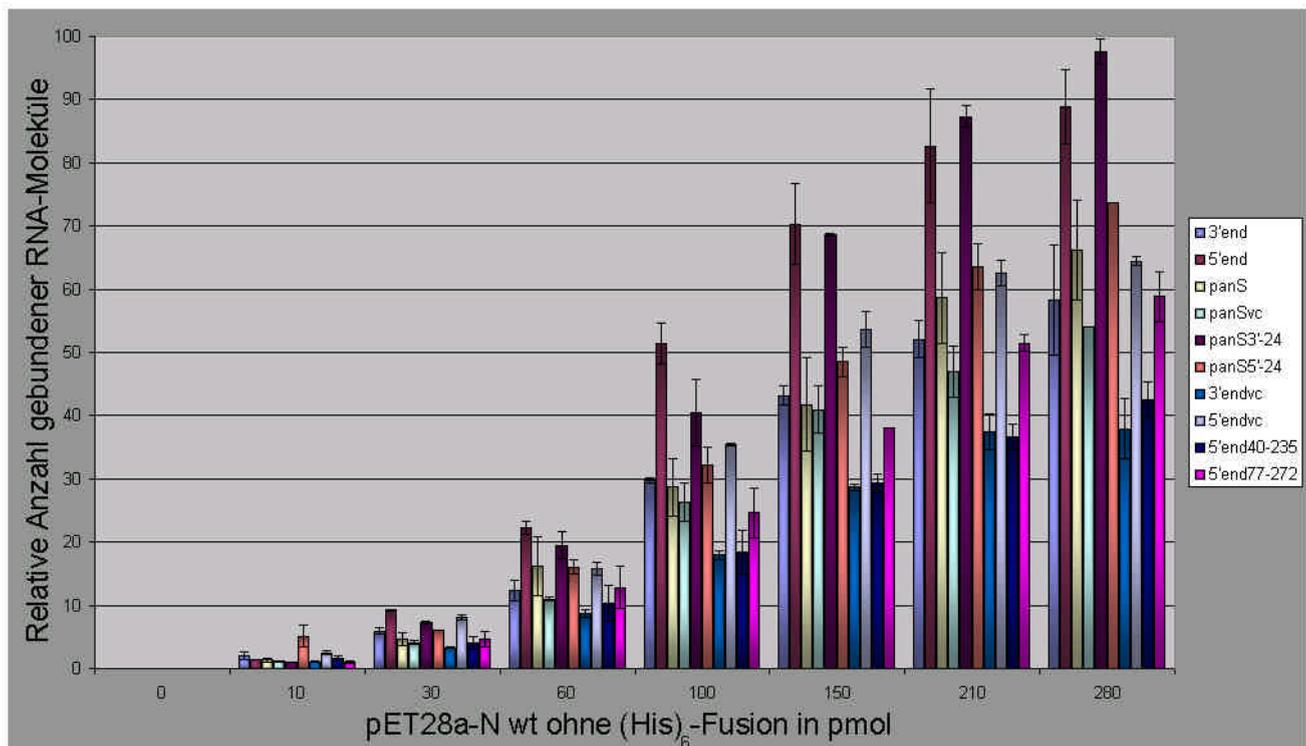


Abb. 3.14 Auswertung von Dot Blots mit Wildtyp N Protein ohne (His)₆-Fusion und zehn verschiedenen RNA-Substraten. Die Mittelwerte aus sieben Experimenten (und zwei voneinander unabhängigen *in vitro* Transkriptionen) sind gezeigt. Es wurden je 0.5 pmol RNA eingesetzt. Einzelheiten siehe Text.

beobachtet. Im Falle der Doppelpunktmutanten F242_246A wurde die 5'end RNA in zwei Experimenten erst ab einer Proteinmenge von 120 pmol besser gebunden als die 3'end RNA. Dies lag vermutlich an der allgemein niedrigen Signalstärke bei den Protein – RNA Komplexen mit N F242_246A. Bei hohen Proteinmengen war der Unterschied aber deutlich. Auch hier wurde eine hohe Affinität zu panS3'-24 gefunden. Die Bindungsversuche mit N Δ39 zeigten bei allen Proteinmengen eine bevorzugte Bindung von panS3'-24 und 5'end. Allerdings waren auch in diesem Fall die Signalstärken niedrig im Vergleich zu Komplexen mit Wildtyp N Protein. Mit N Δ22 wurden ähnliche Ergebnisse wie mit dem Wildtyp N Protein erzielt (bevorzugte Bindung an 5'end und panS3'-24). Hier trat bei 1000 pmol Protein eine allgemeine Erniedrigung der Signalstärke ein, was auf eine Übersättigung der Membran mit N Protein zurückgeführt wurde.

Ausserdem wurde in einem Dot Blot-Experiment die Frage beantwortet, ob Komplexe mit N F242_246A tatsächlich zu deutlich schwächeren radioaktiven Signalen führen als Komplexe mit Wildtyp N Protein. Dazu wurden die beiden Proteinvarianten auf ein und derselben Membran getestet. Tatsächlich wurden bei allen getesteten RNA-Konstrukten (3'end, 5'end, panS, panS3'-24 und panS5'-24) deutlich höhere Signalstärken bei Bindung durch wt N als bei Bindung durch N F242_246A gemessen. Bei 250 pmol Protein z.B. war das Signal mit Wildtyp N Protein durchschnittlich um den Faktor 2.6 stärker als mit N F242_246A. Die Punktmutanten N F242A und N F246A führten in Filterbindungsversuchen zu Signalstärken, welche zwischen denen von N F242_246A und N wt lagen.

Damit konnte eine Korrelation zwischen Signalstärke und Oligomerisierungsfähigkeit des verwendeten Proteins festgestellt werden. Ausserdem kann festgehalten werden, dass sämtliche getesteten N Protein-Varianten im Dot Blot-Versuch eine höhere Affinität zur 5'end RNA und zu panS3'-24 zeigten, verglichen mit anderen viralen RNAs.

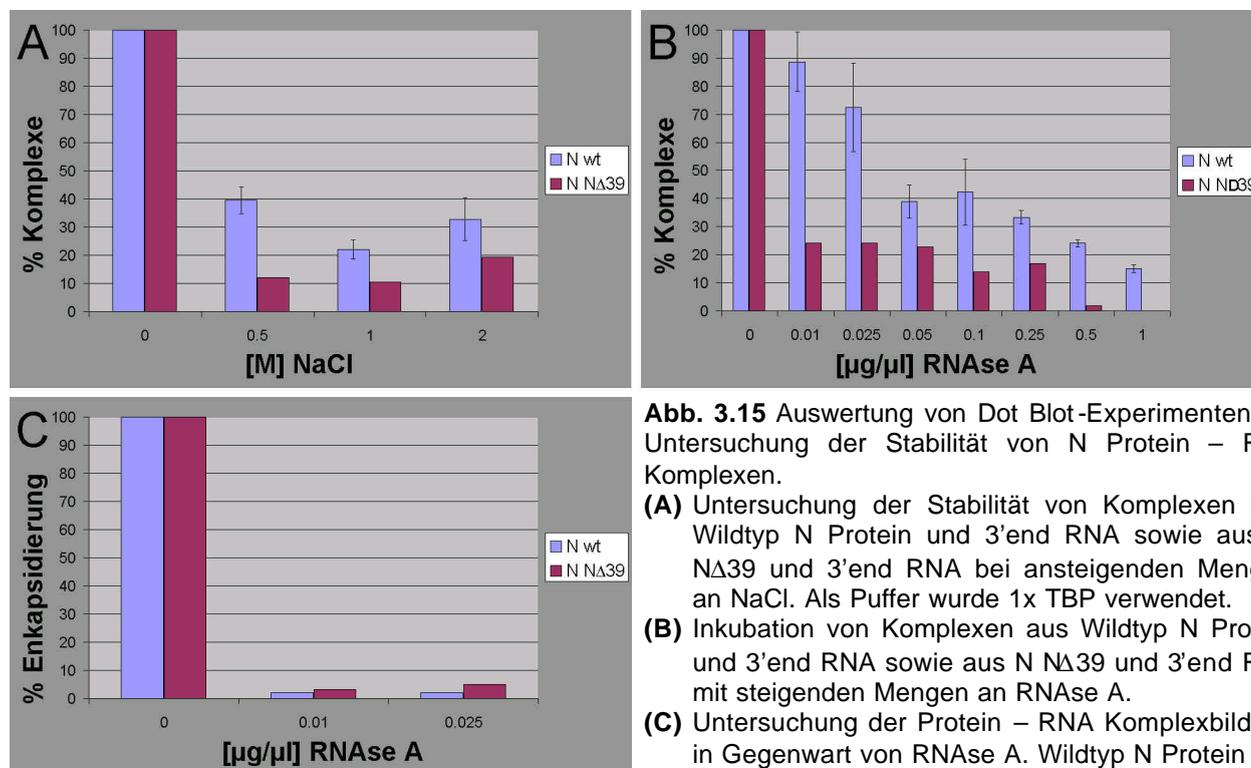


Abb. 3.15 Auswertung von Dot Blot-Experimenten zur Untersuchung der Stabilität von N Protein – RNA Komplexen.

(A) Untersuchung der Stabilität von Komplexen aus Wildtyp N Protein und 3'end RNA sowie aus N NΔ39 und 3'end RNA bei ansteigenden Mengen an NaCl. Als Puffer wurde 1x TBP verwendet.

(B) Inkubation von Komplexen aus Wildtyp N Protein und 3'end RNA sowie aus N NΔ39 und 3'end RNA mit steigenden Mengen an RNase A.

(C) Untersuchung der Protein – RNA Komplexbildung in Gegenwart von RNase A. Wildtyp N Protein und N NΔ39 wurden mit 3'end RNA inkubiert

In weiteren Dot Blot-Versuchen wurde der Einfluss von NaCl auf die Stabilität der *in vitro* assemblierten Protein – RNA Komplexe untersucht (vgl. Kap. 2.2.18). Dabei wurden jeweils 500 pmol (ca. 14 μg) Protein und 150 ng [α^{33} P]UTP-markierte RNA eingesetzt. Zum Standard-Puffer (1x TBP, siehe Kap. 2.1.6) wurden nach einer 15minütigen Inkubation bei RT 0, 0.5, 1.0 oder 2.0 M NaCl gegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 (A) zu sehen. Sowohl bei Komplexen mit Wildtyp N Protein und 3'end RNA als auch bei Komplexen mit N NΔ39 und 3'end RNA fand eine teilweise Dissoziation der Protein – RNA Komplexe bereits bei Zugabe von 0.5 M NaCl (zusätzlich zum 1x TBP Puffer) statt.

Es wurde auch die RNase-Stabilität von Protein – RNA Komplexen untersucht (Abb. 3.15 (B)). Nach 15 Minuten Inkubation bei RT zur Ausbildung der Protein – RNA Komplexe wurde jeweils die RNase in den angegebenen Mengen dazupipettiert und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, dass Komplexe mit Wildtyp N Protein und 3'end RNA selbst nach Inkubation mit 0.1 μg/μl RNase A noch zu ca. 42% intakt sind, während Komplexe mit N NΔ39 und 3'end RNA wesentlich sensibler auf RNase A reagierten (14% Restsignal bei 0.1 μg/μl RNase A). Umgekehrt war in Gegenwart selbst geringer Mengen RNase A keine Protein – RNA Assemblierung möglich (Abb. 3.15 (C)). In diesem Versuch wurde die RNase A vor der 15minütigen Inkubationszeit zum Protein – RNA Gemisch zugegeben.

Durch Filterbindungsversuche konnte gezeigt werden, dass eine RNA-Sequenz am 5' Ende der TSWV S RNA sowohl von Wildtyp N Protein als auch von den getesteten Mutanten präferentiell gebunden wird. Zumindest ein Teil der spezifisch gebundenen Sequenz befindet sich in den ersten 39 Nukleotiden am 5' Ende und die terminalen 24 Nukleotide sind für die bevorzugte Bindung notwendig. Da auch die Mutante N N Δ 39 noch RNA-Bindungseigenschaft besitzt, kann geschlossen werden, dass die RNA-Bindungsregion des N Proteins nicht oder nicht nur in den 39 N-terminalen Aminosäuren liegt. Diese Ergebnisse stimmen mit den in Kapitel 3.8.3 geschilderten Beobachtungen überein. Ausserdem wurde beobachtet, dass Komplexe aus Wildtyp N Protein und RNA gegenüber NaCl und RNase A stabiler sind als Komplexe aus N N Δ 39 und RNA.

3.10 RNA Sekundärstrukturberechnungen

Die energetisch günstigsten Sekundärstrukturen der in Gel-Retardations- und Dot Blot-Experimenten verwendeten *in vitro* Transkripte wurden mit dem Programm MFOLD (Walter *et al.* 1994) berechnet. Alle Berechnungen wurden für eine Temperatur von 20°C durchgeführt, was für ein Pflanzenvirus einen sinnvollen Wert darstellt. In Tabelle 3.7 sind die freien Energien der stabilsten berechneten RNA-Strukturen aufgelistet. Die Tabelle berücksichtigt sowohl Konstrukte, welche in Gel-Retardations- und / oder Dot Blot-Versuchen eingesetzt wurden als auch solche, welche an Hand von veröffentlichten Sequenzen bloss *in silico* generiert wurden. Man erkennt, dass die „Panhandle“-RNAs die niedrigsten globalen Energieniveaus erreichen (unterstrichene Werte). Auch die viral-komplementären „Panhandle“-RNAs sind den Berechnungen zufolge durch distale Basenpaarungen relativ stabile Strukturen.

Tabelle 3.7 Die freien Energien der stabilsten von MFOLD für 20°C ermittelten RNA-Strukturen sind angegeben. In der linken Spalte sind TSWV- und Kontrollkonstrukte erwähnt, die grösstenteils kloniert und in Protein – RNA Interaktionsversuchen eingesetzt wurden. Rechts sind Konstrukte angegeben, welche analog zu den TSWV-Konstrukten im Computer erstellt wurden. Die „Panhandle“-Konstrukte (unterstrichen) erreichen auf Grund ausgeprägter Basenpaarungen zwischen dem 5' und 3' Ende des jeweiligen Genomsegmentes durchwegs niedrige Energieniveaus.

RNA	Länge (nts)	kcal / mol ¹	RNA	Länge (nts)	kcal / mol
5'end (TSWV S RNA)	198	-63.1	5'end (PBNV S RNA)	198	-86.8
3'end (TSWV S RNA)	198	-63.5	5'end (WSMV S RNA)	198	-62.9
panS (TSWV)	198	<u>-81.8</u>	panS (WSMV)	198	<u>-84.6</u>
panSvc (TSWV)	198	-78.4	panM (WSMV)	198	<u>-90.8</u>
panS3'-24 (TSWV)	174	-56.0	5'end (IYSV S RNA)	198	-69.3
panS5'-24 (TSWV)	174	-49.6	panS (IYSV)	198	<u>-102.6</u>
5'endvc (TSWV)	198	-53.7	panM (IYSV)	198	<u>-74.6</u>
3'endvc (TSWV)	198	-63.7	5'end (PSMV S RNA)	198	-58.1
5'end40-235 (TSWV S RNA)	198	-71.4	panS (PSMV)	198	<u>-89.7</u>
5'end77-272 (TSWV S RNA)	198	-71.7	panM (INSV)	198	<u>-71.2</u>
panM (TSWV)	198	<u>-87.4</u>	panL (INSV)	198	<u>-68.4</u>
panL (TSWV)	198	<u>-72.3</u>	5'end (PYSV S RNA)	198	-61.9
BaYMV RNA 2	173	-67.7			
KS RNA	120	-55.5			
SK RNA	120	-58.8			

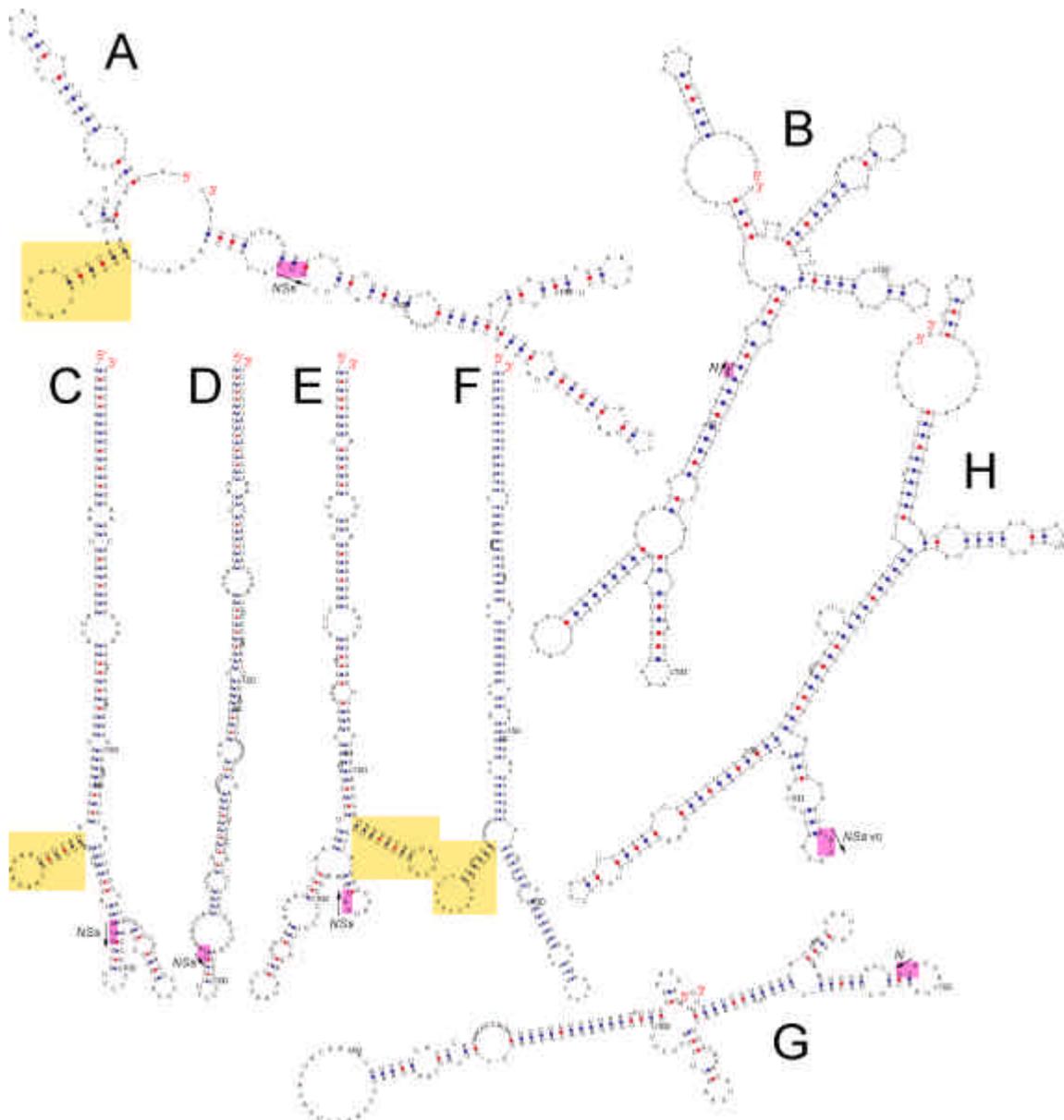


Abb. 3.16 Mit dem Programm MFOLD berechnete RNA-Sekundärstrukturen. Ausser (F) wurden diese 198 b langen RNAs in GEMSA eingesezt. Temperatur = 20°C. Mit Ausnahme der Isoform von panS (D) sind die energetisch günstigsten Strukturen gezeigt. Start-Codons wurden rosa unterlegt, auffällige „Stem-Loops“ gelb.

(A) 5'end	(B) 3'end	(C) panS	(D) Isoform von panS
(E) panSvc	(F) panM	(G) 5'endvc	(H) 3'endvc

Die Abbildung 3.16 fasst die stabilsten berechneten Sekundärstrukturen einiger für diese Arbeit relevanten RNA-Konstrukte zusammen. Start-Codons wurden rosa unterlegt und die Transkriptionsrichtungen durch Pfeile angegeben. Auffällige „Stem-Loop“-Strukturen in der Nähe des 5' Endes des TSWV S Segmentes (A und C) sowie des M Segmentes (F) bzw. in der Nähe des 3' Endes des viral-komplementären S Segmentes (E) wurden gelb unterlegt. Nachdem festgestellt worden war, dass das 5'end Konstrukt bevorzugt von N gebunden wird, wurde dieser „Stem-Loop“ näher betrachtet. Das Konstrukt „5'end_40-235“ beinhaltet diese vom Computer vorhergesagte Struktur, das Konstrukt „5'end_77-272“ jedoch nicht mehr. Da beide RNAs keine

hohe Affinität zum N Protein zeigten (vgl. Abb. 3.14), wurde die Idee verworfen, diese hypothetischen „Stem-Loops“ seien für die Spezifität der Interaktion verantwortlich. Ausserdem wurden Experimente mit drei verschiedenen kurzen RNAs gemacht, welche durch *in vitro* Transkription auf Oligonukleotid-Dimeren hergestellt wurden und genau den in Abbildung 3.16 (A) gelb markierten hypothetischen „Stem-Loop“ bzw. zwei unterschiedlich stark mutierte Versionen davon darstellten. Es konnten keine Unterschiede in der Bindungsaffinität durch das N Protein festgestellt werden, weshalb hier nicht näher darauf eingegangen werden soll.

Die gezeigten Sekundärstrukturen wurden für ein proteinfreies System berechnet, was natürlich nicht der Realität entspricht. Im viralen Zyklus können auch Faltungszustände eine Rolle spielen, die nur durch Interaktionen mit Proteinen (N, RdRp, NSm, zelluläre Proteine) möglich sind.

Kapitel 4 - Diskussion

4.1 Expression, Reinigung und Haltbarkeit von biologisch aktivem TSWV Nukleokapsidprotein

Die Molekularbiologie des Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) ist auch ein Jahrzehnt nach dessen Sequenzierung erst lückenhaft verstanden. Dies liegt unter anderem daran, dass es ein komplexes Pflanzenvirus mit Membranhülle und einem segmentierten ambisense („in beide Orientierungen kodierenden“) Genom ist. Selbst wenn in einer Pflanzenzelle alle drei viralen Genome vorhanden sind, reicht dies noch nicht für eine erfolgreiche Infektion aus (van den Hurk *et al.* 1977). Die drei RNPs müssen gemeinsam mit der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase (RdRp) vorhanden sein, welche die mRNAs herstellt, die wiederum von den Ribosomen abgelesen werden. Daher gibt es bislang kein reverses genetisches System für TSWV. Aufbau und Funktion des Virus werden hauptsächlich durch Elektronen- und neuerdings auch Atomare Kraftmikroskopie (AFM), transgene Pflanzen sowie biochemische *in vitro* Versuche untersucht. Der letztere Weg wurde in dieser Doktorarbeit eingeschlagen.

Für Protein – RNA Bindungsstudien wurden natives N Protein und radioaktiv markierte RNA, welche verschiedene Abschnitte auf der viralen und viral-komplementären RNA repräsentierte, hergestellt. Die Arbeit mit dem TSWV N Protein wurde anfänglich stark durch dessen beschränkte Haltbarkeit beeinträchtigt. Bereits nach ca. zwei Wochen Lagerung im Puffer „pQEC“ (vgl. Kap. 2.1.6) hatte das heterolog in *E. coli* exprimierte Nukleokapsidprotein mit C-terminaler (His)₆-Fusion einen beträchtlichen Teil seiner RNA-Bindungsfähigkeit verloren (Christoph Minke, pers. Mitteilung und eigene Beobachtungen). Durch Ammoniumsulfat-Fällung liess sich das Protein zwar länger aufbewahren und auch dessen RNA-Bindungseigenschaft blieb erhalten, doch war nicht klar, ob sich dadurch die biochemischen Eigenschaften des N Proteins (z.B. Multimerisierungszustand) veränderten. Ausserdem musste das viele Salz durch Dialyse entfernt werden. Nachdem sich gezeigt hatte, dass an sich nicht RNA-bindende Proteine nach Anhängen einer (His)₆-Fusion die Migrationsgeschwindigkeit von RNA in Gel-Retardations-Assays (GEMSAs) verändern können (Kap. 3.8.2), wurden Interaktionsversuche mit pET28a-exprimiertem N Protein ohne (His)₆-Fusion gemacht. Vor der Abspaltung der N-terminalen (His)₆-Fusion verhielt sich dieses N Protein noch instabiler im „pQEC“-Puffer als das N Protein mit C-terminaler (His)₆-Fusion. Dies deutete darauf hin, dass ein suboptimaler Puffer verwendet wurde.

