

**Funktionelle Untersuchung von Mutanten  
und Chimären des Fusionsproteins  
des respiratorischen Synzytialvirus**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biochem. Markus Lorek**

geboren am 7.4.1978 in Hannover

Hannover, 2008

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto

Korreferent: PD. Dr. Gert Zimmer

Tag der Promotion: 27.3.2008

# Zusammenfassung

Das Fusionsprotein (F-Protein) des humanen respiratorischen Synzytialvirus (HRSV) vermittelt die Fusion zwischen der viralen Hülle und der Plasmamembran der Wirtszelle. Darüber hinaus besitzt das F-Protein auch rezeptorbindende Eigenschaften. Um seine Fusionsaktivität zu erlangen, muss das F-Protein durch die Prohormonkonvertase Furin an zwei Positionen gespalten werden. Hierbei entstehen drei Spaltprodukte: die membranverankerte  $F_1$ -Untereinheit mit dem Fusionspeptid am N-Terminus, die kleine  $F_2$ -Untereinheit, die mit der  $F_1$ -Untereinheit über eine Disulfidbrücke verbunden bleibt, und schließlich ein kleines glykosyliertes Peptid von 27 Aminosäuren (Pep27), das von der infizierten Zelle sezerniert wird. Über die weitere Prozessierung und die Funktion des Pep27 von HRSV nichts bekannt.

In dieser Arbeit wurden transgene Epithelzelllinien hergestellt, welche das F-Protein von HRSV bzw. BRSV sowie Chimären der beiden Proteine exprimierten. Es konnte gezeigt werden, dass Pep27 eine wichtige Rolle für die Regulation der Fusionsaktivität des F-Proteins hat. Veränderungen an der C-terminalen Seite des Pep27 hatten fatale Auswirkungen für die Faltung und Funktion des F-Proteins, während Mutationen auf der N-terminalen Seite zu einer Abnahme oder Verlust der Fusionsaktivität führten. Mit Hilfe der Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Fusionsaktivität wichtig für die Induzierung der Apoptose, jedoch nicht der einzige beteiligte Faktor ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung einer hochkonservierten basischen Domäne in der  $F_2$ -Untereinheit für die Funktion des F-Proteins zu analysieren. Dazu wurden entsprechende Mutanten des F-Proteins mit der zytoplasmatischen Domäne des F-Proteins vom Sendaivirus versehen und dazu verwendet, eine F-Deletionsmutante des Sendaivirus zu komplementieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die basische Domäne zwar nicht die Faltung und den Oberflächentransport des F-Proteins, jedoch die Fusionsaktivität und den

Einbau des F-Proteins in die Viruspartikel beeinflusst. Die Mutation K75N bewirkte eine völlige Zerstörung der Fusionsaktivität und verhinderte nahezu vollständig den Einbau des Proteins in die Viruspartikel, während die Mutationen K77N, K80N und K85N nur eine modulierende Wirkung hatten.

**Schlagworte:** Respiratorisches Synzytialvirus, Fusion, Apoptose

# Summary

The fusion protein (F protein) of the human respiratory syncytial virus (HRSV) induces the fusion of the viral envelope with the plasma membrane of the host cell. In addition, the F protein has receptor binding activity. To gain fusion competence, the F protein has to be cleaved by the prohormon convertase Furin at two positions. This results in three proteolytic processed subdomains: the membrane anchored F<sub>1</sub> subunit with the fusionpeptide at the N-terminus, the small F<sub>2</sub> subunit, which is connected by a disulfide bond to the F<sub>1</sub>-subunit, and a small peptide of 27 amino acids (pep27) which is secreted by the infected cells. The function of pep27 of HRSV is not known.

In this thesis, transgenic cell lines were generated that expressed the F protein of HRSV, BRSV, and chimeras thereof. It was shown that mutations at the C-terminal site of pep27 had fatal consequences for folding and function of the F protein, whereas mutations at the N-terminal site reduced or abolished fusion activity. Using fusion-defect mutants it could also be demonstrated that F protein-induced apoptosis is correlated with fusion activity.

In the second part of the thesis, the importance of a highly conserved basic domain in the F<sub>2</sub> subunit was analysed with regard to the function of the F protein. Mutations were introduced into a F protein chimera that contained the cytoplasmic domain of the Sendai virus F protein and these mutants were used to complement a Sendai virus F-deletion mutant. It could be shown that the basic domain does not affect folding and cell surface transport of the F protein but is important for fusion activity and incorporation of the F protein into virus particles. In particular mutation K75N abolished both fusion activity and incorporation into virus particles, while the mutations K77N, K80N, and K85N had a modulating effect on these parameters.

**Key words:** Respiratory syncytial virus, fusion, apoptosis



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das respiratorische Synzytialvirus . . . . .	1
1.1.1	Taxonomie . . . . .	1
1.1.2	Krankheitsbild . . . . .	2
1.1.3	Morphologie und Genomorganisation . . . . .	3
1.1.4	Strukturproteine . . . . .	5
1.1.5	Nichtstrukturproteine . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>15</b>
3.1	Zelllinien . . . . .	15
3.2	Viren . . . . .	16
3.3	Bakterienstämme . . . . .	16
3.4	Plasmide . . . . .	16
3.5	Medien . . . . .	18
3.6	Puffer und Lösungen . . . . .	19
3.7	Oligonukleotide . . . . .	22

---

3.8	Antikörper . . . . .	26
3.9	Enzyme . . . . .	26
3.9.1	Restriktionsenzyme . . . . .	26
3.9.2	Andere Enzyme . . . . .	27
3.10	Kits . . . . .	27
3.11	Substrate . . . . .	27
3.12	Transfektionsreagenz . . . . .	27
3.13	Chemikalien . . . . .	27
3.14	Geräte und Zubehör . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
4.1	Zellkulturtechniken . . . . .	35
4.1.1	Kultivierung und Passagierung . . . . .	35
4.1.2	Kryokonservierung von Zellen . . . . .	35
4.1.3	Generierung transgener Zelllinien . . . . .	36
4.2	Virologische Techniken . . . . .	36
4.2.1	Anzucht von SeV $\Delta$ F . . . . .	36
4.2.2	Generierung von Pseudotypen . . . . .	37
4.2.3	Bestimmung des Virustiters von SeV- $\Delta$ F . . . . .	37
4.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	38
4.3.1	Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR . . . . .	38
4.3.2	Erzeugung von Mutationen . . . . .	39
4.3.3	Bestimmung der DNA-Konzentration . . . . .	39
4.3.4	Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen . . . . .	40



---

4.3.5	Agarosegelelektrophorese . . . . .	41
4.3.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	41
4.3.7	Dephosphorylierung linearisierter DNA . . . . .	42
4.3.8	Ligation von DNA . . . . .	42
4.3.9	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien . . . . .	42
4.3.10	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien . . . . .	43
4.3.11	Kolonie-PCR . . . . .	43
4.3.12	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	44
4.3.13	Sequenzierung . . . . .	44
4.3.14	Transiente Expression in eukaryotischen Zellen . . . . .	45
4.4	Klonierungen . . . . .	45
4.4.0.1	Klonierung der F-Protein-GFP-Mutanten . . . . .	45
4.4.0.2	Klonierung der HRSV/SeV-F-Mutanten . . . . .	47
4.5	Methoden zum Nachweis von Proteinen . . . . .	48
4.5.1	Immunfluoreszenztest . . . . .	48
4.5.2	Trypsinbehandlung von F-exprimierenden Zellen . . . . .	49
4.5.3	Immunpräzipitation . . . . .	49
4.5.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	50
4.5.5	Western Blot . . . . .	51
4.6	Andere Methoden . . . . .	52
4.6.1	Heterologe Zellfusion mit R18-markierten Zellen . . . . .	52
4.6.2	Caspase-3-Assay . . . . .	52
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>

5.1	Charakterisierung des HRSV-F-Proteins durch transgene Zelllinien . . . . .	53
5.1.1	Generierung der transgenen Zelllinien . . . . .	56
5.1.2	Expression der F-Proteinmutanten . . . . .	56
5.1.3	Expression des lösliche HRSV-F-Proteins . . . . .	57
5.1.4	RSV-F-Protein induzierte Bildung von Synzytien . . . . .	58
5.1.5	Heterologe Zellfusion mit R18-markierten Zellen . . . . .	61
5.1.6	RSV-F-Protein induzierte Translokation von NF $\kappa$ B (p65) . . . . .	64
5.1.7	Aktivierung von Caspase-3 . . . . .	66
5.2	Charakterisierung des RSV-F-Proteins mittels Sendaivirus-Pseudotypen . . . . .	69
5.2.1	Generierung von SeV-Pseudotypen . . . . .	71
5.2.2	Infektiösität der chimären HRSV/SeV-F-Protein-Pseudotypen . . . . .	73
5.2.3	Oberflächenexpression der chimären HRSV/SeV-F-Mutanten . . . . .	74
5.2.4	Behandlung des chimären hF $_T$ -Proteins mit Trypsin . . . . .	75
5.2.5	Bildung von Synzytien durch die chimären HRSV/SeV-F-Mutanten . . . . .	77
5.2.6	Einbau der chimären Mutanten in Viruspartikel . . . . .	78
5.2.7	Kokolisierung der hF $_T$ -Mutanten mit Caveolin . . . . .	80
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
6.1	Regulation der Fusionsaktivität des F-Proteins und F-induzierte Apoptose . . . . .	83
6.1.1	Regulation der Fusionsaktivität über Pep27 . . . . .	84
6.1.2	Induktion der Apoptose durch das F-Protein . . . . .	89
6.2	Bedeutung der basischen Domäne K <sup>65</sup> -K <sup>87</sup> für die Funktionalität des HRSV-F-Proteins . . . . .	93
6.2.1	Die Konformation des HRSV-F-Proteins wird durch einen heterologen Membrananker gestört . . . . .	94