Ein idealer Puffer zur Lagerung des TSWV N Proteins sollte folgenden Anforderungen genügen: Das N Protein sollte über längere Zeit in Lösung bleiben (1), seine biologische Aktivität behalten (2), korrekt gefaltet vorliegen (3) und seinen Multimerisierungszustand möglichst nicht verändern (4). Die erwähnten Punkte sind voneinander abhängig: Wenn das N Protein sehr grosse Aggregate bildet, fällt es langsam aus. Damit verliert es auch seine biologische Aktivität. Ein

teilweise entfaltetes N Protein wird auch eine reduzierte biologische Aktivität haben oder diese vollständig verlieren. Allerdings ist es auch möglich, dass ein Protein zwar stabil in Lösung bleibt, aber keine biologische Aktivität mehr hat. Dies ist z.B. bei Verwendung denaturierender Detergenzien der Fall. Leider lässt sich keine der biologischen Aktivitäten des N Proteins einfach messen. Daher wurde der erste Punkt (Langzeitstabilität in Lösung) als Kriterium genommen. In den Kapiteln 2.2.9 und 3.2 wurde beschrieben, wie auf heuristischem Weg aus 48 Puffern ein für die Lagerung von TSWV N Protein geeigneter Puffer gefunden wurde („pET“ Puffer). RNA-Bindungstests nach Dialyse gegen den Bindungspuffer (1x TBP) bestätigten dessen Eignung.

Der „pET“ Puffer enthält unter anderem 10% Glycerin. Es ist bekannt, dass Glycerin die Löslichkeit und Stabilität von Proteinen fördern kann und im allgemeinen in keiner Konzentration denaturierend wirkt (Gekko *et al.* 1981; Arakawa *et al.* 1985). Ausserdem enthält der Puffer 50 mM Ammoniumsulfat. Die stark geladenen Ammonium- und Sulfationen von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hydratisieren und entziehen dem Protein dadurch einen Teil seiner Hydrathülle. Dies könnte dazu beitragen, dass die N-terminale $(\text{His})_6$ -Fusion (vor der Thrombin-Spaltung) teilweise vor den Wassermolekülen geschützt und dadurch das Protein als ganzes stabilisiert wird. Schliesslich befinden sich im „pET“-Puffer auch 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 8.0), was zusammen mit dem Ammoniumsulfat eine Salzkonzentration von 150 mM ergibt.

Absolut kein Verlust an N Protein trat bei Zugabe von 1% Triton X-100 auf. Wie bereits erwähnt sind allerdings Detergenzien enthaltende Lösungen nicht für Interaktionsstudien geeignet. Detergenzien können Proteinaggregate auflösen, indem sie an hydrophobe Stellen binden (Womack *et al.* 1983).

Ein eigentlicher Durchbruch in der heterologen Expression mutanter N Proteine wurde durch die Verwendung von *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) erzielt (vgl. Tabelle 3.1). Diese Zellen enthalten zusätzliche Kopien von tRNA-Genen, welche für selten in *E. coli* benutzte Codons (*argU*, *ileY*, *leuW*) kodieren. Dadurch konnten erstmalig die N Protein Mutanten N Δ 22, N Δ 39 und F242_246A mit hoher Ausbeute exprimiert werden. Mit *Pichia pastoris* (Familie *Saccharomycetaceae*) war es zwar auch gelungen, die Doppelpunktmutante N F242_246A löslich zu exprimieren und zu reinigen, doch war die Ausbeute gering (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie (erklärt in Kap. 2.2.12) sollten drei Fragen geklärt werden: (1) Unterscheiden sich die Sekundärstrukturanteile des Wildtyp N Proteins von denen der Punkt- und Deletionsmutationen und lassen sich die gewonnenen Daten in Beziehung zu den veröffentlichten Bindungsstudien von Uhrig *et al.* (1999) bringen? (2) Liegen die heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine im Bindungspuffer (1x TBP) korrekt gefaltet vor? (3) Wie wirkt sich die N-terminale $(\text{His})_6$ -Fusion von pET28a-N auf die Stabilität der Sekundärstrukturen aus? Ändert sich das CD-Spektrum nach Abspaltung der N-terminalen Fusion? Damit die Ergebnisse der CD-Spektroskopie an Hand eines Modelles diskutiert werden können, soll hier kurzer Exkurs zum Verhalten von Proteinen in Lösung gemacht werden.

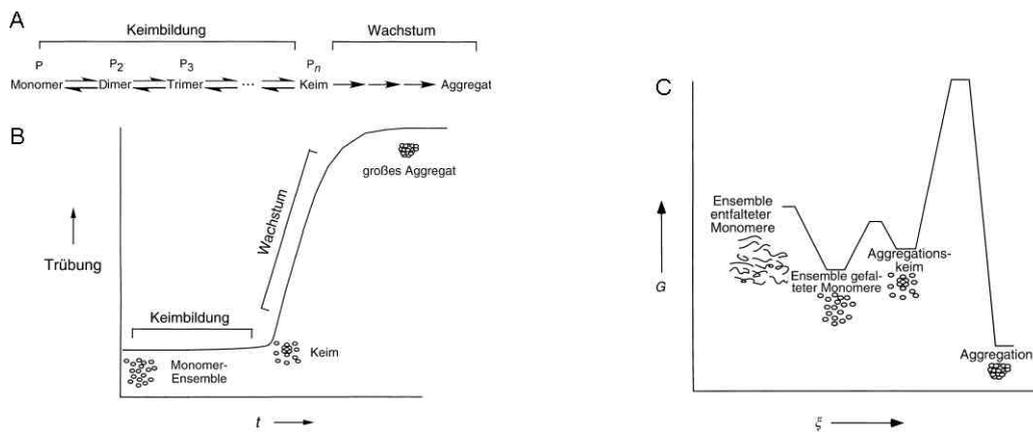


Abb. 4.1 Modell für die Aggregation von Proteinen (Gazit 2001).

(A) Die Proteinaggregation läuft in zwei Phasen ab: Keimbildung und Wachstum der Keime bis zu einer kritischen Masse.

(B) Typische Aggregationskurve. Die Aggregation wird im allgemeinen an Hand der Trübung der Lösung als Funktion der Zeit gemessen. Die vorgeschaltete Keimbildung verursacht das verzögerte Auftreten der Trübung.

(C) Modell für die Aggregation von Proteinen, in dem alle Proteine in einer wässrigen Lösung als ein einziges thermodynamisches System angesehen werden. Gezeigt ist die relative Gibbs-Energie (G) für den ungefalteten, den gefalteten, den Keimbildungs- und den aggregierten Zustand der Proteine. Der aggregierte Zustand nimmt das globale Minimum der Gibbs-Energie ein. Die hohe Aktivierungsenergie führt jedoch dazu, dass die Proteine in ihrer korrekten Faltung kinetisch blockiert sind. ξ = Reaktionskoordinate
Im Falle des TSWV N Proteins liegen auch im korrekt gefalteten Zustand nicht (nur) Monomere, sondern vor allem auch Multimere vor.

Eigentlich besagt das vor mehr als vierzig Jahren von Chris B. Anfinsen aufgestellte zentrale Dogma der Proteinfaltung (Übersichtsartikel: Anfinsen 1973; Anfinsen *et al.* 1975), dass der energetisch günstigste Faltungszustand von Proteinen der „korrekt gefaltete“ ist. Anfinsen und Kollegen bewiesen, dass die gesamte für die korrekte Proteinfaltung notwendige Information in der Primärsequenz enthalten ist. Ausserdem wird ein entfaltetes Protein spontan in den korrekten Faltungszustand übergehen, welcher der Zustand mit der niedrigsten Gibbs-Energie (für dieses konkrete Protein) ist. Doch diese Aussagen gelten nur für ein isoliertes Proteinmolekül in unendlich verdünnter Lösung und nicht für konzentrierte Proteingemische (Gazit 2001).

In der Realität bilden sich je nach Pufferbedingungen und den biophysikalischen Eigenschaften eines Proteins im Laufe der Zeit Aggregate. Die zwei Phasen der Proteinaggregation sind in Abbildung 4.1 (A) dargestellt: Man unterscheidet die Keimbildungs- von der Wachstumsphase. In (B) ist die Trübung einer Proteinlösung als Funktion der Zeit illustriert. Man erkennt, dass die Keimbildungsphase fast ohne Anstieg der Trübung und daher unbemerkt geschieht. In Abbildung 4.1 (C) schliesslich ist ein Modell für die Aggregation von Proteinen gezeigt, in dem alle Proteine in einer wässrigen Lösung als ein einziges thermodynamisches System angesehen werden. Gezeigt ist die relative Gibbs-Energie (G) für den ungefalteten, den gefalteten, den Keimbildungs- und den aggregierten Zustand der Proteine. Die Reaktionskoordinate wurde mit „ ξ “ beschriftet. Man erkennt, dass nicht der korrekt gefaltete, sondern der aggregierte Zustand das globale Minimum der Gibbs-Energie einnimmt. Die hohe Aktivierungsenergie führt jedoch dazu, dass die Proteine in ihrer korrekten Faltung kinetisch blockiert sind (Gazit 2001).

Es wurde in Kapitel 3.6 (Abb. 3.4) gezeigt, dass pET28a-exprimiertes wt N Protein und ein Teil der Mutanten, die eine N-terminale (His)₆-Fusion enthalten, zu keinen scharfen Banden in BN-PAGE Analysen führten. Diese Fusionsproteine werden entsprechend der Abbildung 4.1 (C) als „Ensembles entfalteter Monomere“ gedeutet, die hier allerdings durch deren Fähigkeit zur Multimerisierung nicht als Monomere vorliegen. Die scharfen Banden werden als „Ensembles gefalteter Monomere“ interpretiert, welche allerdings durch eine geordnete Homopolymerisierung ebenfalls nicht als Monomere vorliegen. Diese Beobachtungen werden durch die Ergebnisse der CD-Spektroskopie bestätigt. In Tabelle 3.2 ist nachzulesen, dass das pET28a-exprimierte N Protein sowie die getesteten Mutanten mit N-terminaler (His)₆-Fusion deutlich niedrigere α -helicale Anteile als die entsprechenden Proteine nach Abspaltung der Polyhistidin-Fusion mittels Thrombin haben. Ein Vergleich der α -helicalen Anteile von N Protein und Mutanten ohne (His)₆-Fusion ergibt folgendes Bild: Das Wildtyp Protein besitzt einen Anteil von ca. 38% α -Helices und die N22-Mutante gar von 41%. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Uhrig *et al.* (1999) überein. In dieser Studie wurde den ersten 22 Aminosäuren des N Proteins keine Funktion in der Homopolymerisierung zugeschrieben (Abb. 1.10 und 3.1). Es wird vermutet, dass die Homopolymerisierung von N durch α -Helices vermittelt wird. Die Mutanten N F242A und N F246A besitzen etwas geringere Anteile an α -Helices (29 resp. 26%), was darauf hinweist, dass durch die Mutationen tatsächlich α -helicale Strukturen destabilisiert wurden. Für die Doppelpunktmutante N F242_246A wurde nur ein α -Helix Anteil von 20% gemessen, was diese Interpretation unterstützt. Der Austausch der Phenylalanine durch Alanine hat also einen Einfluss auf die Proteinfaltung bzw. die Stabilität der C-terminalen α -Helices. Hefeexperimente deuten darauf hin, dass es sich bei der Doppelpunktmutanten N F242_246A um eine temperatursensitive Mutante handelt, denn bei RT wurde eine homotypische Interaktion beobachtet (Christoph Rudolph, pers. Mitteilung). Ein interessantes Experiment wäre, mit Hilfe der CD-Spektroskopie einen Temperaturscan bei $\lambda = 222$ nm durchzuführen, um ein mögliches Abnehmen des α -Helix Anteiles von F242_246A bei Erhöhung der Temperatur zu beobachten. Ein ähnliches Experiment – allerdings mit Wildtyp Nukleokapsidprotein - wurde von Alfadhli *et al.* (2002) durchgeführt, um die Oligomerisierung des Hantavirus N Proteins zu verfolgen. Auch Konformationsänderungen nach Zugabe von RNA könnten mittels CD-Spektroskopie verfolgt werden (Baer *et al.* 1994).

4.2 Biochemische Untersuchungen zur Homopolymerisierung des Nukleokapsidproteins

Die Homodimerisierung des TSWV N Proteins wurde in Hefe-Interaktionsstudien gezeigt. Ausserdem wurden mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz Hinweise auf eine Oligomerisierung von wt N-(His)₆ gefunden (Uhrig *et al.* 1999). Die Multimerisierung von wt N und Mutanten wurde in dieser Arbeit erstmals mittels Gelfiltration und BN-PAGE untersucht. Dabei standen folgende zwei Fragen im Vordergrund: (1) Gibt es N Protein-Komplexe, die mengenmässig dominieren? Diese könnten Zwischenstufen der Enkapsidierung darstellen, wie sie z.B. für TMV beschrieben wurden (vgl. Kap. 1.5.2). (2) Unterscheiden sich die Oligomerisierungszustände von Wildtyp N Protein und Mutanten? Gibt es Unterschiede zu den Hefe Zwei-Hybrid Daten?

Mittels Gelchromatographie wurde in Kapitel 3.5 gezeigt, dass das TSWV N Protein ohne Polyhistidin-Fusion unter nativen Bedingungen („pET“ Puffer) vor allem als hochmolekularer Komplex vorliegt, dessen Grösse ausserhalb des Auftrennungsbereiches der Säule liegt. Ausserdem wurde viel Tetramer gefunden, gefolgt von Trimer (vgl. Tabelle 3.4).

Die Multimerisierungszustände von nativ aufgereinigtem TSWV N Protein mit C-terminaler (His)₆-Fusion wurden mittels Gelfiltration von Minke (1998) untersucht. Ein DIBA (Dot Immuno Binding Assay) zeigte, dass ein grosser Teil des N Proteins als Homopolymer mit einem Molekulargewicht grösser als 200 kDa vorlag. Ausserdem wurde Trimer, wenig Dimer und sehr wenig Monomer gefunden.

Neuere, ebenfalls in unserem Labor durchgeführte gelchromatographische Untersuchungen deuten auf eine Bevorzugung des pentameren Zustandes hin, gefolgt von Tetramer und Trimer (Hackbusch 2001). Diese Experimente wurden auch mit Wildtyp N Protein durchgeführt, welches eine C-terminale Hexahistidin-Fusion trug. In diesem Fall wurde das N Protein durch Ammoniumsulfat-Fällung aufkonzentriert. Es ist nicht auszuschliessen, dass dies einen Einfluss auf die Multimerisierungszustände des N Proteins hat. In der vorliegenden Studie wurden daher Filtrationseinheiten zum Aufkonzentrieren von N Protein benutzt, womit auch kein zusätzliches Salz eingeführt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass hochmolekulare Aggregate spontan zu niedrigmolekularen Formen (Tetramer, Trimer) dissoziieren (Tabelle 3.4, Experiment Nr. 8). Die Rückreaktion zum Monomer scheint allerdings sehr langsam (energetisch ungünstig) zu sein. Dies könnte daran liegen, dass die Übergangskomplexe (Tetramer und Trimer) sehr stabil sind. Ionische Detergenzien vermochten die Komplexe aufzulösen. So bewirkte die Anwesenheit von 0.5% Na-Laurylsarcosin in einem Blue Native Gel die vollständige Auflösung der N Proteinkomplexe in Monomere. Na-Laurylsarcosin ist ein anionisches Detergens, das genau wie SDS über einen Laurylrest als hydrophoben Anteil verfügt. Allerdings stellt bei Na-Laurylsarcosin im Gegensatz zu SDS eine Carboxyl-Gruppe die negative Ladung dar. Durch Zugabe von 10 mM

des nicht denaturierenden Detergens Sulfobetain SB-12 zum Probenpuffer konnte in BN-Gelen eine deutliche Zunahme von monomerem N Protein erreicht werden. Sulfobetain SB-12 (Gonenne *et al.* 1978) ist ein zwitterionisches Detergens, das mit seinem langen Kohlenwasserstoffschwanz und einer negativ geladenen Sulfatgruppe eine ähnliche Struktur wie SDS besitzt (vgl. Kap. 2.1.1). Alle Detergenzien, welche die N Protein-Komplexe auflösen konnten, besitzen einen langen hydrophoben Kohlenwasserstoffschwanz. Dies wird als Hinweis darauf gedeutet, dass die N Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden.

Die beobachtete stabile Bindung der N Protein-Komplexe macht Sinn, denn das Nukleokapsid bleibt vermutlich während der Transkription und Replikation zusammengebaut. Für die beiden *Bunyaviridae* Rift Valley Fever und Bunyamwera konnte gezeigt werden, dass die Polymerase nur in Gegenwart des N Proteins aktiv ist (Dunn *et al.* 1995; Lopez *et al.* 1995). Im Gegensatz zu positivsträngigen Viren wie TMV (vgl. Kap. 1.5.2) findet beim Eintritt in die Zelle also keine Auflösung der RNPs („uncoating“) statt.

Die Beobachtung, dass die hochmolekularen Proteinkomplexe auch unter extremen Bedingungen nicht getrennt werden konnten, führte zur Vermutung, diese würden durch *E. coli* RNA und nicht (nur) durch Protein – Protein Interaktion zusammengehalten. Es ist aus Arbeiten mit anderen Viren bekannt, dass die Expression von Nukleokapsidproteinen zur Bildung von nukleokapsidähnlichen Strukturen führen kann, indem unspezifisch zelluläre RNA enkapsidiert wird (Buchholz *et al.* 1993). Jonsson und Kollegen berichteten, dass heterolog in *E. coli* exprimiertes Sin Nombre Virus (SNV, Gattung *Hantavirus*) Nukleokapsidprotein mit RNA kontaminiert ist (Jonsson *et al.* 2001). Das Verhältnis $A_{260} : A_{280}$ betrug bis zu 1.7. Absorptionsspektren von heterolog in *E. coli* exprimiertem und nativ gereinigtem TSWV N Protein ergaben sehr ähnliche Werte (vgl. Kap. 3.4), womit feststand, dass auch das in dieser Arbeit benutzte N Protein Nucleinsäure – aller Wahrscheinlichkeit nach *E. coli* RNA – enthielt.

Diese Nucleinsäure konnte allerdings selbst durch Einsatz grosser RNase-Mengen nicht entfernt werden, wie durch Spektralanalysen (Kap. 3.4) und Gelchromatographie (Kap. 3.5) gezeigt wurde. Die gemäss Absorptionsspektroskopie vorhandene Nucleinsäure scheint also für die RNase A nicht zugänglich zu sein. Im Gegensatz dazu zeigten *in vitro* gebildete RNPs eine gewisse RNase-Sensitivität (vgl. Abb. 3.15 (B)). *In vitro* erzeugte Komplexe aus Bunyamwera N Protein und RNA sind bis ca. 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNase A resistent (Osborne *et al.* 2000). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass bloss die RNA verdaut wird, welche nicht direkt von N Proteinen umschlossen ist. Das von *E. coli* exprimierte N Protein ist im Bakterienlysat RNAsen ausgesetzt, welche vermutlich die aus dem N Protein „herausragende“ RNA abbauen. Die direkt an Protein gebundene RNA hingegen könnte durch sterische Hinderung vor dem RNase-Abbau geschützt sein.

In Anwesenheit von SB-12 wurde in Gelfiltrationsexperimenten monomeres Wildtyp N Protein gefunden. Am meisten Monomer bildete sich, wenn SB-12 auch im Laufpuffer war (Tabelle 3.4, Experimente Nr. 4 und 6). Als dominante Multimerisierungsformen traten Trimer und Tetramer auf, wobei die sehr hochmolekularen Komplexe im Ausschlussvolumen zwar deutlich abnahmen, aber

immer noch vorhanden waren. Daran änderte auch die Inkubation des N Proteins mit RNase A nichts. Interessanterweise lag bei Gelfiltrationen mit SB-12 im Laufpuffer mehr monomeres wt N Protein mit N-terminaler (His)₆-Fusion vor als monomeres wt N Protein ohne (His)₆-Fusion (Tabelle 3.4, Experimente Nr. 4 und 6). In BN-PAGE Gelen wurde nur monomeres Wildtyp N Protein gesehen, wenn es eine C-terminale (His)₆-Fusion trug (vgl. Abb. 3.4 (a), Spuren Nr. 2 vs. 3). Es ist denkbar, dass durch die (His)₆-Fusion die Hydrophobizität der C-terminalen Interaktionsdomäne des N Proteins erniedrigt und dadurch die homotypische Interaktion abgeschwächt wird.

Die Doppelpunktmutante N F242_246A, welche in Hefe-Interaktionsexperimenten kaum Selbstinteraktion zeigte (Uhrig *et al.* 1999), lag in Gelfiltrationsexperimenten vor allem als sehr hochmolekularer Komplex und als Monomer vor (vgl. Tabelle 3.4). Auch ein Trimer-Peak war vorhanden. Wie beim Wildtyp N Protein änderte die Inkubation mit RNase A nichts an den Multimerisierungszuständen (Tabelle 3.4, Experimente 7 und 9). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nativ aus *E. coli* gereinigtes TSWV N Protein zum Teil *E. coli* RNA enthält. Sie lässt sich nicht durch RNase entfernen, was darauf zurückgeführt wird, dass sie völlig vom Nukleokapsidprotein umschlossen ist. Um RNA-freies N Protein zu erhalten, müsste dieses denaturierend gereinigt, mit RNase A behandelt, rückgefaltet und dann in der Gelfiltration untersucht werden. Andererseits würde sich dann die Frage nach der korrekten Rückfaltung des N Proteins stellen. Als stabile Multimerisierungszustände konnten Trimer und Tetramer identifiziert werden. Falls die hochmolekularen, nicht mehr von der Säule auflösbaren Komplexe tatsächlich aus korrekt gefaltetem und nicht etwa aus zusammengeklumptem N Protein bestehen, so sollte sich bei isolierten hochmolekularen Komplexen durch Dissoziation von N Proteinen ein Gleichgewicht zwischen hochmolekularen Aggregaten, Tetramer, Trimer und Monomer einstellen. Genau dies wurde beobachtet (Tabelle 3.4, Experiment 8). Allerdings wurde nur sehr wenig Monomer gefunden, was die Annahme unterstützt, Trimer und Tetramer seien stabile Übergangszustände.

Die Oligomerisierung des Hantaan Virus (HTNV) N Proteins wurde von Alfadhli *et al.* (2001) mit biochemischen und genetischen Methoden untersucht. Bakteriell exprimiertes, mit einer Polyhistidin-Fusion versehenes N Protein (50 kDa) wurde mittels Saccharose-Gradientenfractionierung analysiert. Die Autoren fanden einen Peak bei etwa 150 kDa, welcher einem Trimer entspricht. Dieser Komplex scheint nicht-kovalent verbunden zu sein, da er sich mit 0.05% Natriumdesoxycholat auflösen liess. Ausserdem wurden höhermolekulare Aggregate gefunden. Ein Crosslinking-Experiment bestätigte das Vorhandensein eines Trimers. Mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems (Fields *et al.* 1989) wurde gezeigt, dass die C-terminale Hälfte des HTNV N Proteins sowie die N-terminalen 40 Aminosäuren mit einem Vollängen N-Protein interagieren konnten. Mittels Strukturvorhersage-Algorithmen wurde postuliert, dass diese 40 N-terminalen Aminosäuren trimere „Coiled-Coils“ bilden können. Dadurch erklärt man sich die Trimerisierung des N Proteins, und Trimere wurden als Intermediate der Assemblierung postuliert. In einer neuen Publikation wurden die „Coiled-Coil“ Domänen des Sin Nombre Virus (SNV) N

Proteins mittels CD-Spektroskopie und Lichtstreuungsmessungen („dynamic light scattering“) genauer untersucht (Alfadhli *et al.* 2002). Ein Peptid, welches die Aminosäuren 43-75 umfasste, trimerisierte bei niedriger Konzentration, woraus geschlossen wurde, dass es die für die „Coiled-Coil“ Interaktion entscheidende Sequenz beinhaltet. Ein längeres Peptid (aas 3-75) assemblierte als Dimer und / oder Trimer bei hoher Konzentration und nahm bei niedriger Konzentration eine Helix-Schleife-Helix Konformation an. Die Autoren spekulierten, dass die HTNV N Protein Oligomerisierung eine Bündlung intramolekularer antiparalleler „Coils“ oder eine konformationelle Umwandlung von intra- zu intermolekularen „Coiled-Coils“ beinhaltet. Für das TSWV N Protein konnte durch Computeranalysen mit Standardprogrammen keine „Coiled-Coil“ Domäne gefunden werden.