---

6.2.2	Die Aminosäuren K <sup>65</sup> , K <sup>68</sup> und K <sup>87</sup> spielen eine untergeordnete Rolle für die Funktion des HRSV-F-Proteins . . . . .	94
6.2.3	Die Aminosäuren K <sup>77</sup> , K <sup>80</sup> und K <sup>85</sup> modulieren die Funktion des HRSV-F-Proteins . . . . .	95
6.2.4	Die Aminosäure K <sup>75</sup> hat einen großen Einfluß auf die Funktion des HRSV-F-Proteins . . . . .	96
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>99</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>117</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>119</b>
<b>Anhang – Proteinsequenzen</b>		<b>125</b>
<b>Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge</b>		<b>127</b>
<b>Lebenslauf</b>		<b>129</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Das respiratorische Synzytialvirus

### 1.1.1 Taxonomie

Das respiratorische Synzytialvirus gehört zusammen mit dem murinen Pneumovirus zum Genus *Pneumovirus* innerhalb der Subfamilie *Pneumovirinae*. Diese bildet mit der Subfamilie *Paramyxovirinae* die Familie *Paramyxoviridae* (**Tabelle 1.1**) (COLLINS et al., 2001), die zur Ordnung *Mononegavirales* gerechnet wird.

Das respiratorische Synzytialvirus wurde 1956 erstmalig aus den oberen Atemwegen eines Schimpansen isoliert (MORRIS et al., 1956). Der Nachweis des Virus beim Menschen gelang ein Jahr später, so dass dieses Virus als humanes respiratorisches Synzytialvirus (HRSV) bezeichnet wurde (CHANOCK et al., 1957).

Verwandte Viren konnten auch bei anderen Spezies nachgewiesen werden. Das bovine respiratorische Synzytialvirus wurde erstmals 1967 in der Schweiz isoliert (PACCAUD und JACQUIER, 1970). Neben seiner serologischen Verwandtschaft zu HRSV (WALRAVENS et al., 1990) weist dieses Virus auch eine hohe Sequenzhomologie zu HRSV auf (COLLINS et al., 2001). BRSV ruft bei Kälbern ein vergleichbares Krankheitsbild wie HRSV bei Kindern hervor. Auch bei Ziegen und Schafen konnten mit dem Caprinen RSV bzw. dem Ovinen RSV serologisch verwandte respiratorische Synzytialviren nachgewiesen werden (SMITH et al., 1975; TRUDEL et al., 1989; MALLIPEDDI und SAMAL, 1993). Desweiteren gehört noch das Murine Pneumovirus, das erstmals 1939 beschrieben wurde, zum Genus *Pneumovirus* (HORSFALL und HAHN, 1939).

Der Name des Virus leitet sich von denen durch Fusion mit RSV infizierter Zellen mit ihren

Unterfamilie	Genus	Erreger
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	Humanes Parainfluenzavirus Typ 1 und Typ 3 Bovines Parainfluenzavirus Typ 3 Sendaivirus
	<i>Rubulavirus</i>	Mumpsvirus Humanes Parainfluenzavirus Typ 2 und Typ 4 Canines Parainfluenzavirus Typ 2
	<i>Avulavirus</i>	Newcastle-Disease-Virus
	<i>Morbillivirus</i>	Masernvirus Virus der Hundestaupe Rinderpestvirus
	<i>Henipavirus</i>	Hendravirus Niphavirus
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	Humanes RSV Bovines RSV Caprines RSV Ovines RSV Murines Pneumovirus
	<i>Metapneumovirus</i>	Humanes Metapneumovirus

**Tabelle 1.1:** Vertreter der Familie *Paramyxoviridae*

Nachbarzellen entstehenden mehrkernigen Riesenzellen her (COLLINS, 1991), die abgeleitet vom griechischen *syn* (zusammen) und *kytos* (Höhlung, Wölbung) als Synzytien bezeichnet werden.

### 1.1.2 Krankheitsbild

Das humane respiratorische Syncytialvirus ist bei Kindern unter einem Jahr der wichtigste virale Infektionserreger im unteren Respirationstrakt. Außerdem sind auch ältere Menschen häufig von RSV-Infektionen betroffen (THOMPSON et al., 2003; FALSEY et al., 2005). Die Infektion mit HRSV beschränkt sich auf die Wintermonate und ist hochansteckend. Die Erkrankung äußert sich durch grippale Infekte mit Fieber und Schnupfen. Häufig kommt es zu einer Entzündung

der Rachen- (Pharyngitis) und Luftröhrenschleimhäute (Trachitis), sowie der Bronchien und einer obstruktiven Bronchitis (MOORE und PEEBLES, 2006). Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass HRSV mit dem Auftreten von Asthma assoziiert ist (JOHNSTON et al., 1995; SIGURS et al., 1995, 2005).

Die Therapie erfolgt durch eine erhöhte Sauerstoffzufuhr und mit einem humanisierten monoklonalen Antikörper. Dieser wird auch bei Risikopatienten, z.B. bei früh geborenen Kindern, zur passiven Immunisierung verabreicht. Maternale Antikörper spielen nur eine geringe Rolle (CROWE und WILLIAMS, 2003).

Eine Infektion mit HRSV bewirkt nur eine unvollständige und kurzlebige Immunität. Infektionen können sich daher lebenslang wiederholen (HALL et al., 1991). Es kann sich auch eine Persistenz von HRSV entwickeln (SCHWARZE et al., 2004; TRIPP, 2004). Über 70% der Erwachsenen weisen Antikörper gegen HRSV auf (DER POEL et al., 1994). Ein Impfstoff ist zur Zeit nicht verfügbar. 1966 führte ein Impfstoff aus formalin-inaktiviertem RSV nicht nur zu einem ungenügenden Impfschutz, sondern auch bei nachfolgenden Infektionen zu verstärkten Symptomen und Todesfällen (CHIN et al., 1969; FULGINITI et al., 1969).

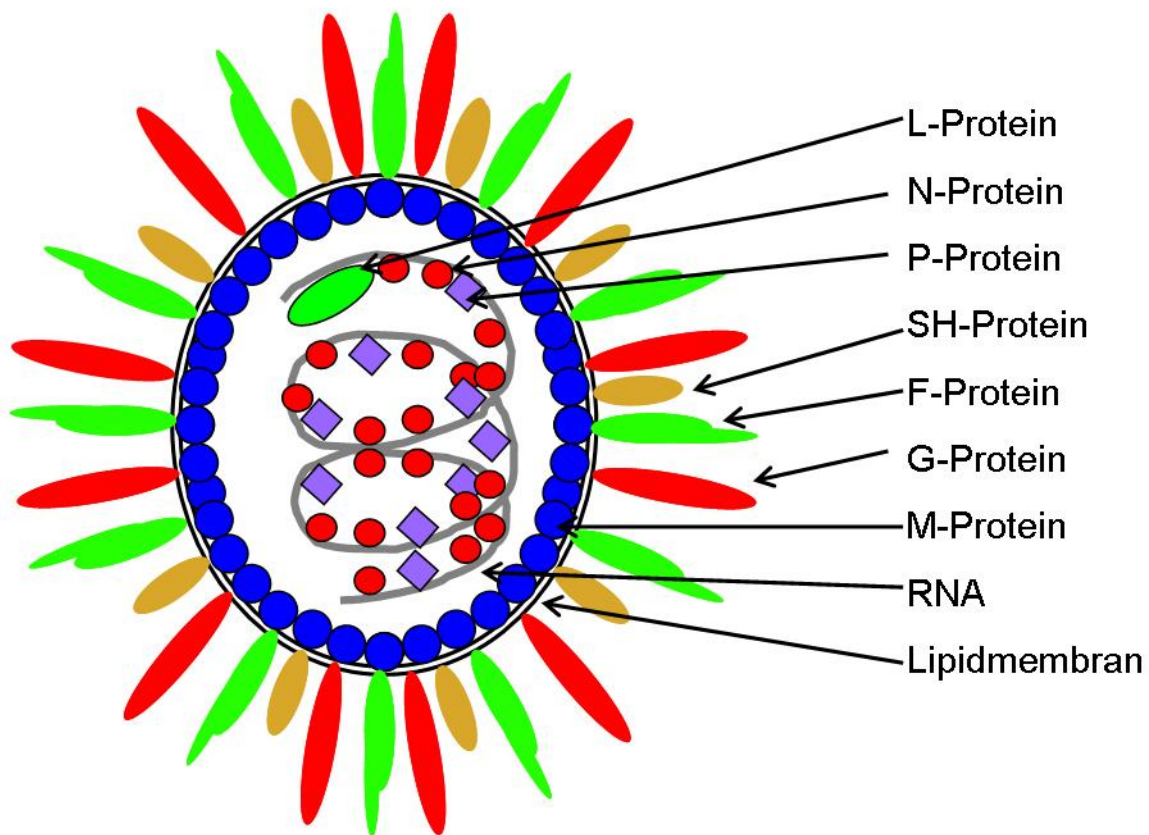
Bei Kälbern löst BRSV eine vergleichbare Krankheit aus, die große wirtschaftliche Bedeutung hat (DER POEL et al., 1994).