N Protein Komplexe wurden auch mittels Blue Native Electrophoresis (BN-PAGE, vgl. Kap. 2.2.11) untersucht. Im Unterschied zur Gelfiltration können mit BN-PAGE verschiedene Proteine und Pufferbedingungen in einem einzigen Gel getestet werden. Zwar waren die benötigten Proteinmengen höher als in SDS-Gelen, aber doch deutlich geringer als bei der Gelchromatographie. Vermutlich lief auf Grund des hohen isoelektrischen Punktes von N nicht alles Protein ein. Im Vergleich zur Gelfiltration ist BN-PAGE zeitsparend, obgleich wiederum langsamer als die SDS-PAGE. Trotz des Potentials dieser Methode konnte in einer Literaturrecherche nur eine einzige Arbeit entdeckt werden, in der BN-PAGE zur Untersuchung viraler Proteine eingesetzt wurde: Schulke *et al.* (2002) charakterisierten Glykoproteine der Membranhülle des Human Immunodeficiency Virus (HIV, Familie der *Retroviridae*).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die durch Hefe Zwei-Hybrid Analysen gefundenen Interaktionsdomänen (vgl. Abb. 1.10) mit biochemischen Methoden bestätigt werden können. Durch anschliessenden Vergleich der RNA-Bindungsfähigkeit der mutierten N Proteine wurde geklärt, ob bestimmte Multimerisierungszustände oder monomeres N Protein bevorzugt an RNA binden. N Protein mit C-terminaler (His)₆-Fusion lag als Monomer, Trimer, Tetramer, Pentamer und höhermolekulare Komplexe vor. Beim N Protein ohne (His)₆-Fusion war kein Monomer zu sehen, doch auch Trimer, Tetramer, Pentamer und höhermolekulare Komplexe wurden gefunden. Die Oligomerisierungszustände von Komplexen grösser als ca. Pentamer können nicht mit Sicherheit angegeben werden. Die Grössenabschätzung von Proteinen im BN-Gel ist weniger genau als im SDS-Gel, weil Coomassie im Gegensatz zu SDS in keinem festgelegten Verhältnis an Proteine bindet. Interessanterweise wurde wie in Gelfiltrationsanalysen auch in BN-Gelen kaum Dimer gefunden. Die Mutanten N F242A, N F246A und vor allem N F242_246A lagen zum Teil als Monomer vor (Abb. 3.4 (b) und (c)). Dies unterstützt und erweitert die Ergebnisse aus Hefe Zwei-Hybrid-Interaktionsanalysen (Uhrig *et al.* 1999), bei denen für die N Protein Mutanten F242A und F246A abgeschwächte Dimerisierungen und für die Doppelpunktmutante ein fast vollständiger Verlust der Selbstinteraktion gefunden wurde. Im Gegensatz zu den Hefe Zwei-Hybridversuchen war jedoch selbst N F242_246A zum Teil noch zur Homopolymerisierung fähig. Die Mutante N Δ 22 bildete auf BN-Gelen sehr scharfe Banden aus, welche wahrscheinlich den Zuständen

Monomer, Trimer, Tetramer, Hexamer etc. entsprechen (Abb. 3.5). Dies unterstützt die Annahme, dass die N-terminalen 22 Aminosäuren nicht in die homotypische Interaktion involviert sind. Interessanterweise scheint auch die Mutante N NΔ39 noch eine Fähigkeit zur Multimerisierung zu besitzen (Abb. 3.4, Spur (b) 4), doch ist deren Monomeranteil grösser als z.B. bei N NΔ22, was die Vermutung einer gestörten Homopolymerisierungseigenschaft unterstützt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die N-terminale Interaktionsdomäne des N Proteins komplexer ist als bisher vermutet und nicht nur die 39 N-terminalen Aminosäuren umfasst. Die scharfen Banden deuten auf eine korrekte Faltung von N NΔ39 hin. Im Gegensatz dazu bildeten Wildtyp N, N NΔ22 und N NΔ39 mit N-terminaler (His)₆-Fusion keine scharfen Banden aus. Zusammen mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie (Tabelle 3.2) lässt dies den Schluss zu, dass die Proteine mit angehängter N-terminaler (His)₆-Fusion erst einen stabilen Faltungszustand erreichen, wenn diese mit Thrombin entfernt wurde.

Auf jeden Fall sollten Polyhistidin-Fusionen bei der Analyse von Protein – Protein Interaktionen vermieden werden, wie der Bericht von Wu *et al.* (1999) zeigt. Die Autoren arbeiteten mit einem Protein, welches als Dimer an „inverted half-repeats“ (IRs) im Operator seines eigenen Genes (*pir*) bindet. Durch einen einzigen Aminosäureaustausch verlor das Protein seine Fähigkeit zu dimerisieren und an IRs zu binden. Mutiertes und mit einer (His)₆-Fusion exprimiertes Protein jedoch dimerisierte und band an IRs. Auf Grund dieses Ergebnisses warnten die Autoren davor, Proteine mit Polyhistidin-Fusion zur Untersuchung von Protein-Oligomerisierung einzusetzen.

Es wurde festgestellt, dass das N Protein nach Zugabe von nur 2.5 mM CaCl₂ sofort ausfällt. Calcium hat bei vielen Viren einen Einfluss auf den Nukleokapsidaufbau. So geschieht bei TMV die Entkapsidierung („uncoating“) nach Eintritt in die Zelle als Folge der niedrigen intrazellulären Calcium- und Protonenkonzentration, verglichen mit der extrazellulären Umgebung. Dadurch wird die elektrostatische Abstossung zwischen den in die Ca²⁺- und H⁺-Bindung involvierten negativ geladenen Gruppen erhöht, was zellulären Ribosomen erlaubt, kompetitiv an die virale RNA zu binden und mit der Translation zu beginnen (Caspar *et al.* 1990; Pattanayek *et al.* 1992). Auch viele Hüllproteine ikosaedrischer RNA-Viren besitzen vorhergesagte Ca²⁺-Bindestellen (Callaway *et al.* 2001). Beim Turnip Crinkle Carmovirus (TCV) binden jeweils zwei Hüllproteine ein einzelnes Calcium-Ion (Lin *et al.* 1999). Im Gegensatz zu TMV ist bei TSWV nach dem Zelleintritt keine Entkapsidierung notwendig, da die RNPs und nicht etwa reine RNA von der RdRp abgelesen werden. Vielleicht spielen Calcium-Ionen auch in der Homopolymerisierung des TSWV N Proteins eine Rolle.

Wir halten fest, dass die Untersuchungen zur Homopolymerisierung die Ergebnisse von Uhrig *et al.* (1999) grösstenteils unterstützen und erweitern. Es wurde jedoch festgestellt, dass die N-terminale Multimerisierungsdomäne des N Proteins komplexer ist als bislang vermutet. Mittels Gelfiltration und der neu zur Analyse eines Pflanzenvirus angewandten BN-PAGE wurden Tetramer und Trimer als dominante Oligomerisierungszustände des N Proteins identifiziert, welche Übergangszustände in der Enkapsidierung darstellen könnten. Dimer wurde nur in sehr geringen

Mengen gefunden. Ausserdem wurde festgestellt, dass nativ aus *E. coli* gereinigtes N Protein Nukleinsäure enthält, bei der es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um *E. coli* RNA handelt. Diese RNA konnte nicht entfernt werden und ist nicht für die beobachtete Komplexbildung des N Proteins verantwortlich.

4.3 Charakterisierung der RNA-Bindungseigenschaften des TSWV Nukleokapsidproteins

Nukleokapsidproteine besitzen wichtige Funktionen in der Regulation der viralen Infektion (vgl. Kap. 1.4). Erstens bildet das TSWV N Protein zusammen mit den genomischen RNA-Molekülen das Nukleokapsid (de Haan *et al.* 1990), welches von der viralen Polymerase (RdRp) abgelesen wird. Zweitens nimmt man wie bei anderen *Bunyaviridae* (Bishop 1990) an, dass das TSWV N Protein einen wichtigen Teil des Polymerase-Komplexes darstellt und das Umschalten der Polymerase von Transkription zu Replikation steuert (Steinecke *et al.* 1998). Drittens wird eine Interaktion zwischen dem Glykoprotein G₂ und dem N Protein vermutet, die zur Entstehung der reifen Viruspartikel führt (Goldbach 1996).

In Kapitel 1.5.1 wurde definiert, wie die Begriffe Enkapsidierung und Assemblierung in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, da diese in der Literatur in verschiedenen Zusammenhängen benutzt werden. Die klassischen Arbeiten zur Enkapsidierung des positivsträngigen Tabak Mosaik Virus (TMV) wurden in Kapitel 1.5.2 vorgestellt. Ausserdem wurden im Kapitel 1.5.3 Organisation und Aufbau von Influenza A (Familie der *Orthomyxoviridae*) erläutert. Besonders die Ergebnisse der Influenza-Forschung sind im Hinblick auf TSWV wertvoll, da diese Viren einige Ähnlichkeiten aufweisen und das Grippevirus sehr gut erforscht ist. Daher wird auch in diesem Kapitel nochmals auf Influenza eingegangen. Ausserdem werden hier die neuesten Ergebnisse zur Enkapsidierung von Viren der Genera *Hantavirus* und *Bunyavirus* (Familie der *Bunyaviridae*) vorgestellt und im Rahmen der Ergebnisse diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Enkapsidierung der viralen und viral-komplementären RNA von TSWV durch das N Protein untersucht. Durch N Protein – RNA Interaktionsversuche wurde analysiert, ob bestimmte RNA-Substrate spezifisch gebunden werden. Ausserdem wurden die RNA-Bindungsaffinitäten von Mutanten des N Proteins bestimmt. Weshalb wurde die Existenz spezifischer N Protein – RNA Interaktionen vermutet? Es muss eine Unterscheidung zwischen genomischer (v) und antigenomischer (vc) viraler RNA einerseits sowie viraler und zellulärer mRNA andererseits stattfinden, damit nur v und vc RNA enkapsidiert wird. Der Enkapsidierungsprozess sollte effizient sein. Es gibt zwar seltene Fälle, in denen spät in der Infektion mit N Protein assoziierte mRNA gefunden wurde (Raju *et al.* 1987; Grubman *et al.* 1977; Rosen *et al.* 1982). Die Enkapsidierung der S mRNA von La Crosse (Gattung *Bunyavirus*), welche für das Nukleokapsidprotein codiert, wurde als ein Mechanismus zur Kontrolle der N Protein Synthese (sowie der NSs-Synthese, denn N und NSs ORFs überlappen im Fall von La Crosse)

interpretiert (Raju *et al.* 1989). Im Gegensatz zur Enkapsidierung von Genom und Antigenom ist die Enkapsidierung der S mRNA ein relativ langsamer Prozess (Hacker *et al.* 1989). Weil der enkapsidierten S mRNA etwa 100 Nukleotide am 3' Ende fehlen, schlugen die Autoren vor, dass der „Origin of Assembly“ am 5' Ende von Genom und Antigenom liegt.

Enkapsidierte TSWV mRNA wurde bisher nicht gefunden und die Enkapsidierung der viralen RNAs und deren viral-komplementären Replikationsintermediate durch das Nukleokapsidprotein N erfolgt zuverlässig in der infizierten Zelle (Kormelink *et al.* 1992). Die Arbeitshypothese besteht darin, dass das Enkapsidierungssignal (oder die Enkapsidierungssignale) in einer nichtkodierenden Region auf der genomischen und antigenomischen RNA liegt, da sich mRNA und genomische RNA darin unterscheiden. In Frage kommen 5' und 3' Ende sowie die intergenischen Regionen, welche allerdings bei der L RNA fehlen. Daher konzentrierte sich die Suche auf die Enden der genomischen und antigenomischen S RNA. Allerdings ist seit der Publikation von Duijsings *et al.* (2001) klar, dass sich die TSWV S mRNAs am 5' Ende mit Ausnahme des äussersten Nukleotides nicht von der genomischen RNA unterscheiden. Doch es kann vermutet werden, dass die angehängte zelluläre „cap“-Struktur die Sekundärstruktur des 5' Endes der mRNA so verändert, dass ein eventuell am 5' Ende der genomischen RNA vorhandenes Verpackungssignal maskiert würde.

Basierend auf GEMSAs mit dem 198 Basen langen panS-Konstrukt wurde eine spezifische Bindung des TSWV N Proteins an die „Panhandle“ postuliert (Minke 1998). Die Experimente mit dem verwendeten pQEC-N(His)₆ Protein wurden wiederholt und es zeigte sich, dass die beobachtete scharfe Bande nicht auf einer stabilen Protein – RNA Interaktion beruhte, sondern eine andere (vermutlich aufgeschmolzene) Konformation der panS RNA darstellte. Die besagte Bande konnte auch mit anderen, nicht als Nukleinsäure bindend beschriebenen Proteinen herbeigeführt werden (vgl. Abb. 3.10). Ausserdem wurde eine unspezifische RNA-Bindungsfähigkeit von Kontrollproteinen mit (His)₆-Fusion festgestellt. Daher wurde für weitere GEMSAs nur noch N Protein (und Mutanten) ohne Polyhistidin- oder andere Fusion verwendet.

Lässt sich die unspezifische Interaktion der (His)₆-Fusion mit RNA chemisch erklären? Für Gel-Retardations-Assays (GEMSAs) wurde 1x TBP als Probenpuffer und 0.5x TB als Laufpuffer verwendet (vgl. Kap. 2.2.17). Es wurde ein pH von 8.6 gemessen. Eine ionische Wechselwirkung scheint nicht vorhanden zu sein, denn die polare Seitenkette von Histidin hat einen pK_R von ca. 6.1 (Imidazolring). D.h. bei pH 8.6 liegt der Imidazolring grösstenteils ungeladen vor. Mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung kann das Verhältnis der ungeladenen Form von Histidin (N) zur protonierten Form (NH⁺) berechnet werden:

$$[N] / [NH^+] = 10^{\text{pH}-\text{pK}} = 10^{8.6-6.1} = 10^{2.5} = 316 : 1 \quad (\text{pH im GEMSA: } 8.6; \text{ pK}_R = 6.1)$$

Damit liegt nur etwa ein Imidazolring von 316 positiv geladen vor und eine triviale Erklärung der unspezifischen RNA-Bindungsfähigkeit der untersuchten Proteine mit einer Polyhistidin-Fusion scheidet damit aus.

Der pI des TSWV N Proteins liegt bei 9.8 (vgl. Kap. 1.2), womit das Protein also im GEMSA positiv geladen vorlag und mit der negativ geladenen RNA interagieren konnte. Richmond *et al.* (1998) benutzten einen modifizierten Puffer von Gött *et al.* (1993): 10 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.05 mM EDTA, 0.2 mM Dithiothreitol (DTT). Dies sind sehr niedrige Salzmengen, die es fraglich erscheinen lassen, ob das N Protein überhaupt stabil vorliegen konnte. Der ursprünglich von Gött *et al.* (1993) für Bindungsstudien mit dem Hantavirus N Protein verwendete Puffer bestand aus 10 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA und 2 mM DTT. Ausserdem setzten Richmond und Kollegen 10 Einheiten rRNasin RNase-Inhibitor (Promega) ein. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf RNase-Inhibitoren verzichtet, weil beobachtet wurde, dass diese die Laufeigenschaften von RNA beeinflussen können (Daten nicht gezeigt). Wie bereits in der Einleitung (Kap. 1.4) erwähnt wurde, fanden Richmond *et al.* (1998) eine allgemeine ssRNA-Bindungsfähigkeit des TSWV N Proteins und postulierten eine kooperative Bindung, die allerdings nicht durch biophysikalische Daten untermauert wurde. Doppelsträngige RNA wurde nicht gebunden. Das für Gel-Retardations-Assays eingesetzte N Protein wurde heterolog in *E. coli* mit einer N-terminalen $(His)_6$ -Fusion exprimiert. Die konservierten genomischen Enden, welche „Panhandle“-Strukturen ausbilden können, wurden von den Autoren nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die generelle ssRNA-Bindungsfähigkeit des N Proteins sowie eine extrem niedrige Affinität für dsRNA bestätigt. Die unspezifische RNA-Bindungseigenschaft des TSWV N Proteins könnte z.B. durch die Interaktion von basischen Aminosäuren mit dem Phosphat-Rückgrat der RNA erklärt werden. Das N Protein hat mehrere Anhäufungen basischer Aminosäuren. Vor allem die Arginine an den Positionen 94, 95, 101 und 103 (vgl. Abb. 1.6) wären Kandidaten dafür, denn deren Seitenketten besitzen einen hohen pK_R von 12.5.

Das Verschwinden der N Protein – RNA Komplexe in GEMSA (vgl. Abb. 3.11) kann durch den hohen pI des N Proteins (w_t N: 9.76) erklärt werden. Die Nettoladung wird durch Bindung von N Proteinen positiv, so dass die Komplexe nicht mehr zur Anode laufen. Da die Bindung des N Proteins an RNA ein kooperativer Vorgang ist, können kaum Übergangskomplexe gesehen werden. Wenn es sich um RNase in den N Proteinpräparationen handeln würde, sähe man niedrigmolekulare Abbauprodukte. Ausserdem wurden bei einem GEMSA mit vertauschter Polarität bei grossen Mengen N Protein hochmolekulare Komplexe in den Geltaschen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die mit der Doppelpunktmutanten N F242_246A (ohne Hexahistidin-Fusion) gebildeten Komplexe waren in den Geltaschen sichtbar (vgl. z.B. Abb. 7.3 (Q)). Dies wird darauf zurückgeführt, dass sich das mutierte Protein wegen seiner beeinträchtigten Homopolymerisierung weniger dicht an der RNA aufreihet. Dadurch erhält ein RNA-Molekül weniger positive Ladung als wenn es Wildtyp N Protein gebunden hätte und entfernt sich nicht vollständig aus dem Gel. Es sieht so aus, als ob in diesem Fall die Nettoladung 0 wäre, weil die Komplexe überhaupt nicht wandern. Das verwendete N Protein ohne $(His)_6$ -Fusion besitzt beim in GEMSA herrschenden pH von ca. 8.6 eine Nettoladung von +6 (32 K, 7 R, 16 D, 17 E; H ist neutral). Nukleinsäure besitzt pro

Nukleotid eine negative Ladung. Daraus kann man schliessen, dass je sechs Nukleotide von einem N F242_246A Protein gebunden werden. Für die üblicherweise verwendeten 198 b langen RNA Konstrukte würde dies 33 N Proteine ergeben. 33 N F242_246A Proteine ohne (His)₆-Fusion haben eine Masse von 972.8 kDa und die panS RNA besitzt ein Molekulargewicht von 67.0 kDa. Damit ergibt sich eine totale Masse von ca. 1040 kDa. Dies stimmt gut mit der in Kapitel 3.8.4 bestimmten Komplexgrösse von ca. 900 kDa überein (Abb. 3.13). Für das Sendai Virus (Familie der *Paramyxoviridae*) wurde die „Sechserregel“ („rule of six“) aufgestellt, welche besagt, dass nur eine effiziente Replikation möglich ist, wenn die totale Nukleotidmenge konserviert oder durch ein Vielfaches von sechs verändert wird (Calain *et al.* 1993). Daraus wurde geschlossen, dass das 57.2 kDa grosse Nukleokapsidprotein genau mit sechs Nukleotiden interagiert. Bei TSWV besteht dieser Zwang zu einer bestimmten Genomlänge allerdings nicht, wie die Sequenzen in den Datenbanken zeigen.

Die spezifische Dichte des La Crosse *Bunyavirus* beträgt 1.31 g/ml und die Nukleokapside bestehen daher etwa aus 96% Protein und 4% RNA (Raju *et al.* 1989). Wenn tatsächlich 33 N F242_246A Proteine ein panS-Molekül binden, ergibt dies ein Verhältnis von 972.8 kDa / 67.0 kDa = 14.52 oder anders ausgedrückt 93.6% Protein und 6.4% RNA. Falls man annimmt, dass für TSWV die gleichen Verhältnisse wie für La Crosse gelten, so ist die errechnete Proteinmenge niedriger als für ein Wildtyp Nukleokapsid erwartet. Dies unterstützt die Annahme, dass die N F242_246A Proteine auf Grund der gestörten Homopolymerisierung lockerer als das Wildtyp N Protein auf der RNA aneinandergereiht sind.

Es wurde auch ausgerechnet, wieviele N Proteine (ohne Hexahistidin-Fusion) in GEMSA's für die Retardation von 50% der eingesetzten RNA notwendig sind. Bei Verwendung des wt N Proteins mussten Protein und RNA im Verhältnis 20 : 1 eingesetzt werden, um 50% der 5'end RNA zu retardieren. Bei der 3'end RNA betrug das Verhältnis 30 : 1 und bei panS 29 : 1. Bei Verwendung der Doppelpunktmutanten N F242_246A mussten Protein und RNA im Verhältnis 9 : 1 eingesetzt werden, um 50% der 5'end RNA zu retardieren. Bei der 3'end RNA betrug das Verhältnis 13 : 1 und bei panS 20 : 1. Diese Zahlen liegen wiederum in der gleichen Grössenordnung wie die oben errechneten: Wenn man für N F242_246A die doppelte Proteinmenge für eine vollständige RNA-Bindung annimmt (was natürlich auf Grund der Sättigungskinetik nicht ganz korrekt ist), so erhält man ein Verhältnis N F242_246A : pan S RNA = 40 : 1. Das ist fast der gleiche Wert wie der oben errechnete von 33 : 1.

Nukleokapside von TSWV wurden mittels „Atomic Force Microscopy“ (Atomare Kraftmikroskopie, AFM) untersucht (Kellmann *et al.* 2001). Die luftgetrockneten RNPs waren als regelmässig geformte Ringe sichtbar (Abb. 4.2), welche den vorgeschlagenen pseudozirkulären bzw. „Panhandle“-Strukturen ähneln. Sie konnten in drei Grössen klassifiziert werden, welche den genomischen Segmenten S, M und L entsprechen. Die viralen Enden scheinen basengepaart zu sein, obwohl die Polymerase offensichtlich weggeschwemmt wurde. Abbildung 4.2 (A) zeigt links eine Beispielaufnahme und rechts eine schematische Interpretation davon. Die weisse Pfeilspitze zeigt auf den Ort der vermuteten „Panhandle“. In Abbildung 4.2 (B) sind Höhenprofile gezeichnet, welche den drei farbigen Linien in (A) entsprechen (Kellmann 2001). Das Profil, welches durch den vermuteten „Panhandle“-Bereich verläuft, ist blau eingezeichnet. Die Einschnürung ist deutlich zu erkennen.

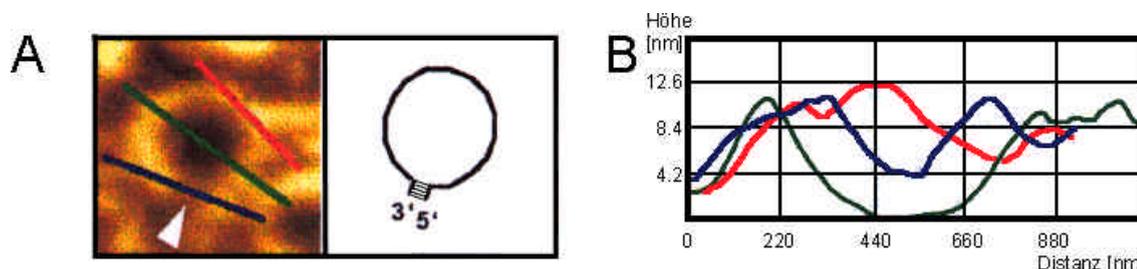


Abb. 4.2 Untersuchung der Grösse eines einzelnen TSWV Nukleokapsids mittels „Atomic Force Microscopy“ (AFM; verändert nach Kellmann *et al.* 2001).

- (A) Links ist ein isoliertes TSWV Nukleokapsid abgebildet. Die weisse Pfeilspitze weist auf eine Konstriktion hin, wie sie bei vielen Nukleokapsiden gefunden wurde. Die Autoren spekulierten, dass diese Einschnürung den „Panhandle“-Bereich darstellt, wie er rechts in der schematischen Darstellung zu sehen ist. Das virale 5' und 3' Ende sind angeschrieben.
- (B) Drei Höhenprofile, den farbigen Linien in (A) entsprechend.

Tabelle 4.1 stellt die von Kellmann *et al.* (2001) mittels AFM gemessenen Längen der TSWV RNPs im Kontext dieser Arbeit dar. Die Autoren fanden für die drei genomischen RNPs unterschiedliche Verhältnisse von Nukleotiden pro Längeneinheit, was als „coiled“ oder „supercoiled“ Formen interpretiert wurde. Die Höhe der RNPs wurde zu 7 bis 25 nm bestimmt. Ein sphärisches Protein von 26 kDa Molekulargewicht hat etwa einen Durchmesser von 4 nm (Young-Tae Chang, New York University). Wenn der Durchmesser des TSWV N Proteins gleich 4 nm gesetzt wird, so erhält man für das S Segment ein Verhältnis von 22 N Proteinen pro 198 b RNP-Abschnitt. Wiederum passt diese Zahl sehr gut zu den oben präsentierten Werten.

Tabelle 4.1 Interpretation der AFM-Daten von Kellmann *et al.* (2001). Die Autoren fanden für die drei genomischen TSWV-Segmente verschiedene Verhältnisse von Anzahl Nukleotide zu Nukleokapsidlänge. Es wurde berechnet, wieviele N Proteine in einem TSWV RNP von 198 b Länge enthalten wären, wenn für das N Protein ein Durchmesser von 4 nm angenommen wird.

Länge der genomischen RNA-Segmente	Durchschnittliche Partikellänge	Anzahl N Proteine, wenn \varnothing (N) = 4 nm	Länge von 198 b RNP	Nukleotide : N	Anzahl N Proteine für RNP-Abschnitt von 198 b
2916 nts (S)	1300 nm	325	88.27 nm	9 : 1	22
4821 nts (M)	1750 nm	438	71.87 nm	11 : 1	18
8897 nts (L)	2200 nm	550	48.96 nm	16 : 1	12

Das Bunyamwera Virus (BUN) ist der Prototyp sowohl der Familie der *Bunyaviridae* als auch der Gattung *Bunyavirus*. Das 27 kDa grosse BUN N Protein zeigt keine Sequenzähnlichkeit mit den *Hantavirus* oder *Tospovirus* N Proteinen. Wie die analogen Nukleokapsidproteine aller Mitglieder der *Bunyaviridae* Familie enthält es keine Konsensus RNA-Bindedomäne (Elliott 1996). Das Genom von BUN ist nicht „ambisense“, sondern bloss negativsträngig. Die ORFs von *NSs* und *N* sowie von *NSm* und *G2/G1* überlappen (Elliott 1990).

Die RNA-Bindungseigenschaften des BUN N Proteins wurden von Osborne *et al.* (2000) untersucht. Das Protein wurde als N-terminale (His)₆-Fusion in *E. coli* exprimiert und nativ gereinigt. Abbildung 4.3 zeigt die RNA-Moleküle, welche für Bindungsversuche verwendet wurden.

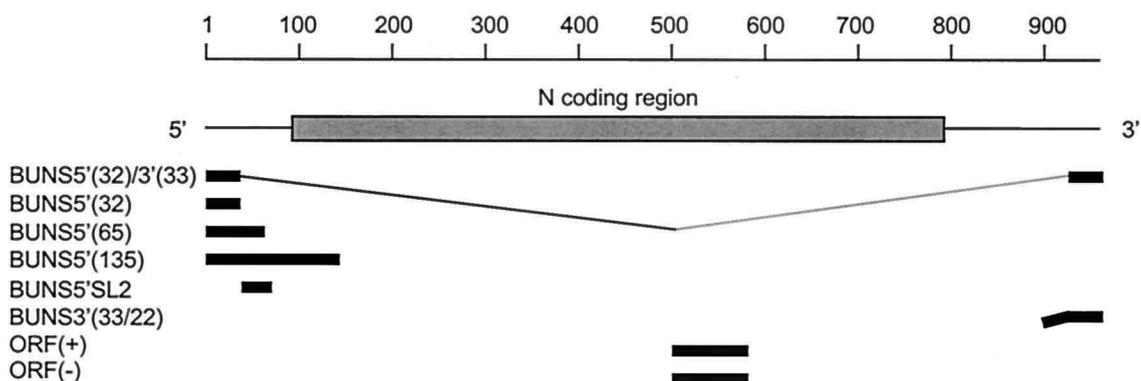


Abb. 4.3 RNA-Moleküle, welche Abschnitte der Bunyamwera (BUN) S RNA repräsentieren und von Osborne and Elliott (2000) für Bindungsversuche benutzt wurden.

Die Bildung von Protein – RNA Komplexen wurde in Anwesenheit von bis zu 0.5 M NaCl nicht gestört. Bei höheren Salzkonzentrationen schienen die Komplexe immer noch intakt zu bleiben, aber die Radioaktivität schmierte auf den Polyacrylamidgelen. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit mit Filterbindungsversuchen festgestellt, dass in Anwesenheit von 0.5 M NaCl (zusätzlich zum Bindungspuffer 1x TBP) 60% der *in vitro* mit Wildtyp N Protein gebildeten Komplexe aufgelöst wurden (Abb. 3.15 (A)). Gemäss Richmond *et al.* (1998) reichten 0.6 M NaCl aus, um die N Protein – RNA Interaktion zu inhibieren. Dies deutet auf elektrostatische Interaktionen zwischen TSWV N und RNA hin (vgl. Kap. 1.4).

Die RNA in Bunyavirus Nukleokapsiden ist gegen geringe Mengen an RNase resistent (Hacker *et al.* 1989; Kolakofsky *et al.* 1991), wird aber durch 100 µg RNase A pro ml verdaut (Obijeski *et al.* 1976). Osborne *et al.* (2000) konnten für *in vitro* gebildete Protein – RNA Komplexe eine gewisse RNase-Resistenz zeigen. Sie inkubierten BUNS5'(32)/3'(33) RNA (vgl. Abb. 4.3) mit N Protein und RNase A während 10 Minuten bei 37°C. Dabei verwendeten sie allerdings 20 U RNasin RNase Inhibitor (Promega), um in der N Protein Lösung vorhandene RNasen zu inhibieren. So fanden sie eine Resistenz von bis zu 1 µg RNase A pro ml, währenddessen die Komplexe gegen 2.5 µg/ml oder höhere Konzentrationen nicht mehr resistent waren. Dies entspricht etwa den Ergebnissen mit TSWV: Die *in vitro* gebildeten Komplexe mit TSWV wt N und 3'end RNA waren nach 15minütiger Inkubation in Anwesenheit von 10 µg/ml RNase A noch zu ca. 90% intakt (vgl. Abb. 3.15).

In dieser Arbeit wurde eine höhere Affinität zum 5' Ende als zum 3' Ende der TSWV S RNA oder anderen viralen und nichtviralen Kontroll-RNAs gefunden, und dies sowohl mit Wildtyp N Protein als auch mit Mutanten. Zur schneller wandernden Bande von panS wurde eine vergleichbar hohe Affinität beobachtet. Ausserdem war zum Konstrukt panS3'-24 eine höhere Affinität als zu panS5'-24 zu erkennen (Abbildung 3.14 und Tabelle 3.6). Dies deutet darauf hin, dass die terminalen 24 Nukleotide der 5' RNA eine Bedeutung in der spezifischen Interaktion spielen. Es wurde auch gezeigt, dass die Konstrukte 5'end_40-235 und 5'end_77-272 nicht gut gebunden werden. Diese Ergebnisse wurden durch Filterbindungsversuche bestätigt. Für die vcRNA konnte keine Sequenz mit hochaffiner N Protein-Bindung gefunden werden. Das 5'endvc Konstrukt wurde jedoch besser von N Protein gebunden als das 3'endvc Konstrukt (Abb. 3.14).

Aus den erwähnten Beobachtungen kann der Schluss gezogen werden, dass die ersten 39 Nukleotide am 5' Ende der TSWV S RNA eine Sequenz enthalten, die eine speziell hohe Affinität zum N Protein aufweist. Dabei ist die Anwesenheit der terminalen 24 Nukleotide essentiell. Es wird postuliert, dass es sich bei dieser Region um den „Origin of Assembly“ handelt, von dem aus die Enkapsidierung startet.

(Osborne *et al.* 2000) fanden für die ersten 65 Nukleotide des 5' Endes von BUN S RNA die stärkste Affinität zum N Protein. Die Autoren vertraten ebenfalls die Ansicht, dass dieser Teil der S RNA in den Enkapsidierungsprozess involviert ist. Aus der Bindungskinetik der BUNS5'(32)/3'(33) RNA wurde eine Dissoziationskonstante K_d (halbmaximale Bindung) von 70 nM berechnet. Mittels eines Hill Plots wurde festgestellt, dass es sich um eine leicht kooperative Bindung handelte (Gradient = 1.2). Eine Analyse der BUNS5'(65) RNA ergab ähnliche Werte.

Die Dissoziationskonstante K_d entspricht der N Proteinkonzentration, welche notwendig ist, um eine Halbsättigung zu erreichen. Dabei wird angenommen, dass die Komplexbildung einem einfachen bimolekularen Gleichgewicht entspricht. Dies entspricht kaum der Realität. In dieser Arbeit wird von zwei Bindungsreaktionen ausgegangen: Einer ersten, spezifischen am „Origin of Assembly“, der unspezifische Bindung folgt. Damit handelt es sich also nicht um eine bimolekulare Reaktion. Trotzdem wurden K_d -Werte berechnet, um überhaupt eine Diskussionsgrundlage zu erarbeiten. Dies wird in der Literatur allgemein so gehandhabt.

Die Interpretation von Filterbindungsdaten setzt voraus, dass die gebildeten Protein – RNA Komplexe während des Filtrationsprozesses nicht dissoziieren. Eine zweite Annahme besteht darin, dass das Plateau (der gebundenen Radioaktivität) die komplette Bindung des RNA-Substrates repräsentiert. Aus diesen Gründen wurden nicht aus Gelfiltrationsdaten (von denen ein Teil in Abb. 3.14 dargestellt ist) die Dissoziationskonstanten und Hill-Koeffizienten ausgerechnet, sondern aus GEMSAs (vgl. Tabelle 3.6). Bei GEMSAs lässt sich 100% RNA direkt aus der freien RNA-Bande (ohne Protein) quantifizieren, und die Zunahme der gebundenen RNA kann aus der Abnahme der freien RNA berechnet werden.

Die Auswertung der GEMSAs ergab Dissoziationskonstanten von $K_d \geq 500$ nM (vgl. Tabelle 3.6). Für die Interaktion N F242_246A – 5'end wurde ein K_d -Wert von 500 nM berechnet. Ausserdem

wurden sowohl nicht-kooperative als auch kooperative Bindungen gemessen. (Minke 1998) fand in Filterbindungsversuchen mit „pQEC“ exprimiertem N-(His)₆ Protein Halbtitrationswerte von 300 nM N Protein für vier verschiedene virale und nichtvirale RNA-Substrate.

Es ging aus Gelfiltrationsexperimenten (Kap. 3.5) und BN-PAGE Gelen (Kap. 3.6) hervor, dass die Punktmutanten und allen voran N F242_246A höhere Monomeranteile besitzen als das Wildtyp N Protein. Von diesen Proteinen musste in GEMSA's weniger eingesetzt werden, um eine Retardation zu erreichen. Daraus wird die Vermutung abgeleitet, dass das Monomer die höchste RNA-Bindungs-fähigkeit besitzt und vermutlich die Enkapsidierung der viralen RNA startet. Dies heisst also nicht, dass die Punktmutanten höhere Affinitäten zur RNA besitzen. In einer bestimmten molaren Menge N F242_246A Protein ist wesentlich mehr „aktives“, d.h. für RNA zugängliches Protein vorhanden als in der gleichen Menge Wildtyp N Protein. Der hohe Anteil an nicht RNA-bindungsfähigem Protein erklärt auch die relativ hohen für die N Protein – RNA Interaktion berechneten Dissoziationskonstanten. Ausserdem liegt vermutlich nur wenig N Protein vor, das keine *E. coli* RNA gebunden hat oder aber es handelt sich bei diesen GEMSA's eigentlich um Konkurrenzexperimente, weil die radioaktiv markierte RNA die gebundene *E. coli* RNA (vgl. Kap. 3.4) verdrängen muss.

Im Gegensatz zur Gattung *Tospovirus* gibt es bei Mitgliedern der Gattung *Hantavirus* weder ein NSs noch ein NSm Gen (Elliott 1990) und damit auch keine intergenischen Regionen. Es wurde spekuliert, dass die Funktionen von NSs bei Viren der *Hantavirus* und *Nairovirus* Genera vom relativ grossen N Protein übernommen werden (Simons *et al.* 1992). Wie das BUN N Protein unterscheidet sich auch das Hantaan N Protein (48 kDa) deutlich in der Aminosäuresequenz von *Tospovirus* N Proteinen (Schmaljohn 1996).

Eine allgemeine RNA-Bindungs-fähigkeit des Hantaan Virus (HTNV) N Proteins wurde von Gött *et al.* (1993) gezeigt. Eine erste genauere Untersuchung der HTNV N Protein – RNA Interaktion wurde von Severson *et al.* (1999) durchgeführt. Die Dissoziationskonstante K_d der Interaktion wurde unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Eine Erhöhung der NaCl- und Mg²⁺-Menge hatte wenig Einfluss auf den K_d . Allerdings zeigte das HTNV N Protein mit steigender Ionenstärke und in Gegenwart von Mg²⁺ eine erhöhte Spezifität für die vRNA (verglichen mit dem S ORF), d.h. die Affinität des HTNV N Proteins zu nichtviraler RNA war stark reduziert. Im Gegensatz dazu wurde der Zusammenbau von Sin Nombre Virus (Gattung *Hantavirus*) N Protein – HTNV vRNA Komplexen durch die Zugabe von Mg²⁺ oder durch Erhöhung der Ionenstärke inhibiert. Für das S Segment ORF waren die K_d -Werte für die HTNV und Sin Nombre Virus N Proteine nahezu identisch. Die Autoren schlugen ein Modell vor, in dem die nichtkodierenden Bereiche der vRNA spezifisch von HTNV N erkannt werden.

Erst kürzlich wurde eine spezifische Interaktion zwischen dem HTNV N Protein und Sequenzen am 5' Ende der S Segment vRNA vorgeschlagen (Severson *et al.* 2001). In einem UV-Crosslinking Versuch fanden die Autoren eine erhöhte Bindungsaffinität von N zur HTNV vRNA, verglichen mit einer ORF RNA (ohne 5' und 3' flankierende Sequenzen), einer „minipan“ RNA und einer RNA,

welcher die terminalen 12 nt am 5' Ende der nichtkodierenden Region fehlten. Filterbindungsversuche führten zu ähnlichen Ergebnissen. In GEMSAs wurde die schwächste Protein - RNA Interaktion mit dem Duplex-Substrat („minipan“) gefunden, die stärkste ($K_d = 132$ nM) mit dem 5' Ende Konstrukt, welches die ersten 39 Nukleotide umfasste. Die Dissoziationskonstanten für die anderen viralen RNAs waren mindestens zweimal grösser. Daraus schlossen die Autoren, dass die wichtigste Bindungsdeterminante des S Segments am 5' Ende liegt. Für die spezifische Bindung des Sin Nombre Virus (SNV) N Proteins an die ersten 39 Nukleotide am 5' Ende der SNV vRNA wurde eine sehr ähnliche Dissoziationskonstante von $K_d = 140$ nM berechnet (Jonsson *et al.* 2001).

Das Influenza Virus Nukleoprotein bindet ssRNA mit hoher Affinität ($K_d \approx 20$ nM) aber wenig oder gar keiner Sequenzspezifität (Scholtissek *et al.* 1971; Kingsbury *et al.* 1987; Yamanaka *et al.* 1990; Baudin *et al.* 1994; Digard *et al.* 1999). Damit steht dieses Protein im Gegensatz zu den N Proteinen der Familie *Bunyaviridae*, welche zusätzlich zur unspezifischen ssRNA-Bindungsfähigkeit eine präferentielle Bindung von Sequenzen des 5' Endes zeigen (diese Arbeit, Osborne *et al.* 2000; Severson *et al.* 2001).

Auf Grund der vorgestellten Daten von BUN, HTNV und TSWV wird hier die Hypothese aufgestellt, dass der „Origin of Assembly“ des genomischen S Segmentes bei allen Mitgliedern der *Bunyaviridae* Familie am 5' Ende liegt und nicht nur aus dsRNA besteht. Für die HTNV S RNA wurde eine „Stem-Loop“ Struktur als möglicher „Origin of Assembly“ vorgeschlagen (Severson *et al.* 2001; Abb. 4.4 (C)). In Abbildung 4.4 (A) wird eine „Stem-Loop“ Struktur gezeigt, welche mit MFOLD (Walter *et al.* 1994) für die 5'-terminalen 39 Nukleotide der TSWV S RNA berechnet wurde. Analog dazu ist in (B) die energetisch günstigste Struktur der 5'-terminalen 39 Nukleotide der TSWV M RNA gezeigt. Für das L-Segment wurde keine ähnliche Sekundärstruktur gefunden. Die Abbildung 4.4 (D) zeigt die 39 terminalen Nukleotide des 5' Endes der viral-komplementären TSWV S RNA. Auch hier wurde eine „Stem-Loop“ Struktur gefunden. Die Berechnung der TSWV-Strukturen erfolgte für $T=20^\circ\text{C}$, diejenige der HTNV-Struktur für $T=37^\circ\text{C}$. Diese „Stem-Loops“ könnten den „Origin of Assembly“ darstellen, d.h. die Sequenz, an die das erste Nukleokapsid-Monomer bindet, um die Verpackung der genomischen RNA zu starten.

Nach der Bindung eines N Protein Monomers an den „Origin of Assembly“ werden die nächsten N-Monomere vermutlich über Protein-Protein Interaktionen an die RNA herangeführt, welche sie dann zwar unspezifisch aber stark binden. Es ist auch denkbar, dass nicht Monomere, sondern die in BN-PAGE und Gelfiltrationen gefundenen trimeren und tetrameren Komplexe die Enkapsidierungsreaktion fortsetzen.

Obwohl die GEMSAs mit pQEC-N(His)₆ auf Grund der C-terminalen Hexahistidin-Fusion vorsichtig interpretiert werden müssen (vgl. Kap. 3.8.2), sehen die mit 5'end RNA erzielten Ergebnisse doch sehr interessant aus (Abb. 7.2). Bereits in Anwesenheit von wenig N Protein beginnt die Bande zu retardieren, und zwar handelt es sich nicht um die „scharfe“ Umwandlung,

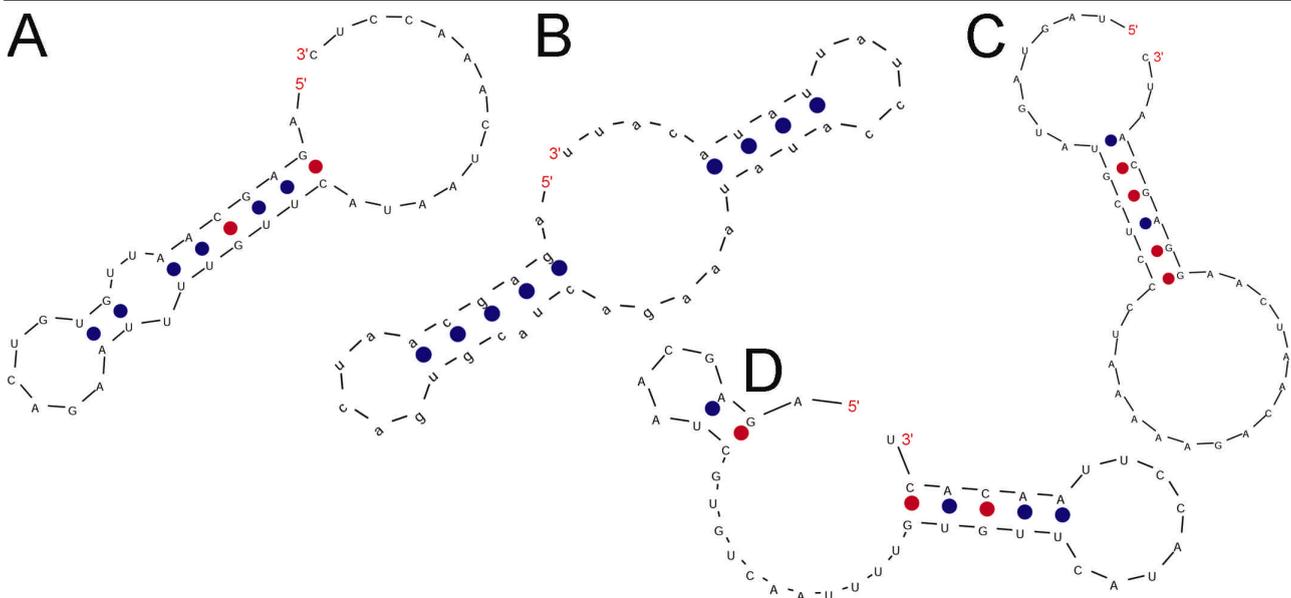


Abb. 4.4 „Stem-Loops“ an den äussersten 5' Enden der TSWV S RNA **(A)**, TSWV M RNA **(B)** und der Hantaan Virus (HTNV) S RNA **(C)**. Abbildung **(D)** zeigt das 5' Ende der viral-komplementären TSWV S RNA. Die jeweils 39 Nukleotide umfassenden Strukturen wurden mit MFOLD (Walter *et al.* 1994) berechnet. Es sind die energetisch günstigsten Zustände gezeigt. Für die TSWV-Strukturen wurde eine Temperatur von 20°C gewählt. Die Struktur in (C) stammt aus Severson and Jonsson (2001) und wurde für T=37°C berechnet.

welche bei panS beobachtet wurde. Es ergibt sich die Frage, ob man hier das schrittweise Binden von N Protein Monomeren an die RNA beobachten kann.

Die Frage, ob die Homopolymerisierung des N Proteins und dessen RNA-Bindung voneinander unabhängige oder gekoppelte Vorgänge sind, konnte nicht abschliessend geklärt werden, da selbst die Doppelpunktmutante N F242_246A, welche in Heferversuchen keine Selbstinteraktion zeigte, in biochemischen Versuchen (Gelfiltration und BN-PAGE) zum Teil auch als Polymer vorlag. Es hat sich herausgestellt, dass es sich bei F242_246A um eine temperatursensitive Mutante handelt, da die Hefen bei RT wachsen (Christoph Rudolph, pers. Mitteilung). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die RNA am effizientesten durch monomeres N Protein gebunden wird, denn mit dieser Mutanten wurde die kleinste Dissoziationskonstante und damit die stärkste Bindung gemessen (Tabelle 3.6).

Auch für das Bunyamwera Virus (BUN) wird eine „Stem-Loop“-Struktur am 5' Ende der S RNA als Verpackungssignal postuliert (Abb. 4.5; Osborne *et al.* 2000). Das als N-terminale (His)₆-Fusion exprimierte BUN N Protein band am stärksten an die 65 ersten Nukleotide am 5' Ende der S RNA. Die mit einem römischen „I“ bezeichnete Schlaufe ähnelt den sogenannten „Hook“-Strukturen, welche für die 5' Enden von Influenza Virus und Thogoto Virus RNA vorgeschlagen wurden (Flick *et al.* 1996; Leahy *et al.* 1997; Weber *et al.* 1997).

Gel-Retardations-Assays mit den Konstrukten panS (Abb. 3.11) und panSvc zeigten, dass die Spezifität der Protein – RNA Interaktion von der RNA-Faltung abhängt. Es wurde durch denaturierende Analyse mit dem Bioanalyzer gezeigt, dass nur eine IVT-Bande vorlag. Daher müssen die zwei panS- bzw. panSvc-Banden tatsächlich zwei Faltungszuständen entsprechen.

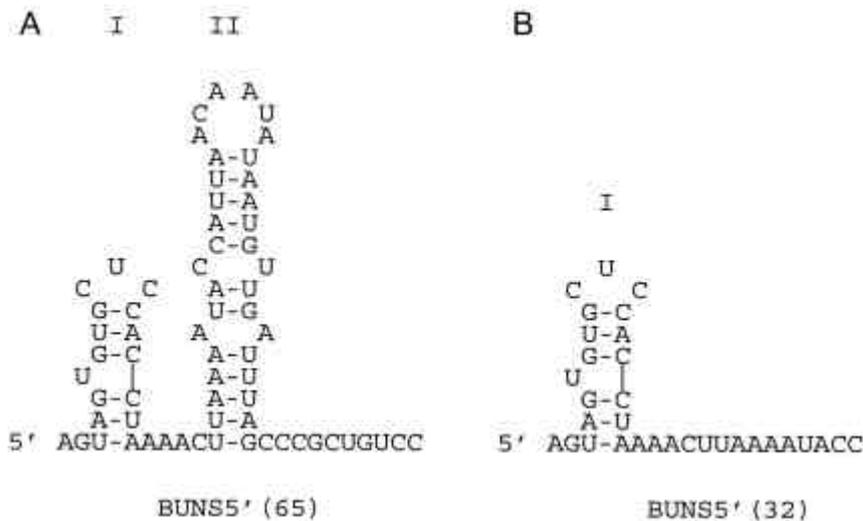


Abb. 4.5 Mit MFOLD (Walter *et al.* 1994) berechnete „Stem-Loops“ am 5' Ende des Bunyamwera (BUN) S RNA Segmentes (Osborne and Elliott 2000). Die energetisch günstigsten Strukturen für $T=37^{\circ}\text{C}$ sind gezeigt.