### 1.1.3 Morphologie und Genomorganisation

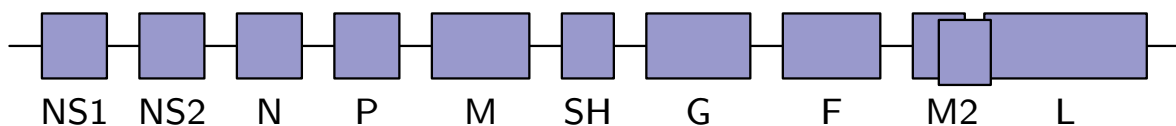
Die Viruspartikel haben meist sphärische Gestalt und einen Durchmesser von 150 bis 300 nm. Es treten aber auch filamentöse Virionen mit einem Durchmesser von 60 bis 100 nm und einer Länge von bis zu 10 µm auf (COLLINS et al., 2001). **Abbildung 1.1** gibt eine schematische Übersicht über das Virus.

Das Genom liegt als einzelsträngige, nicht segmentierte RNA mit negativer Polarität vor. Es hat eine Länge von ca. 15,2 kb und codiert für 10 Gene und 11 offene Leserahmen (**Abbildung 1.2**). Innerhalb des M2-Gens liegen 2 offene Leserahmen für die Proteine M2-1 und M2-2 vor (COLLINS et al., 2001).

Am 3'-Ende des Genoms findet sich eine 44 Basen lange Leader-Sequenz, am 5'-Ende eine 155 Basen lange Trailersequenz. Zwischen den einzelnen Genen finden sich intergenische Ab-



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des respiratorischen Synzytialvirus



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des Virusgenoms von RSV. (Die Gene sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet.)

schnitte. Die 3'- und 5'-Enden der Gene besitzen konservierte Start- und Stopp-Transkriptions-Sequenzen (COLLINS et al., 2001).

Die Lipiddoppelmembran des Partikels entsteht durch einen Knospungsprozess an der Plasmamembran der Wirtszelle. Das F-, G- und SH-Protein sind in der Membran integral verankert. Das M-Protein befindet sich auf der Innenseite der Membran, und die Proteine L, N, P, M2-1 und M2-2 sind mit der genomischen RNA assoziiert. Daneben verfügt RSV noch über die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 (COLLINS, 1995; COLLINS et al., 2001). Eine Aufstellung



sämtlicher RSV-Proteine findet sich in **Tabelle 1.2**.

### 1.1.4 Strukturproteine

#### Nukleokapsid-assoziierte Proteine

Die Proteine N, P, L und M2 bilden gemeinsam mit der RNA das Nukleokapsid und sind an der Transkription und Replikation von RSV beteiligt. N, P und L reichen aus, um ein BRSV-Minigenom zu konstruieren, dessen Effektivität sich durch geringe Mengen M2 steigern lässt (YUNUS et al., 1998).

Das Nukleokapsidprotein (N-Protein) ist 42 kDa groß. Eine direkte Interaktion mit dem Phosphoprotein konnte nachgewiesen werden (MALLIPEDDI et al., 1996; KRISHNAMURTHY und SAMAL, 1998).

Das 27 kDa große Phosphoprotein (P-Protein) ist hydrophil und überwiegend am N-Terminus phosphoryliert. An zwei Regionen des Proteins, in der Mitte und am C-Terminus, finden sich gehäuft saure Aminosäuren (SATAKE et al., 1984).

Das 250 kDa große *large* Protein (L-Protein) stellt die RNA-abhängige RNA-Polymerase dar, die benötigt wird, um das als Negativstrang vorliegende RNA-Genom in einen Positivstrang umzuschreiben (STEC et al., 1991). Das L-Protein besitzt Proteinkinaseaktivität und bindet sowohl an das Nukleokapsid- als auch an das Phosphoprotein (COLLINS et al., 2001).

Der Leserahmen für das M2-Protein überlappt teilweise mit dem Leserahmen des L-Proteins (STEC et al., 1991). Darüber hinaus enthält die M2-mRNA zwei offene Leserahmen (HARDY und WERTZ, 1998). Die Nukleotide 10-594 kodieren das M2-1-Protein, die Nukleotide 563-853 das M2-2-Protein (COLLINS et al., 1990). M2-1 bindet an das N-Protein (GARCIA et al., 1993; GARCÍA-BARRENO et al., 1996). Es wirkt als Antiterminationsfaktor bei der RNA-Transkription (FEARNS und COLLINS, 1999). Das M2-2-Protein ist bei der Umschaltung vom Transkriptions- zum Replikationsmodus von Bedeutung, jedoch nicht essentiell (BERMINGHAM und COLLINS, 1999; JIN et al., 2000).

Protein	Molekulargewicht in kDa / Modifikationen	charakteristische Eigenschaften und Funktion
F0	70 N-glykosyliert, acyliert	Vorläuferprotein, wird fusionsaktiv nach der Spaltung in F1- und F2-Untereinheit. F1: 48 kDa, Typ-I-Membranprotein, N-glykosyliert, acyliert, carboxyterminale Region von F0, Fusionspeptid am N-Terminus, wichtiges Ziel der humoralen Immunantwort, Fusionseigenschaft, über Disulfidbrücken mit F2 zu einem Heterodimer verbunden F2: 20 kDa, N-glykosyliert, aminoternale Region von F0, Signalpeptid am N-Terminus
G	90 O-/N-glykosyliert	Bindung an Proteoglykane, Transmembranregion am N-Terminus (Typ-II-Membranprotein), hoher Kohlenhydratanteil
SH	13, glykosyliert	Membranprotein, anti-apoptotische Funktion
M	25	Matrixprotein, zwischen Nukleokapsid und Membraninnenseite lokalisiert, initiiert "self-assembly"
N	45	Nukleokapsidprotein, Teil des Polymerasekomplexes
P	33, phosphoryliert	Teil des Polymerasekomplexes
L	250	Teil des Nukleokapsids, RNA-abhängige RNA-Polymerase
M2-1	22, phosphoryliert	Elongationsfaktor der Transkription
M2-2	11	vermittelt die Umschaltung von Transkription auf Replikation
NS1	14	Interferon-Antagonist
NS2	15	Interferon-Antagonist

**Tabelle 1.2:** Übersicht über die RSV-Proteine und ihre virale Funktion

## **M-Protein**

Das Matrixprotein (M-Protein) ist 29 kDa groß. Es spielt bei den Paramyxoviren eine zentrale Rolle bei der Bildung der Virionen (SATAKE und VENKATESAN, 1984; GALINSKI et al., 1987; SPRIGGS et al., 1987). Ein Signalpeptid oder eine Transmembrandomäne sind nicht vorhanden. Das M-Protein interagiert mit der Plasmamembran der Wirtszelle, bildet eine Proteinschicht auf der Innenseite der Virushülle und zieht die übrigen Virusbestandteile für den Knospungsprozess an der Zellmembran zusammen, weshalb eine Wechselwirkung mit den viralen Glykoproteinen und dem Nukleokapsid postuliert wird (BOWEN und LYLES, 1982).

## **SH-Protein**

Das *small hydrophobic* Protein (SH-Protein) hat ein theoretisches Molekulargewicht von 13 kDa. Bei HSRV wurden unterschiedlich glykosylierte Isoformen dieses Membranproteins nachgewiesen (OLMSTED und COLLINS, 1989). Es kann die beiden anderen Oberflächenproteine G und F unterstützen, indem es die Bindungsaffinität gegenüber Heparinstrukturen erhöht (FELDMAN et al., 2000). Rekombinantes RSV bei dem das SH-Gen deletiert wurde, ist in Zellkultur überlebensfähig; allerdings sind die Virustiter geringer (BUKREYEV et al., 1997). Neuere Studien zeigten, dass das SH Protein eine anti-apoptotische Wirkung hat (FUENTES et al., 2007).

## **G-Protein**

Das Glykoprotein G ist ein Typ-II-Membranprotein. Es hat aufgrund der starken O-Glykosylierung ein Molekulargewicht von 84 bis 90 kDa (McINTOSH und CHANOCK, 1985). Das theoretische Molekulargewicht betrug lediglich 30 kDa. Die Divergenz der G-Proteine innerhalb der Spezies HRSV führte zur Einteilung in die Serotypen A und B (JOHNSON et al., 1987). Das G-Protein unterstützt das F-Protein bei der Bindung der Virionen an die Wirtszelle (LEVINE et al., 1987).

Neben der membrangebundenen Form gibt es in infizierten Zellen eine weitere Variante, die weder zytoplasmatischen Abschnitt noch Transmembrandomäne aufweist. Dieses verkürzte G-Protein wird in löslicher Form von den Zellen sezerniert (HENDRICKS et al., 1988; ROBERTS et al., 1993).

Zu den Bindungsproteinen der anderen Paramyxoviren zeigt das Glykoprotein deutliche strukturelle Unterschiede (LANGEDIJK et al., 1996). Hämagglutinierende Eigenschaften sind nicht vorhanden. Ein Bindungsvermögen des G-Proteins an Heparin konnte nachgewiesen werden (KRUSAT und STRECKERT, 1997; BOURGEOIS et al., 1998). Weiter verfügt das G-Protein über ein CX3C-Chemokin-Motiv, welches mit dem Chemokin-Rezeptor CX3CR1 interagiert und so eine antiinflammatorische Wirkung entfalten kann (TRIPP et al., 2001; HAYNES et al., 2003; HARCOURT et al., 2006).

Das G-Protein ist nicht essentiell für die Virusvermehrung, wie Versuche mit rekombinantem RSV, dem das Gene für das G-Protein fehlte, zeigten (KARRON et al., 1997; TENG et al., 2001; TECHAARPORNKUL et al., 2001).

## **F-Protein**

Das Fusionsprotein (F-Protein) bewirkt die Fusion der Virusmembran mit der Plasmamembran der betroffenen Zelle. (BRATT und GALLAHER, 1969; CHOPPIN und COMPANS, 1975; WALSH und HRUSKA, 1983). Es handelt sich um ein Typ I-Membranprotein, an dessen N-Terminus sich ein Signalpeptid für den Transport des Translationskomplexes zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet. Dieses wird im Laufe der Prozessierung abgespalten. Der Transmembrananker trennt die große N-terminale Ektodomäne vom kurzen C-terminalen Abschnitt, der im Zytoplasma lokalisiert ist (COLLINS et al., 1984).

Das Fusionsprotein wird als Vorläuferprotein  $F_0$  synthetisiert, das eine Masse von ca. 70 kDa hat. Das Protein ist zahlreichen posttranslationalen Modifikationen unterworfen, wie der Acylierung (ARUMUGHAM et al., 1989) und der N-Glykosylierung (CASH et al., 1979; MORRISON, 1988; MALLIPEDDI et al., 1996). Potentielle N-Glykosylierungsstellen des HRSV-F-Proteins sind N27, N70, N116, N120, N126 und N500 (ZIMMER et al., 2001b). Desweiteren findet eine Oligomerisierung statt (COLLINS, 1991), wobei Trimere des F-Proteins gebildet werden (CALDER et al., 2000; MATTHEWS et al., 2000).

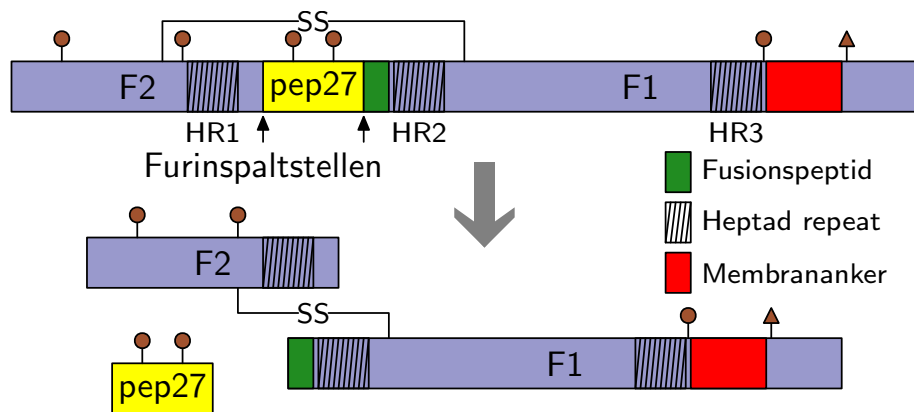
Das zunächst gebildete Vorläuferprotein ist noch biologisch inaktiv. Entscheidend zur Erlangung der Fusionsaktivität ist die proteolytische Spaltung in die Untereinheiten  $F_1$  (48 kDa) und  $F_2$  (20 kDa) (GRUBER und LEVINE, 1983), die allerdings über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben (ELANGO et al., 1985). Als Spaltstelle wurde das multibasische Aminosäu-

remotiv Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Arginin-Arginin (K-K-R-K-R-R<sup>136</sup>) identifiziert, das hinter der Aminosäure 136 von der ubiquitären Protease Furin im trans-Golgi-Netzwerk gespalten wird (ELANGO et al., 1985). Zusätzlich konnte noch ein weiteres Furinspaltmotiv stromaufwärts entdeckt werden. Es befindet sich an der Position 109 und besitzt die Sequenz Arginin-Alanin-Arginin-Arginin (R-A-R-R) (GONZÁLEZ-REYES et al., 2001; ZIMMER et al., 2001a). Diese doppelte Spaltstelle des RSV F-Proteins ist unter den Pa ramyxoviren einzigartig.

Die N-terminale Spaltstelle ist für die Replikation und Virusvermehrung in Zellkultur entbehrlich (ZIMMER et al., 2002). In der Elektronenmikroskopie können je nach Spaltung der beiden Motive unterschiedliche strukturelle Ausprägungen des Fusionsproteins beobachtet werden (RUIZ-ARGÜELLO et al., 2002). Als Folge der Spaltung an den beiden Motiven wird ein 27 Aminosäuren großes Peptid freigesetzt. Bei BRSV wird es durch weitere Modifikationen zu Virokinin, einem Peptidhormon der Tachykinin-Familie umgewandelt (ZIMMER et al., 2003). Die Bedeutung von Pep27 bei HRSV, welches keine Sequenzhomologie zu dem bovinen Pep27 aufweist, ist noch nicht geklärt. Durch die proteolytische Spaltung wird am N-terminalen Ende der F1-Einheit eine stark hydrophobe Domäne, das Fusionspeptid freigesetzt. Dieses Peptid kann mit der Plasmamembran der Wirtszelle wechselwirken und leitet den Fusionsprozess ein (COLLINS et al., 2001).

C-Terminal vom Fusionspeptid und N-terminal vom Membrananker sind zwei *heptad repeat*-Domänen lokalisiert (HR2 bzw. HR3). Eine weitere solche Domäne (HR1) findet sich in der F<sub>2</sub>-Untereinheit (MATTHEWS et al., 2000). *heptad repeats* sind sich wiederholende Sequenzen von sieben Aminosäuren, wobei die Positionen a und d meist mit hydrophoben Resten besetzt sind. Daneben sind die Positionen e und g oftmals mit geladenen Aminosäuren besetzt. Die HR3-Domänen der drei F-Proteine eines Trimers bilden eine *coiled coil*-Struktur aus und interagieren ihrerseits wieder mit den HR2-Domänen (ZHAO et al., 2000; WANG et al., 2003; LAWLESS-DELMEDICO et al., 2000; MATTHEWS et al., 2000). Synthetische Peptide, die der HR2-Domäne entsprechen, sind wirksame Inhibitoren der Fusionsaktivität, woraus geschlossen werden kann, dass der HR2-HR3-Komplex auch für die Fusion von Bedeutung ist (LAMBERT et al., 1996; DOUGLAS et al., 2003).