Die spezifisch gebundene, rascher migrierende Form stellt eine kompaktere Form dar. Hier wird postuliert, dass es sich dabei nicht um die klassische „Panhandle“ (Abb. 3.16 (C) und (E)) handelt, sondern um eine zwar über weite Bereiche basengepaarte, aber am 5' Ende in einem „Stem-Loop“ endende Struktur (Abb. 4.4 (A) und (D)). Dass bei RT

zwei Formen vorlagen verwundert nicht, denn die Schmelztemperatur T_m von panS wurde mittels Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) zu 30°C und die T_m von panSvc zu 26.5°C bestimmt (Minke 1998).

Interessanterweise unterscheiden sich die Enden der viralen Genomsegmente eines Virus stärker als zwischen den gleichen Segmenten unterschiedlicher Viruspezies (Christoph Rudolph, pers. Mitteilung). So sind z.B. die 5'-terminalen 100 Nukleotide des TSWV M Segmentes deutlich näher mit den entsprechenden 5'-terminalen M Segment-Sequenzen von TCSV (Tomato Chlorotic Spot Virus), GRSV (Groundnut Ringspot Virus), CSNV (Chrysanthemum Stem Necrosis Virus) und ZLCV (Zucchini Lethal Chlorosis Virus) verwandt als mit den ersten 100 Nukleotiden am 5' Ende der TSWV S oder L RNA. Dies deutet auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der Viren hin. Andererseits könnten diese Sequenzverwandtschaften auch ein Hinweis auf ähnliche Expressionskontrollen der S, M und L Segmente unterschiedlicher Tospoviren sein. So kann man sich vorstellen, dass die RdRp unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Genomsegmenten hat, womit die Transkription und Replikation differenziert reguliert würden.

Sekundärstrukturberechnungen mit MFOLD sagen für die RNA-Konstrukte 5'end, panS, panSvc und panM einander sehr ähnliche „Stem-Loop“-Strukturen vorher (gelb markierte Bereiche in Abb. 3.16), welche sich weiter von den RNA-Enden entfernt befinden als die eben besprochenen „Stem-Loops“. Zuerst wurde vermutet, diese würden spezifisch vom TSWV N Protein erkannt. Der Vergleich der *in vitro* Transkripte 5'end_40-235 (mit dem vorhergesagten „Stem-Loop“) und 5'end_77-272 (ohne „Stem-Loop“) in GEMSA und Filterbindungsassays erbrachte jedoch keinen Unterschied. Auch ein kurzes *in vitro* Transkript, welches die Nukleotide 40-83 und damit genau den vorhergesagten „Stem-Loop“ am 5' Ende umfasst, wurde nicht besser gebunden als zwei mutierte Varianten davon. Es ist durchaus möglich, dass diese Struktur eine Bedeutung hat, aber vermutlich nicht in der Enkapsidierung. So muss für die Endonuklease-Aktivität der Influenza Virus Polymerase erstens am 5' Ende ein „Stem-Loop“ vorhanden sein, zweitens die Identität von

Nukleotiden an den Positionen 5 und 10 vom 5' Ende konserviert und drittens die „Panhandle“ partiell ausgebildet sein (Leahy *et al.* 2001).

Beim Influenza A Virus (Familie der *Orthomyxoviridae*, Kap. 1.5.3) besitzen alle acht genomischen RNAs an ihren Enden komplementäre Bereiche von 12 bis 13 Nukleotiden (Skehel *et al.* 1978; Desselberger *et al.* 1980), welche „Panhandles“ ausbilden (Hsu *et al.* 1987). Im Gegensatz zu TSWV ist die vRNA des Influenza A Virus nicht in der Lage, einen durchgepaarten Doppelstrang zu bilden (Hatada *et al.* 1997). Der Grund dafür liegt darin, dass in RNA-Molekülen die „non-Watson-Crick“ Basenpaarung G-U möglich ist, während die komplementären Nukleotide Cytosin und Adenosin kein Basenpaar bilden. Beim Influenza Virus ist die Ausbildung der „Panhandle“-Struktur die Voraussetzung für die Transkription der viralen RNA in „gecapte“ mRNA durch die RdRp (Fodor *et al.* 1994; Tiley *et al.* 1994; Hagen *et al.* 1994; Cianci *et al.* 1995).

Für das Influenza Virus wurde folgendes Modell vorgeschlagen, das bereits in Kapitel 1.5.3 unter dem Begriff „Template Modifikations-Hypothese“ angesprochen wurde (weitere Informationen siehe Abb. 1.13): Die dreiteilige Polymerase bildet einen Komplex mit den konservierten vRNA-Enden. Die Nukleoproteine (NPs) binden die virale RNA, wodurch Sekundärstrukturen aufgelöst und die RNA-Basen für die Polymerase zugänglich gemacht werden (Baudin *et al.* 1994; Klumpp *et al.* 1997). Nach chemischer Entfernung der Polymerase konnten die viralen Enden modifiziert werden und lagen trotz der invertiert-komplementären Sequenzen einzelsträngig vor. Das Influenza Virus RNP scheint also von zwei antagonistischen Proteinen aufgebaut zu sein: Das NP schmilzt die RNA-Sekundärstrukturen, löst die „Panhandle“ auf und richtet die Basen so aus, dass sie abgelesen werden können. Der Polymerase-Komplex hingegen hält die zwei genomischen vRNA-Enden zusammen und schützt die Basen. Dieser Antagonismus ist eine ideale Voraussetzung für die Regulation des Wechsels von geschlossener zu geöffneter RNP-Form. Man kann sich vorstellen, dass im geschlossenen Zustand (wenig NP vorhanden) transkribiert wird, weil die mRNAs unvollständige Transkripte sind, welche durch Stottern der Polymerase an der Oligo(U)-Sequenz vor dem konservierten 5' Ende polyadenyliert werden. Im offenen, polymerasefreien Zustand hingegen wären die vRNA-Enden nicht basengepaart und würden vollständig repliziert. Tatsächlich fanden Hsu *et al.* (1987) früh in der Infektion nach „cross-linking“ mit Psoralen vor allem geschlossene Nukleokapside, während später die offenen Formen dominierten. Für TSWV müsste gefordert werden, dass die Polymerase auch an die viral-komplementären „Panhandles“ von S und M RNA bindet, da diese Segmente „ambisense“ sind und deshalb Transkription in beide Richtungen möglich sein muss. Wie bereits gezeigt (Abb. 3.16 (E)) bilden TSWV Antigenome auch tatsächlich – im Gegensatz zu Influenza – „Panhandles“ aus.

Auch die Enden der genomischen und antigenomischen RNA des La Crosse Virus, einem Mitglied der *Bunyaviridae*, liegen partiell doppelsträngig in Nukleokapsiden vor (Patterson *et al.* 1983; Raju *et al.* 1989). Für das Lumbo Virus, ein anderes *Bunyavirus*, wurden ebenfalls „Panhandle“-Strukturen *in vivo* nachgewiesen (Samso *et al.* 1975; Samso *et al.* 1976). Es wurde auch gezeigt, dass die RNPs des Uukuniemi *Bunyavirus* zirkulär sind (Pettersson *et al.* 1975).

Es ist denkbar, dass das TSWV N Protein Nukleinsäure-Chaperone Aktivität hat, wie dies bei Retroviren beschrieben wurde (Rein *et al.* 1998). Dies bedeutet, dass das Nukleokapsidprotein RNA-Moleküle so umstrukturieren kann, dass sie jene Konformation annehmen, welche die maximale Anzahl Basenpaarungen eingeht. Durch einen solchen Mechanismus könnten z.B. an 5' und 3' Ende proximale Basenpaarungen gemacht werden, ähnlich der für Influenza beschriebenen „Korkenzieher-Konformation“ (Flick *et al.* 1999).

Studien mit anderen RNA Viren führten zum Teil zur Identifizierung von RNA Bindedomänen (RBDs). Zum Beispiel hat das N Protein des Tollwutvirus (rabies virus) eine konservierte Region am C-Terminus (aa 298 bis 352), welche vRNA bindet (Kouznetzoff *et al.* 1998; Yang *et al.* 1998). Im Falle des Nukleoproteins von Influenza wurde eine unter den Viren der Typen A, B und C hochkonservierte Domäne identifiziert (Albo *et al.* 1995; Kobayashi *et al.* 1994). Auch beim N Protein des Maus Hepatitis Virus konnte eine RBD (aa 169-308) identifiziert werden (Masters 1992; Nelson *et al.* 1993). Kürzlich wurde eine minimale RBD des Hantaan virus (HTNV) beschrieben (Xu *et al.* 2002). Zwei für die Bindung der vRNA wichtige Bereiche wurden identifiziert. Der eine soll für die quantitative RNA Bindung zuständig sein (N2, aa 197-218) und der andere die Spezifität der vRNA Erkennung vermitteln (N1, aa 175-196). Zu diesen Ergebnissen kamen die Autoren mit Peptiden und kurzen RNA-Fragmenten, welche in Filterbindungsexperimenten eingesetzt wurden. Das N1 Peptid entfaltet seine Wirkung erst in Verbindung mit dem N2 Peptid. Es ist möglich, dass auch das TSWV N Protein unterschiedliche Domänen für die spezifische und die unspezifische Protein – RNA Interaktion enthält. Aus GEMSA mit mutierten N Proteinen kann geschlossen werden, dass die RBD des TSWV N Proteins nicht in den ersten 39 Aminosäuren liegt, da N Δ 39 immer noch in der Lage ist, RNA zu binden (vgl. Abb. 7.3, (G)-(I)). Leider enthält das TSWV N Protein keine charakterisierten RNA-Bindungsmotive, so dass keine gezielten Mutationen eingeführt werden konnten.

Die Verpackung der genomischen RNPs von TSWV (vgl. Kap. 1.5.1) ist nach wie vor rätselhaft. Neben den vRNA- und vcRNA-Molekülen wurde für die L RNA auch eine Verpackung sogenannter „defective interfering elements“ (DI Elemente) gezeigt (Inoue-Nagata *et al.* 1997; Resende *et al.* 1992; de Avila *et al.* 1992; Steinecke 1995; Steinecke *et al.* 1998). Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass terminale Sequenzen für die Verpackung essentiell sind. Die Tabelle 4.2 gibt Auskunft über die Verteilung von vRNA und vcRNA in TSWV Nukleokapsiden. Währenddem mehr genomische als antigenomische S RNA enkapsidiert wird, sind die Verhältnisse für das M Segment unklar. Bei der L RNA und dem DI-Partikel 4 liegt das Verhältnis ganz klar auf der Seite der genomischen RNA.

Tabelle 4.2 Verteilung von viraler (v) und viral-komplementärer (vc) RNA in TSWV Nukleokapsiden (Steinecke *et al.* 1998). Die Werte in Klammern wurden von (Kormelink *et al.* 1992) gefunden.

RNA Spezies	v RNA : vc RNA
S	6 : 1 (10 : 1)
M	1 : 2 (10 : 1)
L	50 : 1
DI 4 L	250 : 1

Auch für das Uukuniemi Virus (Genus *Phlebovirus*) ist die Verpackung viraler und viral-komplementärer S RNA-Moleküle beschrieben (Simons *et al.* 1990).

Dunn *et al.* (1995) beschrieben ein reverses genetisches System für Bunyamwera. Sie benutzten Zellen, welche BUN Proteine durch Infektion mit rekombinanten Vacciniaviren oder durch das Vaccinia Virus T7-System synthetisierten. Diese wurden mit einer BUNSCAT genannten RNA transfiziert, welche ein Reporter gen (Chloramphenicol Acetyltransferase, CAT) in negativer Orientierung, flankiert von den exakten 5' und 3' untranslatierten Regionen von BUN S RNA umfasste. Es konnte CAT Aktivität gemessen werden, was Verpackung sowie Transkription der negativsträngigen Reporter-RNA in mRNA bedeutet. Eine Verlängerung von zwei Basen am 5' Ende oder von 11 oder 35 Basen am 3' Ende der BUNSCAT RNA führte zu einer niedrigeren Transkriptionsrate. Eine Deletion von 5 Nukleotiden am 3' Ende reduzierte die CAT Aktivität um mehr als 99%. Dies weist darauf hin, dass die konservierten genomischen Enden wichtig sind für die Enkapsidierung. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart von L und N Protein für CAT-Aktivität ausreichte. Die innerhalb der S, M und L RNA stark konservierten Enden der „Panhandles“ sind also vermutlich der Ort der Polymerase-Bindung bei den Mitgliedern der *Bunyaviridae* Familie. Bei TSWV sind die äussersten acht Nukleotide in allen Segmenten vollständig konserviert.

Bunyaviren sind wahrscheinlich diploid für das S Segment (Iroegbu *et al.* 1981; Rozhon *et al.* 1981; Urquidi *et al.* 1992). Ausserdem gibt es Experimente mit Influenza A, bei denen ein Virus mit neun anstatt den üblichen acht Segmenten geschaffen wurde (Enami *et al.* 1991). Daraus lässt sich ableiten, dass die Segmentzahl nicht fix ist.

In dieser Studie wurden unseres Wissens erstmalig spezifische Interaktionen zwischen einem nicht zur Affinitätsreinigung modifizierten Nukleokapsidprotein der *Bunyaviridae* Familie und viraler RNA gezeigt. Ausserdem wurde BN-PAGE als Methode zur Analyse des viralen Nukleokapsidaufbaus etabliert. Aus den gewonnenen Erkenntnissen und in Anlehnung an die Ergebnisse der Influenza-Forschung (Kap. 1.5.3) wurde das folgende Modell entwickelt. Es lässt sich am besten mit Hilfe der Abbildung 1.4 visualisieren und wird hier am Beispiel des genomischen S Segmentes diskutiert:

Transkription der N-mRNA

Am Anfang des viralen Zyklus ist wenig freies N Protein vorhanden. Das genomische RNP liegt „panhandle“-förmig vor. Die Polymerase bleibt am 5' Ende der vRNA gebunden und liest die vRNA in 3'→5' Richtung ab, wobei in 5'→3' Richtung neue RNA synthetisiert wird. Auf Grund der

niedrigen zytoplasmatischen N Protein-Konzentration bindet kein N Protein an das 5' Ende der neu synthetisierten RNA, wodurch die „cap-snatching“ Aktivität des L Proteins aktiviert wird (vgl. Abb. 1.5), in deren Verlauf eine zelluläre „cap“-Struktur an die entstehende virale mRNA gehängt wird. Die mRNA-Synthese gerät ins Stocken, wenn die intergenische Region erreicht wird. Die intergenische Region ist auf Grund der niedrigen N Protein Konzentration stark gefaltet und stellt daher für die Polymerase ein sterisches Hindernis dar. Ausserdem wird nicht von N verpackte RNA vermutlich nicht von der RdRp erkannt. Es wurden Poly-U-Bereiche gefunden, welche als Polyadenylierungssignale wirken könnten (Soellick 2000).

Weil dieser Vorgang im Zytoplasma abläuft, ist es möglich, dass noch während der Transkription Ribosomen an die entstehende mRNA binden, so dass Transkription und Translation gekoppelt sind. Damit müsste die mRNA auch nicht durch RNA-bindende Proteine stabilisiert werden.

Ein solcher Mechanismus ist für das Virus von Vorteil, weil kein dsRNA-Stadium auftritt. Doppelsträngige Replikationsintermediate können von der „Gene Silencing“-Maschinerie der Pflanze erkannt werden und zum sequenzspezifischen Abbau viraler RNA führen. Dies könnte ein molekularer Grund dafür sein, dass TSWV ein ausgesprochen aggressives Virus mit einem breiten Wirtsspektrum ist.

Replikation am Beispiel der vRNA-Synthese:

Die Replikation tritt später im viralen Zyklus auf, wenn schon viel N Protein vorhanden ist. Die hohe N Protein Konzentration führt zum Aufschmelzen sowohl der „Panhandle“ als auch der Sekundärstrukturen in der intergenischen Region. Dies entspricht ungefähr der für das Influenza Virus vorgeschlagenen „Template Modifikations-Hypothese“. Die vcRNA wird von der nun frei beweglichen Polymerase in 3'→5' Richtung abgelesen, wobei die vRNA in 5'→3' Richtung synthetisiert wird. Zuerst bildet sich der „Origin of Assembly“ am 5' Ende aus. Daran bindet ein erstes N Protein Monomer, womit die Enkapsidierung eingeleitet wird. Eine „Panhandle“-Struktur kann sich in der neu entstehenden RNA gar nicht ausbilden, weil das 3' Ende noch nicht synthetisiert ist. Die Interaktion des N Proteins mit dem „Origin of Assembly“ läuft kinetisch schneller ab als die Bindung der Polymerase, weshalb es nicht zum „cap-snatching“ kommt.

Das N Protein homopolymerisiert gleichzeitig der entstehenden vRNA entlang. Dieser Vorgang wird durch unspezifische Protein – RNA Wechselwirkungen stabilisiert. Es ist noch unklar, ob dabei monomeres N Protein oder niedrigmolekulare Komplexe (Trimer oder Tetramer) eingebaut werden. Die Neusynthese der vRNA läuft ohne Stocken über die intergenische Region der vcRNA hinweg, da deren Sekundärstrukturen durch N Proteine aufgeschmolzen wurden. Erst nach Erreichen des 5' Endes der Template (vc) RNA hört die Synthese der vRNA auf. Die Vollängenkopie (vRNA) dient wiederum als Template für die Synthese einer vcRNA. Dabei läuft im Prinzip das gleiche ab. In Analogie müsste gefordert werden, dass das viral-komplementäre 5' Ende eine höhere Affinität zum N Protein zeigt als das viral-komplementäre 3' Ende. In

Filterbindungsversuchen wurde - verglichen mit 3'endvc - eine höhere Affinität von 5'endvc zum N Protein gefunden, doch war die Affinität nicht so hoch wie beim 5'end Konstrukt (vgl. Abb. 3.14).

Ins reife Virion verpackt werden nur Segmente, welche „panhandle“-förmig sind und eine Polymerase gebunden haben.

4.4 Ausblick

Um direkt zu zeigen, dass die 39 Nukleotide am 5' Ende der TSWV S RNA ausreichend für die spezifische Interaktion mit N Protein sind, sollten mit Hilfe von Oligonukleotid-Dimeren neue Templates für *in vitro* Transkriptionen hergestellt werden. Mit weiteren überlappenden Konstrukten, die jeweils um wenige Nukleotide in Richtung 3' Ende verschoben sind, könnte der postulierte „Origin of Assembly“ genauer lokalisiert werden. Durch gezielte Mutagenese und mit Hilfe des Programmes MFOLD könnten strukturelle Voraussetzungen für die Bindung charakterisiert werden.

Es ist nach wie vor wenig über die Domäne(n) des N Proteins bekannt, welche mit RNA interagieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die N-terminalen 39 Aminosäuren für die RNA-Bindung nicht essentiell sind. Einerseits könnte man RNA-Bindungsdomänen durch „Alanine Scanning“ Mutagenese charakterisieren, andererseits könnten auch weitere Deletionsmutanten exprimiert und gereinigt werden. Es ist denkbar, dass das N Protein durch RNA-Bindung Konformationsänderungen erfährt. Die Domänenstruktur des N Proteins könnte in Gegenwart und Abwesenheit von viralen und nicht-viralen RNA-Substraten durch proteolytische Verdaus charakterisiert werden. Schliesslich könnten N Protein – RNA Interaktionen auch durch Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht werden. Damit könnten mehrere Bindestellen in einem Experiment charakterisiert werden.

Die Funktionen des Movementproteins NSm im Zell-zu-Zell Transport sollten weiter erforscht werden. Eine unspezifische ssRNA-Bindeeigenschaft wurde gezeigt (vgl. Kap. 3.8.1). Die *in vitro* Interaktion mit N wurde von (Soellick 2000) demonstriert. Ausserdem ist bekannt, dass NSm in verschiedenen Pflanzen mit einem J-Domänen-Protein interagiert (Soellick *et al.* 2000; Kellmann 2001). Es wurde ein J-Domänen/Hsp70-abhängiger Transport des Nukleokapsids zu den Plasmodesmata postuliert. Kürzlich wurden Proteine, welche Myosin und Kinesin ähneln, als Interaktionspartner von NSm gefunden (von Bargen *et al.* 2001).

Die in biochemischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollten in einem *in vitro* Transkriptions- und Replikationssystem für TSWV überprüft und verfeinert werden können. Mit einem solchen System liesse sich z.B. der Einfluss der N Protein Menge auf den Modus der viralen Polymerase (Transkription / Replikation) untersuchen. Das grösste Hindernis dabei ist die fehlerfreie Klonierung und Expression der 332 kDa grossen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), ohne die kein viraler Zyklus starten kann. Dieses Protein wurde von Joachim Uhrig kloniert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde versucht, das Protein mit einer C-terminalen GFP-(His)₆ Fusion in *Arabidopsis thaliana* Zellsuspensionen zu exprimieren. Erstaunlicherweise wurden GFP-leuchtende Agrobakterien gefunden, was auf die bakterielle Expression zumindest eines Teils der Polymerase hinweist. Allerdings gelang es nicht, die Polymerase in einem Immunoblot nachzuweisen, weshalb die Daten nicht gezeigt wurden. Es sollte versucht werden, die RdRp aus *Agrobacterium tumefaciens* Kulturen über die (His)₆-Fusion zu reinigen.

Ein reverses genetisches System könnte so aussehen, dass die Plasmide entweder durch Einreiben mit Carborundum oder durch „biolistics“ in eine systemisch infizierbare Pflanze gebracht werden. Transgene Viren, welche alle zur Ausbreitung notwendigen Segmente besitzen, könnten dann aus der Pflanzenspitze isoliert werden. Für die humanpathogenen Vertreter der *Bunyaviridae* wurden bereits reverse genetische Systeme vorgestellt (Weber *et al.* 2001).

Anstelle eines *in planta* Systems könnte auch mit Protoplasten gearbeitet werden. Analog zu den CAT-Assays bei *Bunyamera* (Bridgen *et al.* 1996) könnte das Reporter-gen *GFP* verwendet werden. Ein Protoplasten-System zum Studium von TSWV Infektionen wurde schon vor längerem etabliert (Kikkert *et al.* 1997). Damit könnte die Assemblierung von TSWV-Partikeln untersucht werden.

Kapitel 5 - Zusammenfassung

Der Nukleokapsidaufbau des Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) wurde *in vitro* untersucht. TSWV ist ein Mitglied der Gattung *Tospovirus*, der einzigen pflanzenpathogenen Gattung in der Familie der *Bunyaviridae*. Als Enkapsidierung bezeichnet man die Anlagerung vieler Kopien des Nukleokapsidproteins N an die drei viralen RNA-Segmente zur Bildung von Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs). Es ist bekannt, dass Nukleokapsidproteine dieser Familie sowohl genomische als auch antigenomische RNA enkapsidieren, mit wenigen Ausnahmen aber keine zelluläre RNA oder virale mRNA. In dieser Arbeit wurden die molekularen Ursachen dieser Spezifität erforscht. Ausserdem wurde der Einfluss des Oligomerisierungszustandes von N auf dessen RNA-Bindung untersucht.

Sowohl in Gelfiltrationsexperimenten als auch auf Blue Native-Gelen konnte Wildtyp N Protein vor allem als hochmolekularer Komplex aber auch als Tetramer und Trimer gefunden werden. Diese niedrigmolekularen Komplexe könnten stabile Zwischenzustände in der Enkapsidierung darstellen. Dimer und Monomer wurden nur in sehr geringen Mengen gefunden. Die biochemischen Analysen von Punkt- und Deletionsmutanten des TSWV N Proteins unterstützen das Modell einer homotypischen „Kopf – Schwanz“ Interaktion mit N- und C-terminaler Interaktionsdomäne. Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie lieferten Hinweise für die Vermutung, dass α -Helices in die Protein – Protein Interaktion involviert sind. Unseres Wissens wurde erstmalig BN-PAGE zur Untersuchung des Nukleokapsidaufbaus eines Pflanzenvirus verwendet.

Protein – RNA Komplexe wurden in Gel-Retardations-Assays und mit Filterbindungsversuchen untersucht. Dabei zeigten Mutanten mit beeinträchtiger Oligomerisierungsfähigkeit eine scheinbar höhere RNA-Bindungsfähigkeit. Da diese Mutanten in BN-PAGE und gelchromatographischen Untersuchungen zu einem viel grösseren Prozentsatz als Monomer vorlagen als Wildtyp N Protein, wird vermutet, dass monomeres N Protein mit RNA interagiert. Verschiedene N Protein – RNA Bindungen wurden quantifiziert und in den meisten Fällen Kooperativität gefunden. Auch die erwähnten N Protein Mutanten waren zu kooperativer RNA-Bindung fähig.