Wie bei vielen Paramyxoviren ist die Fusion bei RSV pH-unabhängig. Eine Folge davon ist die Ausbildung von Synzytien, die dadurch entstehen, dass auf der Oberfläche der Zellen exprimierte F-Proteine die Fusion der Zelle mit der benachbarten Zelle einleiten. Versuche mit einer



**Abbildung 1.3:** Proteolytische Prozessierung des RSV-Fusionsproteins

HRSV-Deletionsmutante cp-52, der die Genabschnitte für das G- und für das SH-Protein fehlen, zeigen, dass das Fusionsprotein allein, unabhängig von G und SH, eine Infektion vermitteln kann (KARRON et al., 1997). Dies deutet darauf hin, dass das F-Protein von RSV im Gegensatz zu den Fusionsproteinen vieler anderer Paramyxoviren selbst rezeptorbindende Eigenschaften hat. Es konnte gezeigt werden, dass RSV mit Heparin-ähnlichen Strukturen interagiert (KRUSAT und STRECKERT, 1997; MARTÍNEZ und MELERO, 2000; TECHAARPORNKUL et al., 2002; HALLAK et al., 2007). Entfernt man Heparin als Bindungspartner enzymatisch, sinkt die Infektiosität der Deletionsmutante cp-52 (FELDMAN et al., 2000). Die F2-Untereinheit wird für die speziespezifische Infektion von BRSV bzw. HRSV verantwortlich gemacht (SCHLENDER et al., 2003). Eine weitere wichtiger Faktor für die Fusionseigenschaften ist die Bindung des F-Proteins an RhoA (PASTEY et al., 1999; McCURDY und GRAHAM, 2003; GOWER et al., 2005). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Peptide, die einem Bereich des RhoA entsprechen, wirksame Inhibitoren der HRSV-Replikation sind (PASTEY et al., 2000; BUDGE et al., 2003)

Das F-Protein ist das Hauptantigen von RSV und induziert im Wirtsorganismus die Bildung neutralisierender Antikörper (OLMSTED et al., 1986; PEMBERTON et al., 1987; WERTZ et al., 1987; KIMMAN und WESTENBRINK, 1990). Es hat auch eine immunmodulatorische Wirkung, da es die mitogen-induzierte Proliferation von T-Zellen durch bloßen Kontakt mit diesen hemmen kann (SCHLENDER et al., 2002).

### 1.1.5 Nichtstrukturproteine

Die RNA des respiratorischen Synzytialvirus kodiert für zwei Nichtstrukturproteine. Das saure NS1-Protein ist 14 kDa groß, das basische NS2-Protein 15 kDa groß. Letzteres hat in infizierten Zellen eine Halbwertszeit von lediglich 30 min, während NS1 stabil ist und mit dem Matrixprotein assoziiert (EVANS et al., 1996). Beide Nichtstrukturproteine können nicht in Virionen, sondern nur in RSV-infizierten Zellen nachgewiesen werden (COLLINS et al., 2001). Einzeln oder gemeinsam scheinen sie keinen Effekt auf das "self assembly" oder auf die Passagierung von Virus-ähnlichen Partikeln zu haben (TENG und COLLINS, 1998). Sie haben offenbar immunologische Bedeutung, denn gemeinsam wirken sie antagonistisch auf die Interferon- und Interleukin-vermittelte antivirale Zellantwort (SCHLENDER et al., 2000; BOSSERT et al., 2003; Lo et al., 2005; KOTELKIN et al., 2006; WRIGHT et al., 2006). Rekombinante Viren, denen das NS2-Protein fehlt, sind im Tierversuch attenuiert (WHITEHEAD et al., 1999).





## 2. Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine ursächliche Verbindung zwischen der Fusionsaktivität und den proapoptotischen Eigenschaften des F-Proteins herzustellen. Zu diesem Zweck sollten transgene Epithelzelllinien hergestellt werden, welche das F-Protein von HRSV bzw. BRSV sowie Chimären der beiden Proteine exprimierten. Außerdem sollten Mutanten hergestellt werden, bei denen die proteolytische Spaltstellen des Pep27, das dazwischen liegende Pep27 oder das Fusionspeptid modifiziert waren. Ein weiteres Ziel war die Herstellung einer löslichen Form des F-Proteins. Die Mutanten sollten hinsichtlich ihrer proteolytischen Prozessierung, des Transportes zur Plasmamembran, ihrer Fusionseigenschaften und ihrer Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung einer hochkonservierten basischen Domäne in der F<sub>2</sub>-Unterheit für die Funktion des F-Proteins zu analysieren. Dazu wurden entsprechende Mutanten des F-Proteins mit der zytoplasmatischen Domäne des F-Proteins vom Sendaivirus versehen und dazu verwendet, eine F-Deletionsmutante des Sendaivirus zu komplementieren. Auf diese Weise konnte die Funktion der Mutanten im Kontext einer Virusinfektion untersucht werden. Parallel dazu wurde der Einfluss der Mutationen auf Oberflächentransport, proteolytische Spaltung und Fusionsaktivität und Inkorporation des mutierten Proteins in die Viruspartikel analysiert.



## 3. Materialien

### 3.1 Zelllinien

BHK-21	Hierbei handelt es sich um eine etablierte Zelllinie aus Nierengewebe eines jungen syrischen Goldhamsters ( <i>baby hamster kidney</i> ) aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig). Sie wurde durch das Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.
MDCK-II	Die <i>Madin Darby canine kidney</i> -Zellen Typ II wurden 1958 aus der Niere eines weiblichen Cocker-Spaniels gewonnen. Die Zellen wurden durch das Institut für Virologie der Stiftung Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.
MDCK-(bF-GFP)	Diese Zellen expremierten nach Induktion mit Mifepriston das BRSV-F-GFP-Protein. Die Zellen wurden von Frau Julia Eckardt-Michel vom Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.
MDCK-(gp40-GFP)	Diese Zellen expremierten nach Induktion mit Mifepriston das gp40-GFP-Protein. Die Zellen wurden von Frau Julia Eckardt-Michel vom Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.
MDCK-(SeV-F)	Diese Zellen expremierten nach Induktion mit Mifepriston das F-Protein des Sendaivirus. Die Zellen wurden von Frau Diane Baxmann vom Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

---

MDCK-(SeV-F-GFP)	Diese Zellen exprimierten nach Induktion mit Mifepriston das SeV-F-GFP-Protein. Die Zellen wurden von Frau Diane Baxmann vom Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.
Vero	Die Vero-Zellen stammen aus dem Nierengewebe der Grünen Meerkatze (African green monkey kidney). Die etablierten Zelllinie wurde vom Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

---

## 3.2 Viren

### Sendai-Virus

Das rekombinante Sendavirus SeV- $\Delta$ F wurden von Sascha Bossow, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

## 3.3 Bakterienstämme

### *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Bakterien wurden von der Firma Stratagene erworben.

## 3.4 Plasmide

pPCR-Script-bFhpsynStrep	Das Plasmid enthält eine optimierte DNA-Sequenz für die ersten 444 Basen des BRSV-F-Gens, das statt des bovinen Pep27 das humane Pep27 enthält, welches am N-Terminus mit einem Strep-Epitop versehen ist. Das Plasmid wurde von der Firma <i>GeneArt</i> , Regensburg, synthetisch hergestellt. Die Sequenz ist im Anhang enthalten.
--------------------------	---

---

pcD-hF	Das Plasmid enthielt das kodon-optimierte Gen für das HRSV-F-Protein (Accession-Nr.: ABQ42594). Es wurde von Herrn Thomas Grunwald, Abteilung für Molekulare und Medizinische Virologie, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.
pCDNA3.1(+)	Das Plasmid wurde von der Firma <i>Invitrogen</i> erworben.
pCDNA3.1-hF <sub>MT</sub>	In das Plasmid war ein kodon-optimiertes chimäres HRSV-F-Gen kloniert worden, dessen zytoplasmatische Domäne und Membrananker gegen die entsprechenden Domänen des SeV-F-Gens ausgetauscht worden war. Es wurde von Herrn Gert Zimmer, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Die Aminosäuresequenz findet sich im Anhang.
pCMV-3Tag-3	Das Plasmid wurde von der Firma <i>Stratagene</i> erworben.
pEGFP-N1	Das Plasmid wurde von der Firma <i>Clontech</i> erworben.
pE-Cav-1	In das Plasmid pEGFPC1 war das Gen für das humane Caveolin-1 (Accession-Nr.: BE878203) kloniert worden. Es wurde von Herrn Gert Zimmer, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.
pGene und pSwitch	Die Plasmide gehörten zum GeneSwitch-System. Sie wurden von der Firma <i>Invitrogen</i> erworben.
pGene-bF-GFP	Das Plasmid enthielt das kodon-optimierte Gen für das BRSV-F-Protein (Accession-Nr.: CAN90052), welches C-terminal mit einem GFP fusioniert war. Es wurde von Frau Julia Eckardt-Michel, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.
pGene-SeVF	Das Plasmid enthielt das kodon-optimierte Gen für das Sendaivirus-F-Protein (Accession-Nr.: CAN89776). Es wurde von Frau Diane Baxmann, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.
pIRES-hrGFPII	Das Plasmid wurden von der Firma <i>Stratagene</i> erworben.

---

### 3.5 Medien

#### **EDulb (Dulbecco's Minimal Essential Medium), pH 6,9**

EDulb-Fertigpulver	13,53 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g
Aqua bidest. steril	ad 1 l

#### **EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), pH 7,0**

EMEM-Fertigpulver	9,6 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g
Aqua bidest. steril	ad 1 l

Die Fertigpulver stammten von der Firma GIBCO BRL Life Technologies und wurden pro Liter mit 0,06 g Penicillin G und 0,05 g Streptomycin-Sulfat (Sigma) versetzt.

#### **LB-Medium**

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
Reinstwasser	Ad 1 l
pH 7,5, autoklaviert	

#### **Methylcellulose**

4 g Methylcellulose werden in einer 500 ml-Flasche autoklaviert, mit 500 ml EDulb, 2 % FKS und Penicillin/Streptavidin versetzt und 3 Tage bei 4°C gerührt.

### 3.6 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I pH 9,0	1M Tris	300 ml
	Ethanol	200 ml
	Reinstwasser	500 ml
Anodenpuffer II pH 7,4	1M Tris	25 ml
	Ethanol	200 ml
	Reinstwasser	770 ml
1x Auftragspuffer	Glycerin	30% (v/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Kathodenpuffer pH 9,4	1M Tris	25 ml
	Aminocaprinsäure	5,25 g
	Ethanol	200 ml
	Reinstwasser	770 ml
MgSO <sub>4</sub> /HEPES- Puffer	MgSO <sub>4</sub>	100 mM
	HEPES	50 mM
Natriumacetatpuffer pH 5,5	Natriumacetat	150 mM
NP40-Lysispuffer pH 7,5	Natriumdesoxycholat	0,5%
	Nonidet P40	1%
	Tris HCl, pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
bei Bedarf:	Protease-Inhibitor "Complete"	1 Tablette auf 50 ml
PBS pH 7,5	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12 g
	MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,132 g
	Reinstwasser	ad 1 l
PBS-Glycin	Glycin	0,1 M

PBSM pH 7,5	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Reinstwasser	ad 1 l
PBSM 0,1% Tween	PBSM	2 l
	Tween	2 ml
Phosphatpuffer pH 7,0	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
	NaH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
Sammelgellösung für Polyacrylamidgele	H <sub>2</sub> O	3,4 ml
	Acrylamidlösung 30%	0,83 ml
	1M Tris HCl, pH 6,8	0,63 ml
	10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
	10% APS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
	TEMED	10 µl
10x SDS-Laufpuffer pH 8,4	SDS	10 g
	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	Reinstwasser	ad 1 l
2x SDS-Probenpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	10 ml
	10% SDS	20 ml
	Glycerin	10 ml
	Reinstwasser	9 ml
	2% Bromphenolblau	1 ml
10x TAE-Puffer pH 8,0	Tris	40 mM
	Natriumacetat	20 mM
	EDTA	2 mM
	Reinstwasser	Ad 1l
10x TBE-Puffer pH 8,0	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM



TFB I pH 5,8; sterilfiltriert	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerin	15 %(v/v)
	Kaliumacetat	30 mM
	Rubidiumchlorid	100 mM
	Manganchlorid	50 mM
TFB II pH 7,0; autoklaviert	MOPS	10 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15 %(v/v)
Trenngellösung (10%) für Polyacrylamidgele	H <sub>2</sub> O	4 ml
	Acrylamidlösung 30%	3,3 ml
	1M Tris HCl, pH 8,8	2,5 ml
	10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	100 µl
	10% APS (in H <sub>2</sub> O)	100 µl
	TEMED	16 µl
Trenngellösung (8%) für Polyacrylamidgele	H <sub>2</sub> O	4,6 ml
	Acrylamidlösung 30%	2,7 ml
	1M Tris HCl, pH 8,8	2,5 ml
	10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	100 µl
	10% APS (in H <sub>2</sub> O)	100 µl
	TEMED	16 µl
Trypsin 0,125% pH 7,0	NaCl	8,0 g
	KCl	0,20 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O	2,31 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,20 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,13 g
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,10 g
	Trypsin	1,25 g
	Versen (EDTA)	1,25 g
	Streptomycin	0,05 g
	Penicillin	0,06 g
	Aqua bidest. ster.	ad 1 l

### 3.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')
1	hFsyn-S(HindIII)	GGC CGG AAG CTT ATG GCC ACG ACC ACG ATG CGG ATG
2	hFsyn-GFP-AS(KpnI)	TGG GCC GGT ACC GTG TTG GAG AAG GCG ATG TTG TTG
3	hFsyn-SANN-S	TGC CGC CAA CAA CAG CGC CAA CAA CGA GCT GCC CCG GTT CAT GAA C
4	hFsyn-SANN-AS	CCG GGG CAG CTC GTT GTT GGC GCT GTT GTT GGC GGC AGG GGT AGA
5	hFsyn-KGR-S	ACC AAC GTG ACC CTG AGC AAG GGG AGA TTC CTG GGC TTT CTG CTG GGA
6	hFsyn-KGR-AS	GCC CAG GAA TCT CCC CTT GCT CAG GGT CAC GTT GGT TTT CTT GGT GTT
7	hFsyn-RR-S	ACC AAC GTG ACC CTG AGC CGG AGA TTC CTG GGC TTT CTG CTG GGA GTG
8	hFsyn-RR-AS	AAA GCC CAG GAA TCT CCG GCT CAG GGT CAC GTT GGT TTT CTT GGT GTT G
9	hFsN126Q-s	ACA CCA AGA AAA CCC AGG TGA CCC TGA GCA AGA AGC G
10	hFsN126Q-as	CTT GCT CAG GGT CAC CTG GGT TTT CTT GGT GTT GTT C
11	hF(p-5)syn-s	AGA GCC AGA CGG ATG AAC TAC ACC CTG AAC AAC ACC
12	hF(p-5)syn-as	AGG GTG TAG TTC ATC CGT CTG GCT CTG TTG TTG GCG GC
13	hFs(p-4)-s	AGA AAA CCA ACG TGA CCC GGA AGC GGA GAT TCC TGG G

14	hFs(p-4)-as	CCA GGA ATC TCC GCT TCC GGG TCA CGT TGG TTT TCTT
15	hFhpStrep1cc-s	AGA AGC GGA GAT TCC TGG GCT TTC TGC TGG GAG TGG GC
16	hFhpStrep1ccc-as	TCC CAG CAG AAA GCC CAG AAA TCT CCG CTT CCG CTT CTT GCT C
17	hFsyn-L141N-s	GGC TTT AAT CTG GGA GTG GGC TCT GCC
18	hFsyn-L141N-as	TCC CAG ATT CCC GCC CAG GAA TCT CCG
19	bFhpCterm-s	AAG CGG AGA TTC CTA GGC TTC CTG CTG
20	bFhpCterm-as	GCC TAG GAA TCT CCG CTT CCG CTT CTT
21	hFbpCterm-s	AAG CGC CGC TTC CTG GGC TTT CTG CTG
22	hFbpCterm-as	GCC CAG GAA GCG GCG CTT GCG CTT CTT
23	hFbpNterm-s	GCC AGA CGG GGC ATC CCG GAG CTG ATC
24	hFbpNterm-as	CGG GAT GCC CCG TCT GGC TCT GTT GTT
25	bFhpNterm-s	GCC AAG AGA GAG CTG CCC CGG TTC ATG
26	bFhpNterm-as	GGG CAG CTC TCT CTT GGC TCT GCT GCT
27	hFsp-Flag1n-s	CAA CAA CAG AGC CAG ACG GGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA TAA GGA CTA T
28	hFsp-Flag1n-as	GTC GTC ATC CTT GTA ATC CCG TCT GGC TCT GTT GTT GGC GGC AGG GGT A
29	hFsp-Flag1c-s	ATA AAG GTA GTG GTA GCG AGC TGC CCC GGT TCA TGA ACT ACA CCC TG
30	hFsp-Flag1c-as	AGC TCG CTA CCA CTA CCT TTA TCG TCA TCA TCT TTG TAG TCC TTG TC
31	hFsp-Flag2n-s	CCC TGG GTA GTG GTA GCG ATT ACA AGG ATG ACG ACG ATA AGG ACT AT
32	hFsp-Flag2n-as	GTA ATC GCT ACC ACT ACC CAG GGT CAC GTT GGT TTT CTT GGT GTT GT
33	hFsp-Flag2c-s	CAA AGA TGA TGA CGA TAA AAG CAA GAA GCG GAA GCG GAG ATT CCT GGG C