Es wurde festgestellt, dass das TSWV N Protein eine höhere Affinität für das 5' Ende der TSWV S RNA als für das 3' Ende und andere virale und nichtvirale RNAs hat. Die spezifisch erkannte Sequenz konnte auf die ersten 39 Nukleotide am 5' Ende der genomischen S RNA eingegrenzt werden. Diese Beobachtung reiht sich in Ergebnisse ein, welche kürzlich mit humanpathogenen Viren der nahe verwandten Gattungen *Hantavirus* und *Bunyavirus* gewonnen wurden. Daher könnte es sich um einen innerhalb der Familie der *Bunyaviridae* konservierten „origin of assembly“ handeln. Obwohl diese Sequenz sowohl Bestandteil der genomischen S RNA als auch der NSs-mRNA ist, könnte sich die Sekundärstruktur der entstehenden mRNA am 5' Ende durch das Anhängen der zellulären „cap“-Struktur so verändern, dass nur genomische RNA verpackt wird. Ein Modell, welches sowohl die molekularen Vorgänge während der Enkapsidierung als auch einen durch den Anstieg der N Protein Konzentration ausgelösten Wechsel von der Transkription zur Replikation beschreibt, wird diskutiert.

Kapitel 6 - Literaturverzeichnis

- Adam, G., D. E. Lesemann and H. J. Vetten (1991). Monoclonal Antibodies against Tomato Spotted Wilt Virus - Characterization and Application. *Annals of Applied Biology* **118**(1): 87-104.
- Adam, G., S. D. Yeh, D. V. Reddy and S. K. Green (1993). Serological comparison of tospovirus isolates from Taiwan and India with impatiens necrotic spot virus and different tomato spotted wilt virus isolates. *Arch Virol* **130**(3-4): 237-50.
- Adkins, S., T. J. Choi, B. A. Israel, M. D. Bandla, K. E. Richmond, K. T. Schultz, J. L. Sherwood and T. L. German (1996). Baculovirus expression and processing of Tomato Spotted Wilt Tospovirus glycoproteins. *Phytopathology* **86**(8): 849-855.
- Adkins, S., R. Quadt, T. J. Choi, P. Ahlquist and T. German (1995). An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting bunyavirus. *Virology* **207**(1): 308-11.
- Akashi, H. and D. H. Bishop (1983). Comparison of the sequences and coding of La Crosse and snowshoe hare bunyavirus S RNA species. *J Virol* **45**(3): 1155-8.
- Albo, C., A. Valencia and A. Portela (1995). Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* **69**(6): 3799-806.
- Alfadhli, A., Z. Love, B. Arvidson, J. Seeds, J. Willey and E. Barklis (2001). Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization. *J Virol* **75**(4): 2019-23.
- Alfadhli, A., E. Steel, L. Finlay, H. P. Bachinger and E. Barklis (2002). Hantavirus nucleocapsid protein coiled-coil domains. *J Biol Chem* **277**(30): 27103-8.
- Ambion (1997). T7-MEGAShortscript *In Vitro* Transcription Kit for Large Scale Synthesis of Short Transcript RNAs. Austin, TX: 44.
- Andersson, A. M., L. Melin, A. Bean and R. F. Pettersson (1997). A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a *Bunyaviridae* (Uukuniemi virus) membrane glycoprotein. *J Virol* **71**(6): 4717-27.
- Andrade, M. A., P. Chacon, J. J. Merelo and F. Moran (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* **6**(4): 383-90.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**(96): 223-30.
- Anfinsen, C. B. and H. A. Scheraga (1975). Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv Protein Chem* **29**: 205-300.
- Arakawa, T. and S. N. Timasheff (1985). Theory of protein solubility. *Methods Enzymol* **114**: 49-77.
- Arnheiter, H., N. L. Davis, G. Wertz, M. Schubert and R. A. Lazzarini (1985). Role of the Nucleocapsid Protein in Regulating Vesicular Stomatitis Virus RNA Synthesis. *Cell* **41**(1): 259-267.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Ed. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Baer, M. L., F. Houser, L. S. Loesch-Fries and L. Gehrke (1994). Specific RNA binding by amino-terminal peptides of alfalfa mosaic virus coat protein. *Embo J* **13**(3): 727-35.

- Baudin, F., C. Bach, S. Cusack and R. W. H. Ruigrok (1994). Structure of Influenza Virus RNP. 1. Influenza Virus Nucleoprotein Melts Secondary Structure in Panhandle RNA and Exposes the Bases to the Solvent. *Embo Journal* **13**(13): 3158-3165.
- Beaton, A. R. and R. M. Krug (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6282-6.
- Berinstein, A., M. Roivainen, T. Hovi, P. W. Mason and B. Baxt (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* **69**(4): 2664-6.
- Bezerra, I. C., R. D. Resende, L. Pozzer, T. Nagata, R. Kormelink and A. C. De Avila (1999). Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new *tospovirus* species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* **89**(9): 823-830.
- Bhyravbhatla, B., S. J. Watowich and D. L. Caspar (1998). Refined atomic model of the four-layer aggregate of the tobacco mosaic virus coat protein at 2.4-Å resolution. *Biophys J* **74**(1): 604-15.
- Bishop, D. H. L. (1990). *Bunyaviridae*. *Virology*. B. N. Fields, Knipe, D.M. New York, Raven Press: 1155-1173.
- Biswas, S. K., P. L. Boutz and D. P. Nayak (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *Journal of Virology* **72**(7): 5493-5501.
- Bouloy, M., C. Janzen, P. Vialat, H. Khun, J. Pavlovic, M. Huerre and O. Haller (2001). Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J Virol* **75**(3): 1371-7.
- Bouloy, M., N. Pardigon, P. Vialat, S. Gerbaud and M. Girard (1990). Characterization of the 5' and 3' ends of viral messenger RNAs isolated from BHK21 cells infected with Germiston virus (*Bunyavirus*). *Virology* **175**(1): 50-8.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Bridgen, A. and R. M. Elliott (1996). Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15400-4.
- Bridgen, A., F. Weber, J. K. Fazakerley and R. M. Elliott (2001). Bunyamwera *bunyavirus* nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(2): 664-9.
- Brittlebank, C. C. (1919). Tomato diseases. *J. Agr. Victoria* **17**: 213-235.
- Buchholz, C. J., D. Spehner, R. Drillien, W. J. Neubert and H. E. Homann (1993). The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly. *J Virol* **67**(10): 5803-12.
- Butler, P. J. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1383): 537-50.
- Calain, P. and L. Roux (1993). The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* **67**(8): 4822-30.
- Callaway, A., D. Giesman-Cookmeyer, E. T. Gillock, T. L. Sit and S. A. Lommel (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 419-60.

- Carrington, J. C., K. D. Kasschau, S. K. Mahajan and M. C. Schaad (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**(10): 1669-1681.
- Caspar, D. L. (1980). Movement and self-control in protein assemblies. Quasi-equivalence revisited. *Biophys J* **32**(1): 103-38.
- Caspar, D. L. and K. Namba (1990). Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus. *Adv Biophys* **26**: 157-85.
- Chang, J. Y., S. S. Alkan, N. Hilschmann and D. G. Braun (1985). Thrombin specificity. Selective cleavage of antibody light chains at the joints of variable with joining regions and joining with constant regions. *Eur J Biochem* **151**(2): 225-30.
- Cianci, C., L. Tiley and M. Krystal (1995). Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol* **69**(7): 3995-9.
- Compans, R. W., J. Content and P. H. Duesberg (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**(4): 795-800.
- Culver, J. N. (2002). Tobacco Mosaic Virus Assembly AND Disassembly: Determinants in Pathogenicity and Resistance. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 287-308.
- Davidson, A. D., M. Prols, J. Schell and H. H. Steinbiss (1991). The nucleotide sequence of RNA 2 of barley yellow mosaic virus. *J Gen Virol* **72**(Pt 4): 989-93.
- de Avila, A. C., P. de Haan, E. W. Kitajima, R. Kormelink, R. D. Resende, R. W. Goldbach and D. Peters (1992). Characterization of a Distinct Isolate of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) from *Impatiens* Sp in the Netherlands. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **134**(2): 133-151.
- de Avila, A. C., P. de Haan, R. Kormelink, O. Resende Rde, R. W. Goldbach and D. Peters (1993). Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J Gen Virol* **74**(Pt 2): 153-9.
- de Avila, A. C., P. de Haan, M. L. L. Smeets, R. D. Resende, R. Kormelink, E. W. Kitajima, R. W. Goldbach and D. Peters (1993). Distinct Levels of Relationships between *Tospovirus* Isolates. *Archives of Virology* **128**(3-4): 211-227.
- de Avila, A. C., C. Huguenot, O. Resende Rde, E. W. Kitajima, R. W. Goldbach and D. Peters (1990). Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* **71**(Pt 12): 2801-7.
- de Haan, P., R. Kormelink, R. de Oliveira Resende, F. van Poelwijk, D. Peters and R. Goldbach (1991). Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J Gen Virol* **72**(Pt 9): 2207-16.
- de Haan, P., L. Wagemakers, D. Peters and R. Goldbach (1989). Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* **70**(Pt 12): 3469-73.
- de Haan, P., L. Wagemakers, D. Peters and R. Goldbach (1990). The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J Gen Virol* **71**(Pt 5): 1001-7.
- Desselberger, U., V. R. Racaniello, J. J. Zazra and P. Palese (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**(3): 315-28.
- Digard, P., D. Elton, K. Bishop, E. Medcalf, A. Weeds and B. Pope (1999). Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *Journal of Virology* **73**(3): 2222-2231.

- Duarte, L. M. L., E. B. Rivas, M. A. V. Alexandre, A. C. DeAvila, T. Nagata and C. M. Chagas (1995). Chrysanthemum stem necrosis caused by a possible novel *tospovirus*. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **143**(9): 569-571.
- Duhaut, S. and N. J. Dimmock (2000). Approximately 150 nucleotides from the 5' end of an influenza A segment 1 defective virion RNA are needed for genome stability during passage of defective virus in infected cells. *Virology* **275**(2): 278-285.
- Duhaut, S. D. and N. J. Dimmock (2002). Defective segment 1 RNAs that interfere with production of infectious influenza A virus require at least 150 nucleotides of 5' sequence: evidence from a plasmid-driven system. *Journal of General Virology* **83**: 403-411.
- Duijsings, D., R. Kormelink and R. Goldbach (2001). *In vivo* analysis of the TSWV cap-snatching mechanism: single base complementarity and primer length requirements. *Embo J* **20**(10): 2545-52.
- Dunn, E. F., D. C. Pritlove, H. Jin and R. M. Elliott (1995). Transcription of a recombinant *bunyavirus* RNA template by transiently expressed *bunyavirus* proteins. *Virology* **211**(1): 133-43.
- Durham, A. C. (1972). Structures and roles of the polymorphic forms of tobacco mosaic virus protein. I. Sedimentation studies. *J Mol Biol* **67**(2): 289-305.
- Durham, A. C., J. T. Finch and A. Klug (1971). States of aggregation of tobacco mosaic virus protein. *Nat New Biol* **229**(2): 37-42.
- Durham, A. C. and A. Klug (1972). Structures and roles of the polymorphic forms of tobacco mosaic virus protein. 3. A model for the association of A-protein into disks. *J Mol Biol* **67**(2): 315-32.
- Elliott, R. M. (1990). Molecular biology of the *Bunyaviridae*. *J Gen Virol* **71**(Pt 3): 501-22.
- Elliott, R. M. (1996). *The Bunyaviridae*. New York, Plenum Press.
- Elton, D., E. Medcalf, K. Bishop and P. Digard (1999). Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: Identification of positive and negative sequence elements. *Virology* **260**(1): 190-200.
- Enami, M., G. Sharma, C. Benham and P. Palese (1991). An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**(1): 291-8.
- Fields, S. and O. Song (1989). A novel genetic system to detect protein - protein interactions. *Nature* **340**(6230): 245-6.
- Flick, R. and G. Hobom (1999). Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. *Journal of General Virology* **80**: 2565-2572.
- Flick, R., G. Neumann, E. Hoffmann, E. Neumeier and G. Hobom (1996). Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA - a Publication of the RNA Society* **2**(10): 1046-1057.
- Fodor, E., D. C. Pritlove and G. G. Brownlee (1994). The Influenza Virus Panhandle Is Involved in the Initiation of Transcription. *Journal of Virology* **68**(6): 4092-4096.
- Fox, G., N. R. Parry, P. V. Barnett, B. McGinn, D. J. Rowlands and F. Brown (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* **70**(Pt 3): 625-37.
- Fraenkel-Conrat, H. and R. C. Williams (1955). Reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus from Its Inactive Protein and Nucleic Acid Components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **41**(10): 690-698.
- Francki, R. I. B. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* **2**: 1-450.

- Fujiwara, T., D. Giesmancookmeyer, B. Ding, S. A. Lommel and W. J. Lucas (1993). Cell-to-Cell Trafficking of Macromolecules through Plasmodesmata Potentiated by the Red-Clover Necrotic Mosaic- Virus Movement Protein. *Plant Cell* **5**(12): 1783-1794.
- Gazit, E. (2001). The "Correctly folded" state of proteins: Is it a metastable state. *Angewandte Chemie-International Edition* **41**(2): 257-+.
- Gekko, K. and S. N. Timasheff (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* **20**(16): 4667-76.
- German, T. L., D. E. Ullman and J. W. Moyer (1992). *Tospoviruses* - Diagnosis, Molecular-Biology, Phylogeny, and Vector Relationships. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 315-348.
- Giorgi, C., L. Accardi, L. Nicoletti, M. C. Gro, K. Takehara, C. Hilditch, S. Morikawa and D. H. Bishop (1991). Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology* **180**(2): 738-53.
- Goelet, P., G. P. Lomonosoff, P. J. Butler, M. E. Akam, M. J. Gait and J. Karn (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(19): 5818-22.
- Goldbach, R., Kormelink, R., van Poelwijk, F., Wijkamp, I., Prins, M., Peters, D. (1993). Expression of the genome of tomato spotted wilt virus, a *bunyavirus* invading the plant kingdom. Ninth International Congress of Virology. Glasgow.
- Goldbach, R., Peters, D. (1996). Molecular And Biological Aspects of Tospoviruses. The Bunyaviridae. R. M. Elliott. New York, Plenum Press: 129-157.
- Gomez-Puertas, P., C. Albo, E. Perez-Pastrana, A. Vivo and A. Portela (2000). Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**(24): 11538-47.
- Gonenne, A. and R. Ernst (1978). Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel zwitterionic surfactants. *Anal Biochem* **87**(1): 28-38.
- Gött, P., R. Stohwasser, P. Schnitzler, G. Darai and E. K. Bautz (1993). RNA binding of recombinant nucleocapsid proteins of hantaviruses. *Virology* **194**(1): 332-7.
- Grambas, S., M. S. Bennett and A. J. Hay (1992). Influence of Amantadine Resistance Mutations on the pH Regulatory Function of the M2-Protein of Influenza-a Viruses. *Virology* **191**(2): 541-549.
- Grubman, M. J. and D. A. Shafritz (1977). Identification and characterization of messenger ribonucleoprotein complexes from vesicular stomatitis virus-infected HeLa cells. *Virology* **81**(1): 1-16.
- Hackbusch, J. (2001). Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV): Biochemische Charakterisierung des Nukleokapsidproteins. Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research. Cologne, University of Cologne: 98.
- Hacker, D., R. Raju and D. Kolakofsky (1989). La Crosse virus nucleocapsid protein controls its own synthesis in mosquito cells by encapsidating its mRNA. *J Virol* **63**(12): 5166-74.
- Hagen, M., T. D. Chung, J. A. Butcher and M. Krystal (1994). Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol* **68**(3): 1509-15.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Hatada, E., S. Saito, N. Okishio and R. Fukuda (1997). Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *Journal of General Virology* **78**: 1059-1063.
- Haywood, V., F. Kragler and W. J. Lucas (2002). Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* **14**: S303-S325.

- Heinze, C., B. Letschert, D. Hristova, M. Yankulova, O. Kauadjouor, P. Willingmann, A. Atanassov and G. Adam (2001). Variability of the N protein and the intergenic region of the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *Microbiologica* **24**(2): 175-187.
- Heinze, C., E. Maiss, G. Adam and R. Casper (1995). The Complete Nucleotide Sequence of the S RNA of a New Tospovirus Species, Representing Serogroup IV. *Phytopathology* **85**(6): 683-690.
- Hirth, L. and K. E. Richards (1981). Tobacco mosaic virus: model for structure and function of a simple virus. *Adv Virus Res* **26**: 145-99.
- Hsu, M. T., J. D. Parvin, S. Gupta, M. Krystal and P. Palese (1987). Genomic RNAs of Influenza Viruses Are Held in a Circular Conformation in Virions and in Infected Cells by a Terminal Panhandle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(22): 8140-8144.
- Ie, T. S. (1971). Electron microscopy of developmental stages of tomato spotted wilt virus in plant cells. *Virology* **43**(2): 468-79.
- Ihara, T., H. Akashi and D. H. Bishop (1984). Novel coding strategy (ambisense genomic RNA) revealed by sequence analyses of Punta Toro Phlebovirus S RNA. *Virology* **136**(2): 293-306.
- Inoue-Nagata, A. K., R. Kormelink, T. Nagata, E. W. Kitajima, R. Goldbach and D. Peters (1997). Effects of temperature and host on the generation of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs. *Phytopathology* **87**(11): 1168-1173.
- Iroegbu, C. U. and C. R. Pringle (1981). Genetic interactions among viruses of the Bunyamwera complex. *J Virol* **37**(1): 383-94.
- Jennings, P. A., J. T. Finch, G. Winter and J. S. Robertson (1983). Does the Higher-Order Structure of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Guide Sequence Rearrangements Influenza Viral RNA. *Cell* **34**(2): 619-627.
- Jin, H. and R. M. Elliott (1993). Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol* **67**(3): 1396-404.
- Jin, M., J. Park, S. Lee, B. Park, J. Shin, K. J. Song, T. I. Ahn, S. Y. Hwang, B. Y. Ahn and K. Ahn (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* **294**(1): 60-9.
- Jonsson, C. B., J. Gallegos, P. Fero, W. Severson, X. Xu and C. S. Schmaljohn (2001). Purification and characterization of the Sin Nombre virus nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **23**(1): 134-41.
- Kaplan, M. M. and R. G. Webster (1977). The epidemiology of influenza. *Sci Am* **237**(6): 88-106.
- Kasteel, D. T., M. C. Perbal, J. C. Boyer, J. Wellink, R. W. Goldbach, A. J. Maule and J. W. van Lent (1996). The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *J Gen Virol* **77**(Pt 11): 2857-64.
- Kasteel, D. T., J. Wellink, R. W. Goldbach and J. W. van Lent (1997). Isolation and characterization of tubular structures of cowpea mosaic virus. *J Gen Virol* **78**(Pt 12): 3167-70.
- Kellmann, J. W. (2001). Identification of plant virus movement-host protein interactions. *Z Naturforsch [C]* **56**(9-10): 669-79.
- Kellmann, J. W., P. Liebisch, K. P. Schmitz and B. Piechulla (2001). Visual representation by atomic force microscopy (AFM) of tomato spotted wilt virus ribonucleoproteins. *Biol Chem* **382**(11): 1559-62.

- Kellmann, J. W., Paape, M., von Bargaen, S., Piechulla, B. (2001). Topographical Studies of TSWV Nucleocapsids using Atomic Force Microscopy. Joint meeting of the DPG Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanzen and the Nederlandse Kring voor Plantevirologie, Cologne, Germany.
- Kikkert, M., C. Meurs, F. van de Wetering, S. Dorfmuller, D. Peters, R. Kormelink and R. Goldbach (1998). Binding of Tomato Spotted Wilt Virus to a 94 kDa thrips protein. *Phytopathology* **88**(1): 63-69.
- Kikkert, M., J. Van Lent, M. Storms, P. Bodegom, R. Kormelink and R. Goldbach (1999). Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *Journal of Virology* **73**(3): 2288-2297.
- Kikkert, M., F. van Poelwijk, M. Storms, W. Kassies, H. Bloksma, J. van Lent, R. Kormelink and R. Goldbach (1997). A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. *J Gen Virol* **78**(Pt 7): 1755-63.
- Kikkert, M., A. Verschoor, R. Kormelink, P. Rottier and R. Goldbach (2001). Tomato spotted wilt virus glycoproteins exhibit trafficking and localization signals that are functional in mammalian cells. *Journal of Virology* **75**(2): 1004-1012.
- Kingsbury, D. W., I. M. Jones and K. G. Murti (1987). Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein. *Virology* **156**(2): 396-403.
- Kingsbury, D. W. and R. G. Webster (1969). Some Properties of Influenza Virus Nucleoproteins. *Journal of Virology* **4**(3): 219-8.
- Kitajima, E. W., R. D. Resende, A. C. de Avila, R. W. Goldbach and D. Peters (1992). Immuno-electron microscopical detection of tomato spotted wilt virus and its nucleocapsids in crude plant extracts. *J Virol Methods* **38**(3): 313-22.
- Klump, K., R. W. H. Ruigrok and F. Baudin (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO Journal* **16**(6): 1248-1257.
- Kobayashi, M., T. Toyoda, D. M. Adyshev, Y. Azuma and A. Ishihama (1994). Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein: deletion mapping of the RNA binding domain. *J Virol* **68**(12): 8433-6.
- Kolakofsky, D. (1991). *Bunyaviridae*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- Kolakofsky, D. and D. Hacker (1991). Bunyavirus RNA synthesis: genome transcription and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **169**: 143-59.
- Kormelink, R., P. De Haan, C. Meurs, D. Peters and R. Goldbach (1992). The Nucleotide Sequence of the Messenger RNA Segment of Tomato Spotted Wilt Virus, a *Bunyavirus* with 2 Ambisense RNA Segments. *Journal of General Virology* **73**: 2795-2804.
- Kormelink, R., P. Dehaan, D. Peters and R. Goldbach (1992). Viral RNA Synthesis in Tomato Spotted Wilt Virus-Infected *Nicotiana rustica* Plants. *Journal of General Virology* **73**: 687-693.
- Kormelink, R., E. W. Kitajima, P. De Haan, D. Zuidema, D. Peters and R. Goldbach (1991). The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* **181**(2): 459-68.
- Kormelink, R., M. Storms, J. Van Lent, D. Peters and R. Goldbach (1994). Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* **200**(1): 56-65.
- Kormelink, R., F. van Poelwijk, D. Peters and R. Goldbach (1992). Non-viral heterogeneous sequences at the 5' ends of tomato spotted wilt virus mRNAs. *J Gen Virol* **73**(Pt 8): 2125-8.
- Kouznetsov, A., M. Buckle and N. Tordo (1998). Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. *J Gen Virol* **79**(Pt 5): 1005-13.

- Krug, R. M., C. St Angelo, B. Broni and G. Shapiro (1987). Transcription and replication of influenza virion RNA in the nucleus of infected cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**: 353-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lamb, R. A., S. L. Zebedee and C. D. Richardson (1985). Influenza Virus-M2 Protein Is an Integral Membrane-Protein Expressed on the Infected-Cell Surface. *Cell* **40**(3): 627-633.
- Lamb, R. A. a. K., R.M. (1996). *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. Fields Virology. B. N. Fields, Knipe, D.M., Howley, P.M. Philadelphia, Lippincott-Raven: 1353-1395.
- Law, M. D. and J. W. Moyer (1990). A Tomato Spotted Wilt-Like Virus with a Serologically Distinct N Protein. *Journal of General Virology* **71**: 933-938.
- Law, M. D., J. Speck and J. W. Moyer (1992). The M RNA of impatiens necrotic spot *Tospovirus* (*Bunyaviridae*) has an ambisense genomic organization. *Virology* **188**(2): 732-41.
- Lazarowitz, S. G. and R. N. Beachy (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**(4): 535-48.
- Leahy, M. B., J. T. Dessens and P. A. Nuttall (1997). Striking conformational similarities between the transcription promoters of Thogoto and influenza A viruses: evidence for intrastrand base pairing in the 5' promoter arm. *J Virol* **71**(11): 8352-6.
- Leahy, M. B., H. C. Dobbyn and G. G. Brownlee (2001). Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity. *J Virol* **75**(15): 7042-9.
- Leahy, M. B., D. C. Pritlove, L. L. M. Poon and G. G. Brownlee (2001). Mutagenic analysis of the 5' arm of the influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity. *Journal of Virology* **75**(1): 134-142.
- Lebeurier, G., A. Nicolaijeff and K. E. Richards (1977). Inside-out model for self-assembly of tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(1): 149-53.
- Lin, B. and L. A. Heaton (1999). Mutational analyses of the putative calcium binding site and hinge of the turnip crinkle virus coat protein. *Virology* **259**(1): 34-42.
- Lindwall, G., M. Chau, S. R. Gardner and L. A. Kohlstaedt (2000). A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. *Protein Eng* **13**(1): 67-71.
- Lomonosoff, G. P. and P. J. Butler (1980). Assembly of tobacco mosaic virus: elongation towards the 3'-hydroxyl terminus of the RNA. *FEBS Lett* **113**(2): 271-4.
- Lopez, N., R. Muller, C. Prehaud and M. Bouloy (1995). The L Protein of Rift Valley Fever Virus Can Rescue Viral Ribonucleoproteins and Transcribe Synthetic Genome-Like RNA Molecules. *Journal of Virology* **69**(7): 3972-3979.
- Lottenberg, R., U. Christensen, C. M. Jackson and P. L. Coleman (1981). Assay of coagulation proteases using peptide chromogenic and fluorogenic substrates. *Methods Enzymol* **80**(Pt C): 341-61.
- Maiss, E., L. Ivanova, E. Breyel and G. Adam (1991). Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* **72**(Pt 2): 461-4.
- Marriott, A. C., V. K. Ward and P. A. Nuttall (1989). The S RNA segment of Sandfly Fever Sicilian virus: evidence for an ambisense genome. *Virology* **169**(2): 341-5.
- Martin-Benito, J., E. Area, J. Ortega, O. Llorca, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2001). Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep* **2**(4): 313-7.