34	hFsp-Flag2c-as	CCG CTT CCG CTT CTT GCT TTT ATC GTC ATC ATC TTT GTA GTC CTT GTC
35	bFsynHindIII-s	GGC CGG AAG CTT ATG GCC ACG ACC ACG ATG CGG ATG
36	bFsyn-GFP-AS(KpnI)	CCG GCC GGT ACC TTG CTG AAG CTC AGG TTG TTG
37	hFhpStrep1n-s	AGA GCC AGA CGG GCC AGC TGG AGC CAC CCT CAG TTC
38	hFhpStrep1n-as	CTC CAG CTG GCC CGT CTG GCT CTG TTG TTG GCG GC
39	hFhpStrep1c-s	AGA AGC GGA GAT TTC TGC TGG GAG TGG GCT CTG CCA TC
40	hFhpStrep1c-as	CAC TCC CAG CAG AAA TCT CCG CTT CCG CTT CTT GCT C
41	hFsyn-EcoRI-S	GCA ATT GAA TTC ACC ATG GAG CTG CCT ATC CTG AAG G
42	hFsyn-EcoRI-AS-sol	TCT GCA GAA TTC CCG TTG GTG GTG CTC TTG CCG GCG TT
43	hFsyn-XhoI(478)-s	GGT GCT GCA CCT CGA GGG AGA GGT GAA CAA GAT CAA GAG CGC CCT GC
44	hFsyn-XhoI(478)-as	CAC CTC TCC CTC GAG GTG CAG CAC CTT AGA CAC GGC GAT GCC AGA GG
45	hFsyn-XbaI-as	CCT AAT CTA GAC TGG ACT TAT CAG TTG GAG AAG G
46	SeVFsyn-XbaI-as	TTG GAA TCT AGA TCA CCG CTT CTC GGC CAT
47	hFs-K65N-s	AAC ATC AAC GAG AAC AAG TGC AAC GGC ACC GAC GCC
48	hFs-K65N-as	GTT GAT GTT GCT CAG CTC GAT GGT GAT CAC GCT GGT
49	hFs-K68N-s	GAG AAC AAC TGC AAC GGC ACC GAC GCC AAG GTG AAG

50	hFs-K68N-as	GTT GCA GTT GTT CTC CTT GAT GTT GCT CAG CTC GAT
51	hFsyn-K75N-s	GGC ACC GAC GCC AAC GTG AAG CTG ATG AAG CAG GAG CTG GAC AAG TAC
52	hFsyn-K75N-as	CAT CAG CTT CAC GTT GGC GTC GGT GCC GTT GCA CTT GTT CTC CTT GAT
53	hFsyn-K77N-s	GAC GCC AAG GTG AAC CTG ATG AAG CAG GAG CTG GAC AAG TAC AAG AAC
54	hFsyn-K77N-as	CTG CTT CAT CAG GTT CAC CTT GGC GTC GGT GCC GTT GCA CTT GTT CTC
55	hFs-K80N-s	CTG ATG AAC CAG GAG CTG GAC AAG TAC AAG AAC GCC
56	hFs-K80N-as	CTC CTG GTT CAT CAG CTT CAC CTT GGC GTC GGT GCC
57	hFs-K85N-s	CTG GAC AAC TAC AAG AAC GCC GTG ACC GAA CTG CAG
58	hFs-K85N-as	CTT GTA GTT GTC CAG CTC CTG CTT CAT CAG CTT CAC
59	hFs-K87N-s	AAG TAC AAC AAC GCC GTG ACC GAA CTG CAG CTG CTG
60	hFs-K87N-as	GGC GTT GTT GTA CTT GTC CAG CTC CTG CTT CAT CAG
61	hFsyn(588)-S	GAA CTA CAT CGA CAA GCA GC
62	hFsyn-(1186)-S	ATG ACC AGC AAG ACC GAC G
63	hFsCT-syn-s	AAG GCC AGA CTG AAG CGG AGC ATG CTG
64	hFsCT-syn-as	CCG CTT CAG TCT GGC CTT ACA GTA CAG

## 3.8 Antikörper

$\alpha$ -BRSV-FITC (monospezifisches Rinderse- rum gegen das F-Protein, FITC-konjugiert)	Institut für Virologie, Stiftung Tierärztli- che Hochschule Hannover
$\alpha$ -Flag M2 (monoklonaler Maus-Antikörper gegen die Flag-Sequenz)	Sigma
$\alpha$ -Kaninchen-IgG-Cy3 (aus Schaf)	Sigma
$\alpha$ -Maus-IgG-biotinyliert (aus Schaf)	Amersham
$\alpha$ -Maus-IgG-Cy3 (aus Schaf)	Sigma
$\alpha$ -NF $\kappa$ B,p65 (aus Kaninchen)	Stressgene
$\alpha$ -RSV-F (monoklonaler Maus-Antikörper gegen das RSV-F-Protein)	Serotec
$\alpha$ -RSV-F (monoklonaler Maus-Antikörper gegen das RSV-F-Protein, Klon 13)	Geraldine Taylor, Institute for Animal Health, Compton, United Kingdom
$\alpha$ -RSV-F (monoklonaler Maus-Antikörper gegen das RSV-F-Protein, Klon 19)	Geraldine Taylor, Institute for Animal Health, Compton, United Kingdom
$\alpha$ -SeV-M (monoklonaler Maus-Antikörper gegen das SeV-M-Protein)	Institut für Virologie, Stiftung Tierärztli- che Hochschule Hannover

## 3.9 Enzyme

### 3.9.1 Restriktionsenzyme

<i>Asi</i> I	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas
<i>Not</i> I	MBI Fermentas
<i>Xba</i> I	MBI Fermentas
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas

### 3.9.2 Andere Enzyme

T4 DNA-Ligase (5U/μl)	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase rekombinant (2,5 U/μl)	MBI Fermentas
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5U/μl)	MBI Fermentas
CIAP (calf intestine alkaline phosphatase, 1U/μl)	MBI Fermentas
Streptavidin-Peroxidase (HRP)-Komplex	Amersham/Pharmacia

### 3.10 Kits

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin-Mini-Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid MIDI und MAXI Kit	Qiagen
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega

### 3.11 Substrate

Caspase-Glo 3/7 Substrat	Promega
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce

### 3.12 Transfektionsreagenz

<i>Lipofectamine 2000 Reagent</i>	Invitrogen
-----------------------------------	------------

### 3.13 Chemikalien

1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth
2-Mercaptoethanol	Fluka
Aceton	Roth
Acetyliertes Trypsin	Sigma
Acrylamidlösung 30% "Rotiphorese Gel 30"	Roth

---

Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym
Aminocapronsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	BIO-RAD
BD FACSTFlow	BD Biosciences
Blocking-Reagenz	Roche
Borsäure	Roth
Calciumchlorid	Roth
Complete, Proteaseinhibitorcocktail	Roche
Coulter Cleanse	Beckman Coulter
DAPI	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
dNTP	MBI Fermentas
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
G418 Sulfat (Genitacin)	PAA
Gene Ruler 100 bp Ladder Plus	MBI Fermentas
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Methanol	Roth
Methylcellulose	Sigma



Mifepriston	Sigma
Mowiol	Calbiochem
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Nonidet P40	Roche
Paraformaldehyd	Fluka
Protein-A-Sepharose	Sigma
Proteinmarker (Rainbow)	Amersham/Pharmacia
<i>Octadecylrhodamine B chloride (R18)</i>	Molecular Probes
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth
Triton X 100	Roth
Trypton	Roth
Tween 20	Roth

## 3.14 Geräte und Zubehör

### Agarosegelelektrophorese

Bildverarbeitungssystem	INTAS
Gelträger, Kammer, Kamm	Keutz
Mikrowellengerät MWS 2820	Bauknecht
UV-Transluminator MacroVue UV-20	Amersham
PowerPac 300 (Spannungsquelle)	Bio-Rad

## Autoklaven

Autoklav, Typ A5

Webeco, Bad Schwartau

## Bakterienkultur

Petrischalen, 100 cm

Greiner, Nürtingen

Reagenzröhrchen, 15 ml

Greiner, Nürtingen

Reagenzröhrchen, 50 ml

Greiner, Nürtingen

Erlenmeyerkolben 100 ml, 300 ml, 500 ml

Jürgens, Hannover

Schüttelinkubator Typ 3033

GFL, Burgwedel

Brutschrank Typ B16

Heraeus

Photometer Ultraspec 2000

Amersham

## FACS

Coulter EpicsXL

Beckman Coulter

Expo32 ADC (Software)

Beckman Coulter

FACS-Röhrchen

Amersham

## Immunfluoreszenz

Deckgläser

Roth

Objektträger

Roth

## Magnetrührer

Magnetrührer, RCT basic

IKA Labortechnik, Staufen

## Mikroskope

Axiovert25 (Inverses Mikroskop)	Zeiss, Jena
Axiophot 2 (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss, Jena
Digitale INTAS Kamera	INTAS, Göttingen

## PCR

GeneAmp PCR System 2499	Perkin Elmer
Primus 25/96 Thermocycler	MWG Biotech
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech
0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym

## pH-Meter

pH-Meter	H. Jürgens, Hannover
----------	----------------------

## Pipetten

10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
8-Kanal-Pipette	Brand
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml Glaspipetten	H. Jürgens, Hannover