- Masters, P. S. (1992). Localization of an RNA-binding domain in the nucleocapsid protein of the coronavirus mouse hepatitis virus. *Arch Virol* **125**(1-4): 141-60.
- Mena, I., E. Jambrina, C. Albo, B. Perales, J. Ortin, M. Arrese, D. Vallejo and A. Portela (1999). Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: Identification of mutations that affect RNA replication. *Journal of Virology* **73**(2): 1186-1194.
- Milligan, J. F., D. R. Groebe, G. W. Witherell and O. C. Uhlenbeck (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* **15**(21): 8783-98.
- Milne, R. G. (1970). An Electron Microscope Study of Tomato Spotted Wilt Virus in Sections of Infected Cells and in Negative Stain Preparations. *Journal of General Virology* **6**: 267-8.
- Milne, R. G. and R. I. Francki (1984). Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family *Bunyaviridae*? *Intervirology* **22**(2): 72-6.
- Minke, C. (1998). Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV): Untersuchung der RNA-Bindungseigenschaften des N Proteins. Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. Köln, Universität zu Köln: 89.
- Mohamed, N. A. (1973). Studies on tomato spotted wilt virus. Adelaide, University of Adelaide.
- Mohamed, N. A. (1981). Isolation and Characterization of Subviral Structures from Tomato Spotted Wilt Virus. *J. Gen. Virol.* **53**: 197-206.
- Mohamed, N. A., J. W. Randles and R. I. Francki (1973). Protein composition of tomato spotted wilt virus. *Virology* **56**(1): 12-21.
- Momose, F., C. F. Basler, R. E. O'Neill, A. Iwamatsu, P. Palese and K. Nagata (2001). Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**(4): 1899-908.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Mumford, R. A., I. Barker and K. R. Wood (1996). The biology of the *tosspoviruses*. *Annals of Applied Biology* **128**(1): 159-183.
- Nelson, G. W. and S. A. Stohlman (1993). Localization of the RNA-binding domain of mouse hepatitis virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* **74**(Pt 9): 1975-9.
- Objeski, J. F., D. H. Bishop, E. L. Palmer and F. A. Murphy (1976). Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus. *J Virol* **20**(3): 664-75.
- O'Neil, R. E. and P. Palese (1995). NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology* **206**(1): 116-25.
- Osborne, J. C. and R. M. Elliott (2000). RNA-binding properties of Bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. *Journal of Virology* **74**(21): 9946-9952.
- Parvin, J. D., P. Palese, A. Honda, A. Ishihama and M. Krystal (1989). Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase. *J Virol* **63**(12): 5142-52.
- Pattanayek, R., M. Elrod and G. Stubbs (1992). Characterization of a putative calcium-binding site in tobacco mosaic virus. *Proteins* **12**(2): 128-32.
- Patterson, J. L., B. Holloway and D. Kolakofsky (1984). La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J Virol* **52**(1): 215-22.
- Patterson, J. L., D. Kolakofsky, B. P. Holloway and J. F. Objeski (1983). Isolation of the ends of La Crosse virus small RNA as a double-stranded structure. *J Virol* **45**(2): 882-4.

- Pekosz, A., C. Griot, N. Nathanson and F. Gonzalez-Scarano (1995). Tropism of *bunyaviruses*: evidence for a G1 glycoprotein-mediated entry pathway common to the California serogroup. *Virology* **214**(2): 339-48.
- Peters, D. (1998). An updated list of plant species susceptible to *tosspoviruses*. Fourth International Symposium on *Tospoviruses* and Thrips in Floral and Vegetable Crops., Wageningen, The Netherlands.
- Pettersson, R. F. and C. H. von Bonsdorff (1975). Ribonucleoproteins of Uukuniemi virus are circular. *J Virol* **15**(2): 386-92.
- Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue and N. Tordo (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* **8**(12): 3867-74.
- Pons, M. W., I. T. Schulze, G. K. Hirst and R. Hauser (1969). Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Virology* **39**(2): 250-9.
- Portela, A. and P. Digard (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**(Pt 4): 723-34.
- Prehaud, C., N. Lopez, M. J. Blok, V. Obry and M. Bouloy (1997). Analysis of the 3' terminal sequence recognized by the Rift Valley fever virus transcription complex in its ambisense S segment. *Virology* **227**(1): 189-197.
- Prins, M. (1997). Characterisation of Tospovirus Resistance in Transgenic Plants. Department of Virology. Wageningen, Wageningen Agricultural University, The Netherlands: 130.
- Prins, M. and R. Goldbach (1998). The emerging problem of *tosspovirus* infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol* **6**(1): 31-5.
- Prins, M., M. M. H. Storms, R. Kormelink, P. DeHaan and R. Goldbach (1997). Transgenic tobacco plants expressing the putative movement protein of tomato spotted wilt *tosspovirus* exhibit aberrations in growth and appearance. *Transgenic Research* **6**(3): 245-251.
- Provencher, S. W. and J. Glockner (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**(1): 33-7.
- Raju, R. and D. Kolakofsky (1987). Unusual transcripts in La Crosse virus-infected cells and the site for nucleocapsid assembly. *J Virol* **61**(3): 667-72.
- Raju, R. and D. Kolakofsky (1989). The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within nucleocapsids are base paired. *J Virol* **63**(1): 122-8.
- Reichel, C., J. Mathur, P. Eckes, K. Langenkemper, C. Koncz, J. Schell, B. Reiss and C. Maas (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5888-93.
- Rein, A., L. E. Henderson and J. G. Levin (1998). Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* **23**(8): 297-301.
- Resende, R. d. O., P. de Haan, A. C. de Avila, E. W. Kitajima, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters (1991). Generation of Envelope and Defective Interfering RNA Mutants of Tomato Spotted Wilt Virus by Mechanical Passage. *Journal of General Virology* **72**: 2375-2383.
- Resende, R. d. O., P. de Haan, E. van de Vossen, A. C. de Avila, R. Goldbach and D. Peters (1992). Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. *J Gen Virol* **73**(Pt 10): 2509-16.

- Richmond, K. E., K. Chenault, J. L. Sherwood and T. L. German (1998). Characterization of the nucleic acid binding properties of Tomato Spotted Wilt Virus nucleocapsid protein. *Virology* **248**(1): 6-11.
- Rosen, C. A., H. L. Ennis and P. S. Cohen (1982). Translational control of vesicular stomatitis virus protein synthesis: isolation of an mRNA-sequestering particle. *J Virol* **44**(3): 932-8.
- Rozhon, E. J., P. Gensemer, R. E. Shope and D. H. Bishop (1981). Attenuation of virulence of a *bunyavirus* involving an L RNA defect and isolation of LAC/SSH/LAC and LAC/SSH/SSH reassortants. *Virology* **111**(1): 125-38.
- Ruigrok, R. W. H. and F. Baudin (1995). Structure of Influenza Virus Ribonucleoprotein-Particles. 2. Purified RNA-Free Influenza Virus Ribonucleoprotein Forms Structures That Are Indistinguishable from the Intact Influenza Virus Ribonucleoprotein-Particles. *Journal of General Virology* **76**: 1009-1014.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- Samso, A., M. Bouloy and C. Hannoun (1975). [Circular ribonucleoproteins in the virus Lumbo (Bunyavirus)]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **280**(6): 779-82.
- Samso, A., M. Bouloy and C. Hannoun (1976). [Demonstration of circular ribonucleic acid in the Lumbo virus (*Bunyavirus*)]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **282**(17): 1653-5.
- Samuel, G., Bald, J.G., Pitman, H.A. (1930). Investigations on "spotted wilt" of tomatoes. *Austr. Commonwealth Council Sci. Ind. Res. Bull.* **44**: 1-64.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Satyanarayana, T., S. E. Mitchell, D. V. Reddy, S. Brown, S. Kresovich, R. Jarret, R. A. Naidu and J. W. Demski (1996). Peanut bud necrosis *tospovirus* S RNA: complete nucleotide sequence, genome organization and homology to other *tospoviruses*. *Arch Virol* **141**(1): 85-98.
- Satyanarayana, T., S. E. Mitchell, D. V. Reddy, S. Kresovich, R. Jarret, R. A. Naidu, S. Gowda and J. W. Demski (1996). The complete nucleotide sequence and genome organization of the M RNA segment of peanut bud necrosis *tospovirus* and comparison with other *tospoviruses*. *J Gen Virol* **77**(Pt 9): 2347-52.
- Schägger, H. (1994). Electrophoretic Isolation of Membrane Proteins from Acrylamide Gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **48**(3): 185-203.
- Schägger, H., W. A. Cramer and G. von Jagow (1994). Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane-Protein Complexes by 2-Dimensional Native Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **217**(2): 220-230.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1991). Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane-Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Analytical Biochemistry* **199**(2): 223-231.
- Schenborn, E. T. and R. C. Mierendorf, Jr. (1985). A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res* **13**(17): 6223-36.
- Schmaljohn, C. S. (1996). Molecular biology of *hantaviruses*. The *Bunyaviridae*. R. M. Elliot. New York, Plenum Press: 337pp.
- Scholtissek, C. and H. Becht (1971). Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol* **10**(1): 11-6.
- Schulke, N., M. S. Vesanen, R. W. Sanders, P. Zhu, M. Lu, D. J. Anselma, A. R. Villa, P. W. Parren, J. M. Binley, K. H. Roux, P. J. Maddon, J. P. Moore and W. C. Olson (2002). Oligomeric and

- conformational properties of a proteolytically mature, disulfide-stabilized human immunodeficiency virus type 1 gp140 envelope glycoprotein. *J Virol* **76**(15): 7760-76.
- Schuster, T. M., R. B. Scheele, M. L. Adams, S. J. Shire, J. J. Steckert and M. Potschka (1980). Studies on the mechanism of assembly of tobacco mosaic virus. *Biophys J* **32**(1): 313-29.
- Seong, B. L. and G. G. Brownlee (1992). Nucleotides 9 to 11 of the influenza A virion RNA promoter are crucial for activity *in vitro*. *J Gen Virol* **73**(Pt 12): 3115-24.
- Severson, W., L. Partin, C. S. Schmaljohn and C. B. Jonsson (1999). Characterization of the Hantaan nucleocapsid protein-ribonucleic acid interaction. *J Biol Chem* **274**(47): 33732-9.
- Severson, W. E., X. Xu and C. B. Jonsson (2001). *cis*-Acting signals in encapsidation of Hantaan virus S-segment viral genomic RNA by its N protein. *J Virol* **75**(6): 2646-52.
- Shapiro, G. I. and R. M. Krug (1988). Influenza virus RNA replication *in vitro*: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* **62**(7): 2285-90.
- Shire, S. J., J. J. Steckert and T. M. Schuster (1979). Mechanism of self-assembly of tobacco mosaic virus protein. II. Characterization of the metastable polymerization nucleus and the initial stages of helix formation. *J Mol Biol* **127**(4): 487-506.
- Simons, J. F., U. Hellman and R. F. Pettersson (1990). Uukuniemi virus S RNA segment: ambisense coding strategy, packaging of complementary strands into virions, and homology to members of the genus *Phlebovirus*. *J Virol* **64**(1): 247-55.
- Simons, J. F., R. Persson and R. F. Pettersson (1992). Association of the nonstructural protein NSs of Uukuniemi virus with the 40S ribosomal subunit. *J Virol* **66**(7): 4233-41.
- Skehel, J. J. and A. J. Hay (1978). Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza virus RNAs and their transcripts. *Nucleic Acids Res* **5**(4): 1207-19.
- Soellick, T.-R. (2000). Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV): Die Interaktionen der viralen Proteine als molekulare Grundlage des Infektionszyklus. Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. Köln, Universität zu Köln: 99.
- Soellick, T. R., J. F. Uhrig, G. L. Bucher, J. W. Kellmann and P. H. Schreier (2000). The movement protein NSm of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(5): 2373-2378.
- Srere, P. A. and G. C. Brooks (1969). The circular dichroism of glucagon solutions. *Arch Biochem Biophys* **129**(2): 708-10.
- Steinecke, P. (1995). Untersuchungen zur Replikation und Transkription eines einzelsträngigen RNA-Virus am Beispiel des Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV): Ribozyme als spezifische Werkzeuge zur Inhibition von Genexpression und Replikation viraler Pathogene. Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. Köln, Universität zu Köln: 81.
- Steinecke, P., C. Heinze, E. Oehmen, G. Adam and P. H. Schreier (1998). Early events of Tomato Spotted Wilt transcription and replication in protoplasts. *Microbiologica* **21**(3): 263-268.
- Storms, M. M., R. Kormelink, D. Peters, J. W. Van Lent and R. W. Goldbach (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* **214**(2): 485-93.

- Storms, M. M. H., C. van der Schoot, M. Prins, R. Kormelink, J. W. M. van Lent and R. W. Goldbach (1998). A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmal gating in tissues expressing viral movement proteins. *Plant Journal* **13**(1): 131-140.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**(1): 113-30.
- Tas, P. W. L., M. L. Boerjan and D. Peters (1977). Structural Proteins of Tomato Spotted Wilt Virus. *Journal of General Virology* **36**(AUG): 267-279.
- Tiley, L. S., M. Hagen, J. T. Matthews and M. Krystal (1994). Sequence-Specific Binding of the Influenza Virus RNA Polymerase to Sequences Located at the 5' Ends of the Viral RNAs. *Journal of Virology* **68**(8): 5108-5116.
- Turner, D. R., C. J. McGuigan and P. J. Butler (1989). Assembly of hybrid RNAs with tobacco mosaic virus coat protein. Evidence for incorporation of disks in 5'-elongation along the major RNA tail. *J Mol Biol* **209**(3): 407-22.
- Uhrig, J. F. (1996). *Strukturgene, Regulation und physiologische Basis des Sulfat-Stoffwechsels in Zellkulturen höherer Pflanzen*, Universität Bochum.
- Uhrig, J. F., T. R. Soellick, C. J. Minke, C. Philipp, J. W. Kellmann and P. H. Schreier (1999). Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: Identification and characterization of two interacting domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(1): 55-60.
- Ullman, D. E., T. L. German, J. L. Sherwood, D. M. Westcot and F. A. Cantone (1993). Tospovirus Replication in Insect Vector Cells - Immunocytochemical Evidence That the Nonstructural Protein Encoded by the S RNA of Tomato Spotted Wilt *Tospovirus* Is Present in Thrips Vector Cells. *Phytopathology* **83**(4): 456-463.
- Urban, L. A., P. Y. Huang and J. W. Moyer (1991). Cytoplasmic Inclusions in Cells Infected with Isolates of L-Serogroup and I-Serogroup of Tomato Spotted Wilt Virus. *Phytopathology* **81**(5): 525-529.
- Urquidi, V. and D. H. Bishop (1992). Non-random reassortment between the tripartite RNA genomes of La Crosse and snowshoe hare viruses. *J Gen Virol* **73**(Pt 9): 2255-65.
- van den Hurk, J., P. W. L. Tas and D. Peters (1977). The ribonucleic acid of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* **36**(JUL): 81-91.
- van Lent, J., M. Storms, F. van der Meer, J. Wellink and R. Goldbach (1991). Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J Gen Virol* **72**(Pt 11): 2615-23.
- van Lent, J., J. Wellink and R. Goldbach (1990). Evidence for the Involvement of the 58k and 48k Proteins in the Intercellular Movement of Cowpea Mosaic Virus. *Journal of General Virology* **71**: 219-223.
- van Poelwijk, F., K. Boye, R. Oosterling, D. Peters and R. Goldbach (1993). Detection of the L protein of tomato spotted wilt virus. *Virology* **197**(1): 468-70.
- van Poelwijk, F., J. Kolkman and R. Goldbach (1996). Sequence analysis of the 5' ends of tomato spotted wilt virus N mRNAs. *Arch Virol* **141**(1): 177-84.
- von Barga, S., K. Salchert, M. Paape, B. Piechulla and J. W. Kellmann (2001). Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**(12): 1083-1093.

- Waigmann, E., W. J. Lucas, V. Citovsky and P. Zambryski (1994). Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1433-7.
- Waigmann, E. and P. Zambryski (1995). Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* **7**(12): 2069-2079.
- Walter, A. E., D. H. Turner, J. Kim, M. H. Lyttle, P. Muller, D. H. Mathews and M. Zuker (1994). Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9218-22.
- Weber, F., A. Bridgen, J. K. Fazakerley, H. Streitenfeld, N. Kessler, R. E. Randall and R. M. Elliott (2002). Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. *J Virol* **76**(16): 7949-55.
- Weber, F., E. F. Dunn, A. Bridgen and R. M. Elliott (2001). The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology* **281**(1): 67-74.
- Weber, F., O. Haller and G. Kochs (1997). Conserved vRNA end sequences of Thogoto *orthomyxovirus* suggest a new panhandle structure. *Archives of Virology* **142**(5): 1029-1033.
- Wijkamp, I., J. van Lent, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters (1993). Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J Gen Virol* **74**(Pt 3): 341-9.
- Wolf, S., C. M. Deom, R. N. Beachy and W. J. Lucas (1989). Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus Modifies Plasmodesmatal Size Exclusion Limit. *Science* **246**(4928): 377-379.
- Womack, M. D., D. A. Kendall and R. C. MacDonald (1983). Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* **733**(2): 210-5.
- Wu, J. and M. Filutowicz (1999). Hexahistidine (His₆)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim Pol* **46**(3): 591-9.
- Xu, X., W. Severson, N. Villegas, C. S. Schmaljohn and C. B. Jonsson (2002). The RNA binding domain of the hantaan virus N protein maps to a central, conserved region. *J Virol* **76**(7): 3301-8.
- Yamanaka, K., A. Ishihama and K. Nagata (1990). Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**(19): 11151-5.
- Yang, J., D. C. Hooper, W. H. Wunner, H. Koprowski, B. Dietzschold and Z. F. Fu (1998). The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. *Virology* **242**(1): 107-17.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1): 103-19.
- Yeh, S. D. and T. F. Chang (1995). Nucleotide Sequence of the *N* Gene of Watermelon Silver Mottle Virus, a Proposed New Member of the Genus *Tospovirus*. *Phytopathology* **85**(1): 58-64.
- Yeh, S. D., Y. C. Lin, Y. H. Cheng, C. L. Jih, M. J. Chen and C. C. Chen (1992). Identification of Tomato Spotted Wilt-Like Virus on Watermelon in Taiwan. *Plant Disease* **76**(8): 835-840.
- Zheng, H. Y., H. A. Lee, P. Palese and A. Garcia-Sastre (1999). Influenza A virus RNA polymerase has the ability to stutter at the polyadenylation site of a viral RNA template during RNA replication. *Journal of Virology* **73**(6): 5240-5243.
- Zimmern, D. (1976). The region of tobacco mosaic virus RNA involved in the nucleation of assembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **276**(943): 189-204.

- Zimmern, D. (1977). The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell* **11**(3): 463-82.
- Zimmern, D. and P. J. Butler (1977). The isolation of tobacco mosaic virus RNA fragments containing the origin for viral assembly. *Cell* **11**(3): 455-62.
- Zimmern, D. and T. M. Wilson (1976). Location of the origin for viral reassembly on tobacco mosaic virus RNA and its relation to stable fragment. *FEBS Lett* **71**(2): 294-8.

Kapitel 7 - Anhang

7.1 Oligonukleotide

3'-24	5'-TCA TAC CTT AAC ACT CAG TCT TAC AAA-3'
3end_99T7GG	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAC TCT GTA TTC CGC AGT CGT TTC TTA-3'
5end_40T7GG	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC TTA GAA AAT CAC AAT ACT GTA ATA AGA ACA CAG TAC C-3'
5end_77T7GG	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCC AAT AAC CAT AAT GTC TTC AAG TGT TTA TGA GTC G-3'
5end_99_vc	5'-TGA AGA CAT TAT GGT TAT TGG TAC TGT GTT CTT ATT ACA-3'
5end_235_vc	5'-ATC AGA ATA CAG CTG GGT TTG AAC TAG TAG AG-3'
5end_272_vc	5'-CCT TTG CAG TAT AGC CAA AGC TAC TTT TGC-3'
3end_vc_1	5'-AGA GCA ATT GTG TCA GAA TTT TGT TCA TAA TCA AAC C-3'
3end_vcT7_2	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG TAC CAA GTT CAT GAA TCC AGT AAG AAT CTA CAA C-3'
3end_vcT7G_2	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTA CCA AGT TCA TGA ATC CAG TAA GAA TCT ACA AC-3'
5end_vc_1	5'-CAA CAA AGC AAC AAT GCT TTC CTT AGT GAG C-3'
5end_vcT7_2	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG CAA TCG TGT CAA TTT TGT GTT CAT ACC TTA A-3'
5end_vcT7GG_2	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG AGC AAT CGT GTC AAT TTT GTG TTC ATA CCT TAA-3'
5vT7-24	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAT CAT AAT CAA ACC TCA CTT AGA AAA TCA C-3'
5vT7GG-24	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTC ATA ATC AAA CCT CAC TTA GAA AAT CAC-3'
3endGGG5T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AAA GCA ACA ATG CTT TCC TTA GTG AG-3'
6002CM	5'-CAG TCC CGG GCA ACT CTG TAT TCC GCA GTC G-3'
6004CM	5'-GTC ACC CGG GGA AGA CAT TAT GGT TAT TGG-3'
6072CM	5'-GTA CCA AGT TCA TGA AT-3'
6072_long	5'-GTA CCA AGT TCA TGA ATC CAG TAA GAA TC-3'
EcoRI_polydT	5'-AGA CCG GAA TTC TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
Hairpin40	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC TTA GAA AAT CAC AAT ACT GTA ATA AGA ACA CAG TAC CAA TAA-3'
Hairpin40mut	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC TTA GAA AAT CAC AAT <u>GCC</u> <u>GCA</u> ATA AGA ACA <u>AAT</u> TAC CAA TAA-3'
Hairpin40mut2	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC <u>CTA</u> GAA AAT CAC AAT <u>GCC</u> <u>GCA</u> <u>ATC</u> AGA ACA <u>AAT</u> <u>AAC</u> CAA TAA-3'
Hairpin83	5'-TTA TTG GTA CTG TGT TCT TAT TCA AGT AIT GTG AIT TTC TAA GTC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3'
Hairpin83mut	5'-TTA TTG GTA <u>AIT</u> TGT TCT TAT <u>TGC</u> <u>GGC</u> AIT GTG AIT TTC TAA GTC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3'
Hairpin83mut2	5'-TTA TTG <u>AIT</u> TGT TCT <u>GAT</u> <u>TGC</u> <u>GGC</u> AIT GTG AIT TTC <u>TAG</u> GTC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3'
Kpn I-GFP	5'-GGT ACC AAT AAC CAT AAT GGG TAA AGG AGA AGA-3'
KS_left	5'-TGG GTA CCG GGC CCC-3'
Mi3	5'-AGG GAT CCA TGT CTA AGG TTA AGC TCA CTA AGG-3'
NaeOne	5'-TGG TGG GCG CCG GCG GTG TGG GCA-3'
NaeTwo	5'-TGC CCA CAC CGC CGG CGC CCA CCA-3'
NCd26_Nco	5'-TCA TAT GGC CAT GGA TAT GTC TAA GG-3'
NCd26_Xhorev	5'-CTC GAG CAT AGC AAC ACT CCC TTT AGC ATT AG-3'
N_Mun_Bam	5'-GAG AGA CAA TTT GAT CCA TGT CTA AGG TTA AGC TCA CTA AGG-3'
N_seq_left	5'-TCT AAG AAA CCA TTA TTA TCA TGA C-3'
N_seq_right_rev	5'-ATT TTA GCT TCC TTA GCT CCT G-3'
N_Xho_Hind_rev	5'-GAG AGA CTC GAG AAG CTT AAG CAA GTT CTG TGA GTT TTG CC-3'
Pan3v	5'-AGA GCA ATC GTG TCA ATT TTG TGT TCA TAC CTT-3'
Pan3v_Long	5'-AGA GCA ATC GTG TCA ATT TTG TGT TCA TAC CTT AAC ACT CAG TCT TAC AAA TCA TCA CAT TAA GAA CCT AAG AAA CG-3'
Pan3vcT7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAA GAG CAA TCG TGT CAA TTT TGT GTT CAT ACC TT-3'
Pan3vcT7GG	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG AGC AAT CGT GTC AAT TTT GTG TTC ATA CCT T-3'
Pan5vc	5'-AGA GCA ATT GTG TCA GAA TTT TGT TCA TAA TCA-3'
Pan5vc_Long	5'-AGA GCA ATT GTG TCA GAA TTT TGT TCA TAA TCA AAC CTC ACT TAG AAA ATC ACA ATA CTG TAA TAA GAA CAC AGT ACC-3'
Pan5vT7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAA GAG CAA TTG TGT CAG AAT TTT GTT CAT AAT CA-3'
Pan5vT7GG	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG AGC AAT TGT GTC AGA AIT TTG TTC ATA ATC A-3'
pBl2_T7/Sma_less	5'-ACT ACG TGA ACC ATC ACC TCA ATC AAG T-3'
pBl-T7	5'-AGG TCG ACG GTA TCG ATA AGC TTG AIT AAT ACG ACT CAC TAT A-3'
pBl-T7G	5'-AAG CTT GAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGA GCA AIT GTG TCA GAA TTT TGT TCA TAA TCA-3'
pBl-T7GG	5'-AAG CTT GAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG AGC AAT TGT GTC AGA AIT TTG TTC ATA ATC A-3'
PSP_left	5'-CGG CCG CTC TAG AAC TAG TG-3'
PSP3_right_rev	5'-AGA GCA ATC GTG TCA ATT TTG TGT-3'
PSP5_right_rev	5'-AGA GCA ATT GTG TCA GAA TTT TGT TC-3'
SK_left	5'-TGG AGC TCC ACC GCG G-3'
T7-1	5'-CTG AGG AAA TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG CAA TT-3'
T7_22mer	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
TOPO_Long_One	5'-AGC GCC CAA TAC GCA AAC CGC CTC TCC CCG CG-3'
TOPO-One	5'-AGC GCC CAA TAC GCA AAC CGC C-3'
TSWV3v	5'-AGA GCA ATC GTG TCA ATT TTG TGT TCA TAC CTT AAC ACT CAG TCT TA-3'
TSWV-intergenic-rev5'	5'-CAG TGA AAC TCT TAA CAA GTT CTA TGA AA-3'
TSWV-N-3seq	5'-CAA GGT CTT TGC CTT GTG TCA AC-3'
TSWV-N-midseq-rev5'	5'-CAA AGT CTG TGA GGC TTG CCA T-3'
TSWV-NSs-endseq	5'-AAC AIT TCT GTT ATT TGC AAG CAT CAG-3'
TSWV-NSs-midseq	5'-AAT GAC AGA TAC ATC GAA GCT GCA AA-3'
TSWV-T7seq-rev	5'-AAA AIT CTG ACA CAA TTG CTC TTA TAG-3'
XhoI-GFP	5'-CTC GAG ATT ATT TGT ATA GTT CAT C-3'

Beabsichtigte Mutationen gegenüber der Wildtyp-Sequenz sind unterstrichen und T7 Promoter-Sequenzen kursiv gedruckt.

7.2 Gelfiltrationen: Elutionsprofile

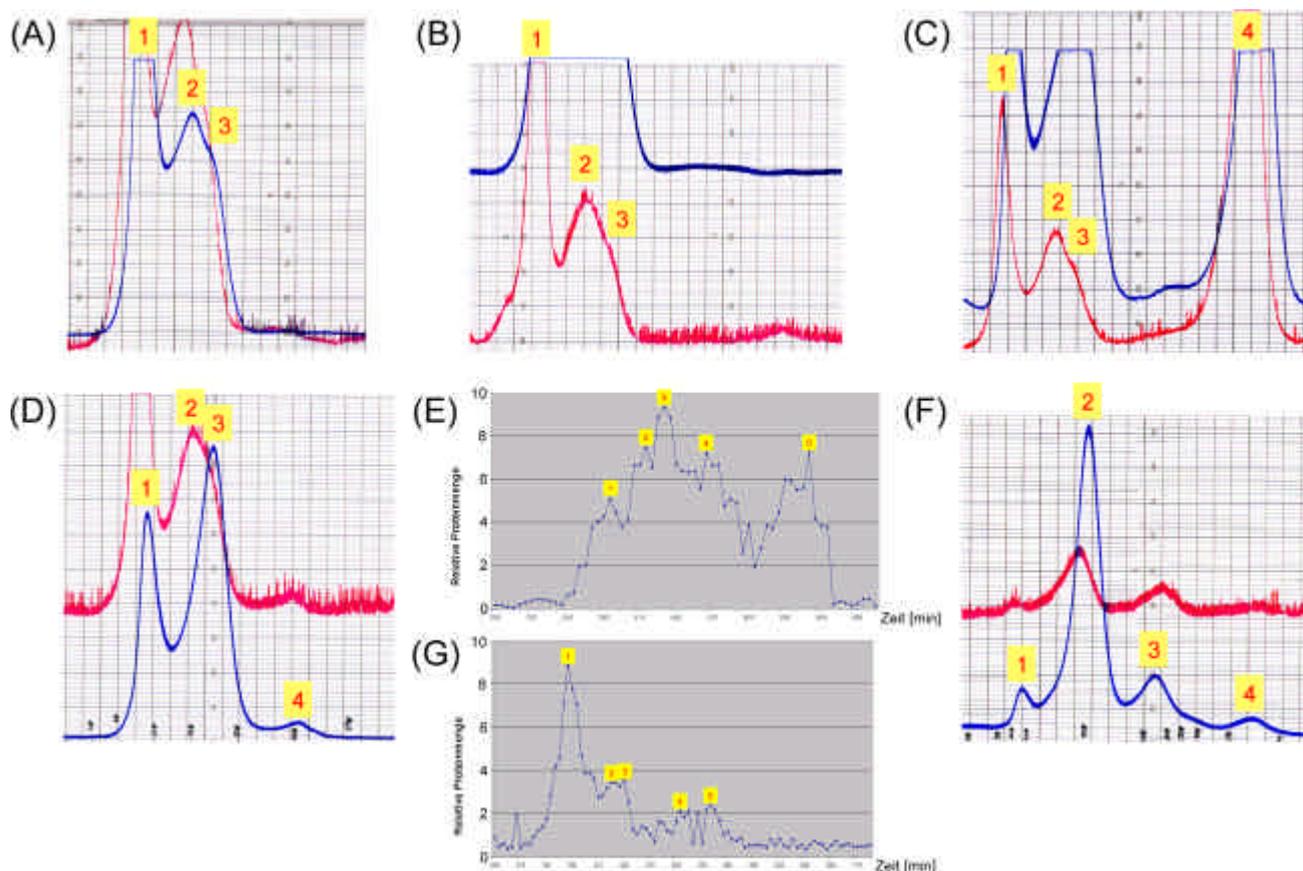


Abb. 7.1 Analyse des Polymerisierungsgrades von TSWV N wt und N F242_246A mittels Gelfiltration: Elutionskurven und „Dot Immuno Binding Assays“ (DIBAs, (E) und (G)). Die Fraktionen wurden dann mit DIBAs analysiert, wenn OD_{280} - und Fluoreszenzgraph keine klaren Daten lieferten. Die roten Kurven repräsentieren die UV-Messungen bei $\lambda=280$ nm, die blauen Kurven die Fluoreszenzmessungen (Anregung bei 260 nm, Emission bei 290 nm). Die beiden Kurven sind leicht gegeneinander verschoben, weil die Schreiber des Plotters hintereinander angeordnet sind.

Die roten Zahlen auf gelbem Hintergrund kennzeichnen die einzelnen Peaks:

- (A) (1) Hochmolekular, (2) Tetramer, (3) Trimer (N wt ohne RNase, ohne SB-12)
- (B) (1) Hochmolekular, (2) Tetramer, (3) Trimer (N wt mit wenig RNase, ohne SB-12)
- (C) (1) Hochmolekular, (2) Tetramer, (3) Trimer, (4) RNase A (N wt mit viel RNase, ohne SB-12)
- (D) (1) Hochmolekular, (2)/(3) Tetramer und Trimer, (4) Monomer (N wt ohne RNase, mit SB-12)
- (E) (1) Hochmolekular, (2) Tetramer, (3) Trimer, (4) Dimer, (5) Monomer ((His)₆-N wt mit RNase, mit SB-12)
- (F) (1) Hochmolekular, (2) Trimer, (3) Monomer, (4) RNase A ((His)₆-N wt mit RNase, mit SB-12)
- (G) (1) Hochmolekular, (2) Tetramer, (3) Trimer, (4) Dimer, (5) Monomer (N F242_246A Polymerfraktion ohne RNase, ohne SB-12)

(A) bis (F) entsprechen den Experimenten Nr. 1 bis 6, (G) entspricht dem Experiment Nr. 8 (vgl. Tabelle 3.4).

7.3 GEMSAs mit TSWV N-(His)₆

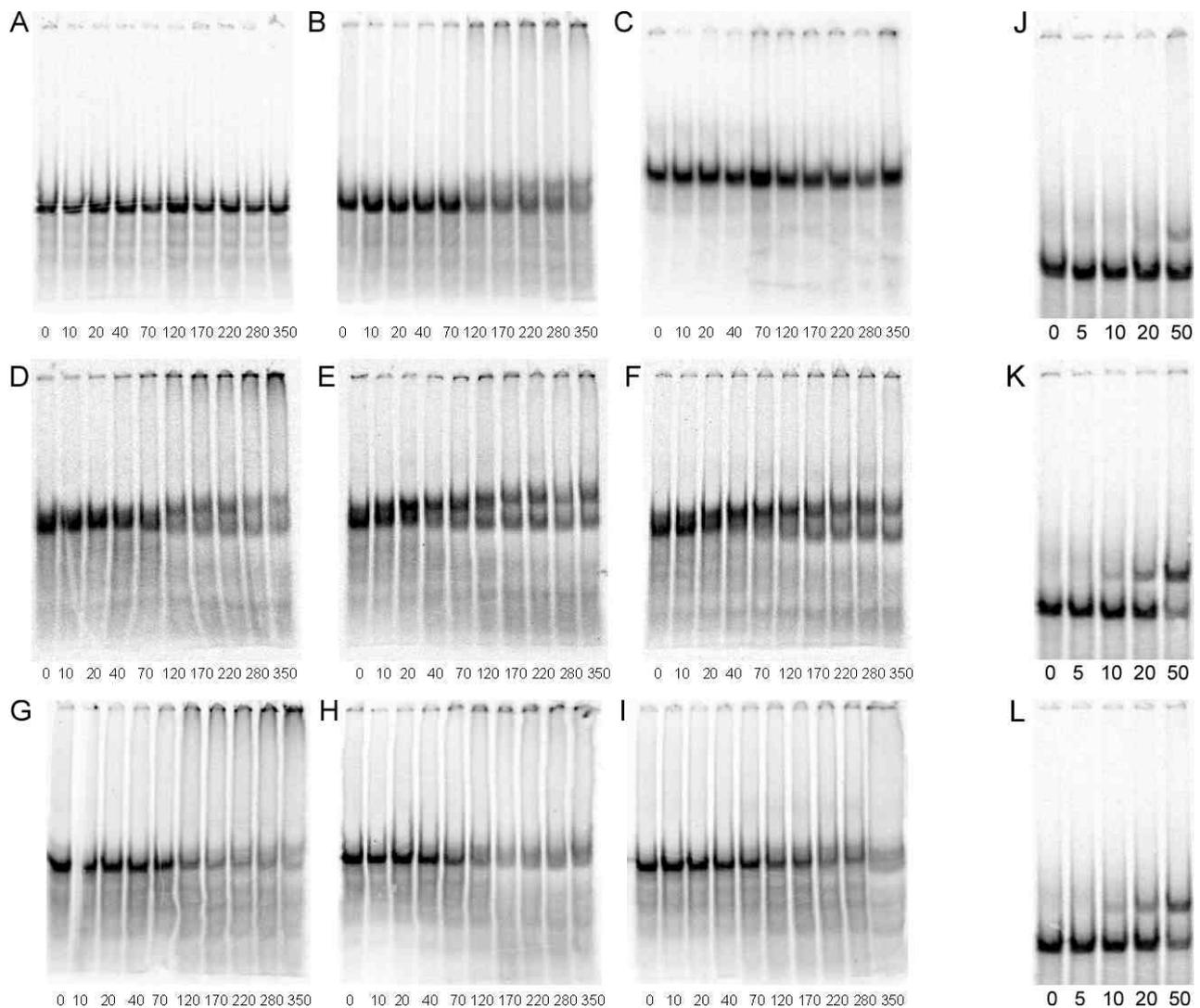


Abb. 7.2 Auswahl von GEMSAs mit [α -³³P]UTP markierter RNA und rekombantem N Protein mit C-terminaler (His)₆-Fusion bzw. BSA (A). Die Zahlen geben die eingesetzten Proteinmengen in Picomol an.

- | | |
|--|--|
| (A) Kontrolle: BSA mit BaYMV RNA 2 | (B) pQEC-N-(His) ₆ wt mit BaYMV RNA 2 |
| (C) pQEC-N-(His) ₆ mit dsRNA (KS/SK RNA) | (D) pQEC-N-(His) ₆ wt mit 5'end RNA |
| (E) pQEC-N-(His) ₆ F242A mit 5'end RNA | (F) pQEC-N-(His) ₆ F246A mit 5'end RNA |
| (G) pQEC-N-(His) ₆ wt mit 3'end RNA | (H) pQEC-N-(His) ₆ F242A mit 3'end RNA |
| (I) pQEC-N-(His) ₆ F246A mit 3'end RNA | (J) pQEC-N-(His) ₆ wt mit panS RNA |
| (K) pQEC-N-(His) ₆ F242A mit panS RNA | (L) pQEC-N-(His) ₆ F246A mit panS RNA |

7.4 GEMSA mit TSWV N ohne Polyhistidin-Fusion

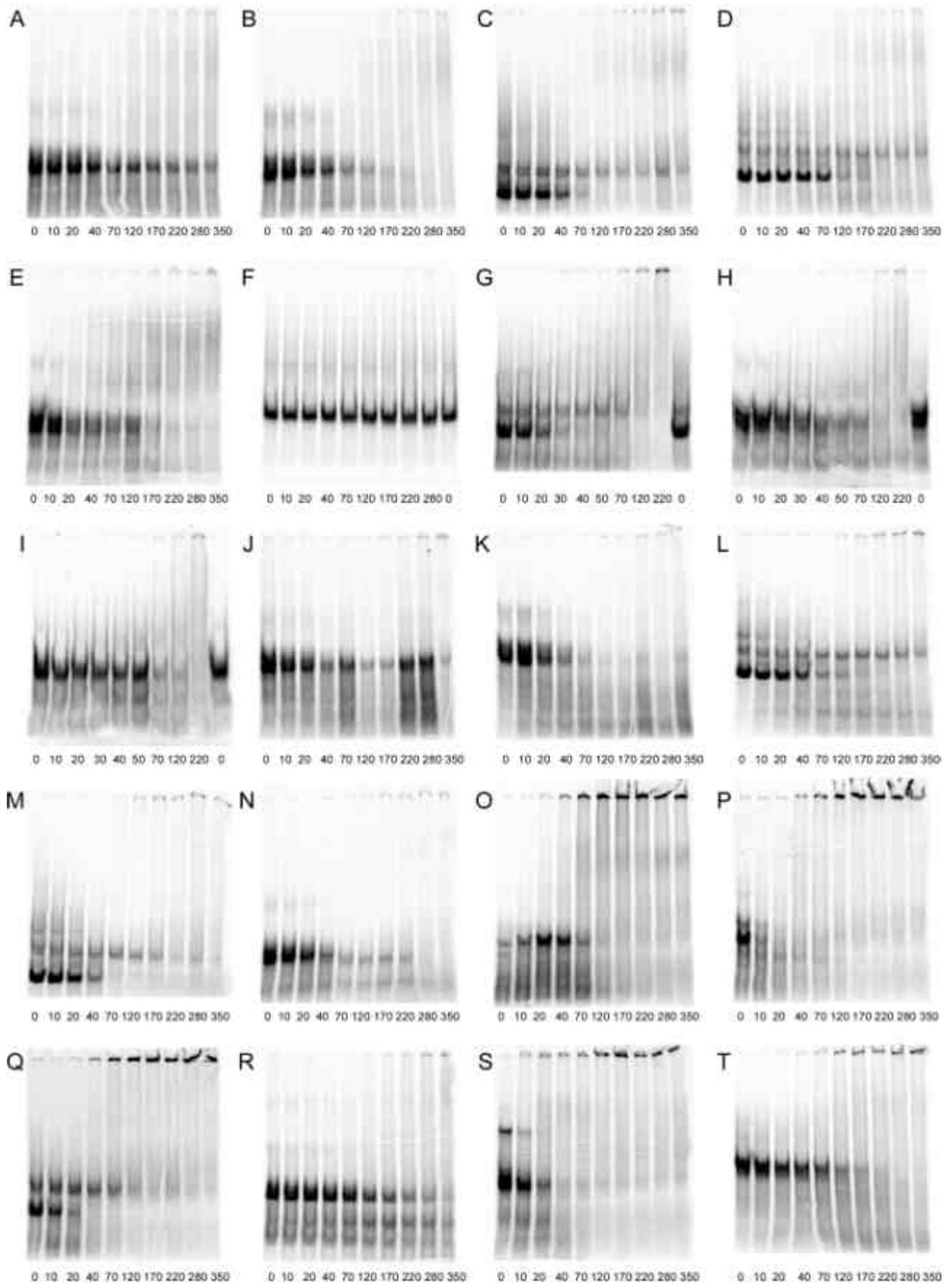


Abb. 7.3 Auswahl einiger GEMSA's mit Proteinen ohne (His)₆-Fusion. Die Zahlen beziehen sich auf die eingesetzten Proteinmengen in pmol.

- | | |
|--|--|
| (A) N wt ohne (His) ₆ -Fusion mit 3'end RNA | (B) N wt ohne (His) ₆ -Fusion mit 5'end RNA |
| (C) N wt ohne (His) ₆ -Fusion mit panS RNA | (D) N wt ohne (His) ₆ -Fusion mit panSvc RNA |
| (E) N NΔ22 ohne (His) ₆ -Fusion mit panS3'-24 RNA | (F) N NΔ22 ohne (His) ₆ -Fusion mit dsRNA (KS + SK) |
| (G) N NΔ39 ohne (His) ₆ -Fusion mit panS RNA | (H) N NΔ39 ohne (His) ₆ -Fusion mit panS3'-24 RNA |
| (I) N NΔ39 ohne (His) ₆ -Fusion mit panS5'-24 RNA | (J) N F242A ohne (His) ₆ -Fusion mit 3'end RNA |
| (K) N F242A ohne (His) ₆ -Fusion mit 5'end RNA | (L) N F242A ohne (His) ₆ -Fusion mit panSvc RNA |
| (M) N F246A ohne (His) ₆ -Fusion mit panSvc RNA | (N) N F246A ohne (His) ₆ -Fusion mit panS5'-24 RNA |
| (O) N F242_246A ohne (His) ₆ -Fusion mit 3'end RNA | (P) N F242_246A ohne (His) ₆ -Fusion mit 5'end RNA |
| (Q) N F242_246A ohne (His) ₆ -Fusion mit panS RNA | (R) N F242_246A ohne (His) ₆ -Fusion mit KS RNA |
| (S) N F242_246A ohne (His) ₆ -Fusion mit 3'endvc RNA | (T) N F242_246A ohne (His) ₆ -Fusion mit 5'endvc RNA |

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, in den Abteilungen von Prof. Dr. Jeff Schell („Genetische Grundlagen der Pflanzenzüchtung“) und Prof. Dr. Francesco Salamini („Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie“) unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Peter H. Schreier angefertigt.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschliesslich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Peter H. Schreier betreut worden.

Köln, am 9. Oktober 2002



Gregor L. Bucher

Teilpublikation:

T.-R. Soellick, J.F. Uhrig, G.L. Bucher, J.-W. Kellmann, and P.H. Schreier (2000): The TSWV movement protein NSm: RNA binding, interaction with the TSWV N protein and identification of interacting plant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2373-2378.

In Vorbereitung:

Bucher, G.L.: Analysis of tomato spotted wilt tospovirus encapsidation. *B.I.F. FUTURA* (Bericht für den Boehringer Ingelheim Fonds)

Bucher, G.L., Hackbusch, J., Schreier, P.H., and Uhrig, J.F.: Preferential encapsidation of tomato spotted wilt tospovirus 5' end genomic sequence - new evidence for a conserved mechanism in the *Bunyaviridae* family.

Abstract

The encapsidation process of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV), a member of the *Bunyaviridae* family with a tripartite, ambisense RNA genome, was investigated. Encapsidation is the binding of many copies of the nucleocapsid protein N to the viral RNA in a well-ordered manner. It is known that other viruses of the same family encapsidate both genomic and antigenomic RNA but not viral mRNA or cellular RNAs. There are only few exceptions known. This work focuses on the molecular basis of this encapsidation specificity. Furthermore, the influence of the N protein oligomerization state on RNA binding is investigated by using N protein mutants with a decreased ability to form multimers.

Both gel filtration and Blue Native electrophoresis experiments demonstrated that untagged wild type TSWV nucleocapsid protein N was mainly present as a high molecular weight complex. Tetrameric and trimeric complexes were also found, but hardly any dimers or monomers were present. These low molecular weight complexes may represent stable intermediate states in the encapsidation process. Biochemical analyses of point and deletion mutants of the N protein support the view of a homotypic “head-to-tail” interaction with an N-terminal and a C-terminal interaction domain. Secondary structure analyses using circular dichroism spectroscopy provide evidence for an involvement of α -helices in the protein – protein interaction. The results presented demonstrate the successful utility of Blue Native PAGE in analysing nucleocapsid protein oligomerization of a plant virus.

Protein – RNA complexes were analysed in GEMSAs and filter binding assays. Compared to wild-type N protein, N protein mutants with a reduced ability to oligomerize showed an apparently higher RNA binding capability. In BN-PAGE and gel filtration studies, these mutants were present as monomers to a much higher degree than wild type N protein. This suggests that monomeric N protein interacts with RNA. Different N protein – RNA interactions were quantified and cooperativity was found in most cases, even for N protein mutants with a limited ability to oligomerize.

A higher affinity of the N protein for sequences at the 5' end of the genomic S RNA segment was found, as compared to the 3' end and other viral and nonviral RNAs. The specifically recognized sequence resides within a 39-nucleotide stretch at the 5' terminal end. This observation is in agreement with recent studies of members of the closely related *Hantavirus* and *Bunyavirus* genera. Therefore, the 5' terminal sequence may represent a conserved origin of assembly within the *Bunyaviridae* family. Although this sequence is part of both the genomic S RNA and the NSs-mRNA, the host-derived 5' terminal cap structure of viral mRNAs may alter the secondary structure of the proposed origin of assembly such that only genomic S RNAs are recognized by the N protein. Based on these results, a model describing the molecular events during encapsidation as well as an N protein-mediated switch from transcription to replication is discussed.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Gregor Ludwig Bucher
Geburtsdatum/-ort	20.02.1974 in Luzern
Staatsangehörigkeit	Schweizer
Familienstand	ledig

Schulbildung und Schulabschluss

08/81 – 06/87	Primarschule Meggen
08/87 – 06/94	Kantonsschule Luzern
06/94	Maturitätsprüfung nach Typus C

Militärdienst

07/94 – 10/94	Ausbildung zum Spitalsoldaten mit dreiwöchigem Praktikum als Krankenpfleger im Kantonsspital Uri
---------------	--

Studium

11/94 – 03/99	Studium der Biologie II (Diplom) an der Universität Basel
09/97 – 08/98	Diplomarbeit am Friedrich Miescher Institut (Novartis Research Foundation) zum Thema „The role of plant class I β -1,3-glucanase in virus spread.“ Betreuung durch Prof. Dr. Fred Meins, Jr.

Prüfungen und Studienabschluss

10/95 und 10/96	1. und 2. Vordiplom in Biologie II an der Universität Basel
03/99	Diplom in Biologie II am Biozentrum der Universität Basel

Promotion

05/99 – 12/02	Anfertigung einer Dissertation am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Schreier (Abt. Prof. Jeff Schell, ab 2001 Abt. Prof. Francesco Salamini) mit dem Ziel der Promotion in Genetik an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
---------------	---

Stipendien

05/99 – 04/02	Stipendiat des Boehringer Ingelheim Fonds (Stiftung für Medizinische Grundlagenforschung, Heidesheim)
05/02 – 10/02	Förderung durch die Bayer AG, Leverkusen