## Pipettierhilfen

Accu Jet Pipettenhelfer	Brand
-------------------------	-------

## Plattenleser

GENios Pro	Tecan
------------	-------

## SDS-PAGE und Semi-dry Western Blot

Miniproteingelkammer, Hoefer <i>Mighty small</i> <i>II</i> , SE 250	Amersham Pharmacia
Multigelkammer Long, Typ G47	Biometra
Filterpapier	Schleicher & Schuell GmbH
Nitrozellulose-Transfer-Membran Protran	Schleicher & Schuell GmbH
Transferkammer	Keutz
PowerPac 3000 (Spannungsquelle)	Bio-Rad
ChemiDoc EQ	Bio-Rad
Quantity One V 4.4.0 (Software)	Bio-Rad

## Sicherheitswerkbänke

NUAIRE Klasse 2	Nuaire
Biowizard Klasse 2	Kojair
HeraSafe Klasse 2	Heraeus

## Sterilfilter

FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell
----------------	----------------------

## Vortex

Reax top	Heidolph, Kehleim
Reax 2000-05-20	Heidolph, Kehleim

## Waagen

Elektronische Analysenwaage, Typ 1712 MP 8	Sartorius GmbH
Sartorius <i>Portable</i> Waage Lauda A100	Sartorius GmbH

## Wasserbäder

Wasserbad GFL, Burgwedel

## Zellkultur

Gewebekulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Nunc
Gewebekulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Nunc
96-Napf-Platten	Costar
96-Napf-Platten für die Lumineszenz	Nunc
24-Napf-Platten	Greiner
24-Napf-Platten	Nunc
6-Napf-Platten	Greiner
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Hereaus
Schwenktisch	Keutz

## Zentrifugen

Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5417C/R	Eppendorf
Ultrazentrifuge Ultra Pro80	Sorvall
Rotor SW55	Beckman
Megafuge 1,0R	Heraeus
J221 Zentrifuge mit JS 13 Rotor	Beckman
Vakuumpumpe <i>SpeedVac</i> Savant	Savant Instruments Inc

## Zentrifugengefäße

<i>Ultra Clear</i> für SW55	Beckman
15 und 50 ml Röhrchen	Greiner



# 4. Methoden

## 4.1 Zellkulturtechniken

### 4.1.1 Kultivierung und Passagierung

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 20 ml Medium kultiviert und alle zwei bis vier Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBSM gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen ablösen. Sofort danach wurden sie unter Zugabe von 9 ml des spezifischen Mediums resuspendiert, passagiert und in frisches Medium umgesetzt.

BHK21-Zellen	Die Zellen wurden in EMEM-Medium mit 5% FKS kultiviert. Eine Flasche musste etwa alle vier Tage im Verhältnis von 1:20 umgesetzt werden.
MDCK-II-Zellen	MDCK-II-Zellen wurden in EMEM-Medium mit 5% FKS kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen im Verhältnis von 1:20 umgesetzt.
Vero-Zellen	Die Zellen wurden in EDulb-Medium mit 5% FKS kultiviert. Eine Flasche wurde alle vier Tage im Verhältnis von 1:10 umgesetzt.

### 4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurde eine konfluent bewachsene 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wie oben beschrieben trypsiniert und in 9 ml Medium suspendiert. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen in 2,7 ml Me-

dium mit 10% FKS resuspendiert und mit 0,3 ml DMSO versetzt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Aliquots zu 1 ml bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem Isopropanolbad, um sicherzustellen, dass die Zellen langsam heruntergekühlt wurden ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).

Das Auftauen erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Medium versetzt, für 5 min bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und die Zellen entsprechend der obigen Anleitung kultiviert.

### 4.1.3 Generierung transgener Zelllinien

Zur Generierung der transgenen Zelllinien wurden MDCK-Zellen mit den Plasmiden pGene-RSV-F-GFP und pSwitch transfiziert und für 14 Tage in Anwesenheit der Antibiotika Hygromycin B ( $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Zeocin ( $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ) kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von einer Zelle pro Napf in 96-Napf-Platten ausgesät. Nach vierzehn Tagen wurden positive Zellklone nach Induktion mit Mifepriston ( $10^{-9} \text{ M}$ ) unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.

Die Zelllinie zur ständigen Expression des löslichen F-Proteins wurde analog hergestellt. Transfiziert wurde jedoch nur das Plasmid pIres-GFP<sub>II</sub>-hF<sub>sol</sub>; zur Selektion diente das Antibiotikum Geneticin ( $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ).

## 4.2 Virologische Techniken

### 4.2.1 Anzucht von SeV $\Delta$ F

SeV- $\Delta$ F wurde auf MDCK-(SeV-F)-Zellen vermehrt. Zur Anzucht wurde eine konfluent bewachsene  $75 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche für drei Stunden unter Schwenken mit 5 ml Virus ( $\text{MOI} = 0,1$ ) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde der Virusüberstand abgenommen und 20 ml EMEM-Medium mit acetyliertem Trypsin ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Mifepriston ( $10^{-9} \text{ M}$ ) inkubiert.

Das Virus konnte nach zwei Tagen geerntet werden. Dazu wurde der Zellüberstand 15 Minuten bei  $3000 \text{ U}/\text{min}$  (Megafuge 1,0R Heraeus) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



### 4.2.2 Generierung von Pseudotypen

MDCK-Zellen wurden in 6-Napf-Schalen ausgesät ( $6 \cdot 10^5$  Zellen/Napf) und mit 4  $\mu\text{g}$  der pcDNA3.1-F-Plasmide transfiziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und für drei Stunden mit SeV- $\Delta\text{F}$  (MOI = 1) infiziert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Medium wurden die Zellen mit Medium ohne FKS für zwei Tage inkubiert. Wurde das pcDNA3.1-SeV-F-Plasmid transfiziert, wurde dem Medium noch acetyliertes Trypsin (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellüberstände 15 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde entweder aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert oder für die Titration oder Ultrazentrifugation eingesetzt.

Zur Pelletierung wurden die Pseudotypen bei 25.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  durch ein Saccharosekissen (25%) für 90 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 100  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel analysiert.

### 4.2.3 Bestimmung des Virustiters von SeV- $\Delta\text{F}$

Vero-Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte ausgesät ( $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml; 0,1 ml pro Vertiefung), so dass sich am folgenden Tag ein 80-100% konfluenter Zellrasen gebildet hatte.

Nach Herstellung zweier Virusverdünnungsreihen in 10er Schritten wurde das Kulturmedium von der Mikrotiterplatte abgenommen und 25  $\mu\text{l}$  von jeder Verdünnungsstufe zu den Zellen in je zwei Nöpfen gegeben. In je einen Napf pro Titrationsreihe wurden nun 25  $\mu\text{l}$  Medium gegeben; diese dienten als Negativkontrolle. Die Mikrotiterplatte wurde für drei Stunden im Brutschrank auf dem Schwenker inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von Medium mit 2% Serum. Die Mikrotiterplatten wurden für zwei Tage im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die Methylcellulose wurde von der Mikrotiterplatte abgenommen und die Platte zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend fixierte man die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Paraformaldehyd für 20 min, wusch sie mit destilliertem Wasser und zählte die fluoreszierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine *in vitro*-Technik (SAIKI et al., 1985, 1988), mit der DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, mit Hilfe von DNA-Polymerasen vervielfältigt werden. Als Primer werden synthetisch hergestellte, kurze, spezifische Oligonukleotide verwendet, die der Polymerase als Ansatzpunkt für eine weitere Kettenverlängerung dienen. Pro Reaktion werden jeweils ein "sense"- (in 5'-3'-Richtung) und ein "antisense"-Primer (in 3'-5'-Richtung) benötigt. Durch der Primer können Mutationen in die DNA eingeführt werden.

Jeder Zyklus einer PCR besteht aus drei Schritten: Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Anlagerung der Primer und Synthese der Stränge durch die DNA-Polymerase. Zur Amplifikation der DNA für präparative Zwecke wurde die *Pfu*-Polymerase eingesetzt, da sie über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit, dass unerwünschte Mutationen entstehen. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle PCR-Reaktionen unter den in **Tabelle 4.3** angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Elongationszeit bei 72°C richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Abschnittes. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Synthese von je 500 Nukleotiden 1 min eingerechnet.

H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
<i>Pfu</i> -Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> )	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Matrizen-DNA	X µl (50-100 ng)
Primer sense	2 µl (10 pmol)
Primer antisense	2 µl (10 pmol)
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl

**Tabelle 4.2:** Standard-Ansatz für die *Pfu*-PCR

	95°C	2 min
10 Zyklen	95°C	30 sec
	56°C (-0,2°C)	30 sec
	72°C	X min
10-20 Zyklen	95°C	30 sec
	54°C	30 sec
	72°C	X min (+10 sec)
	72°C	5 min
	4°C	bis zum Abbruch

**Tabelle 4.3:** Bedingungen der *Pfu*-PCR

### 4.3.2 Erzeugung von Mutationen

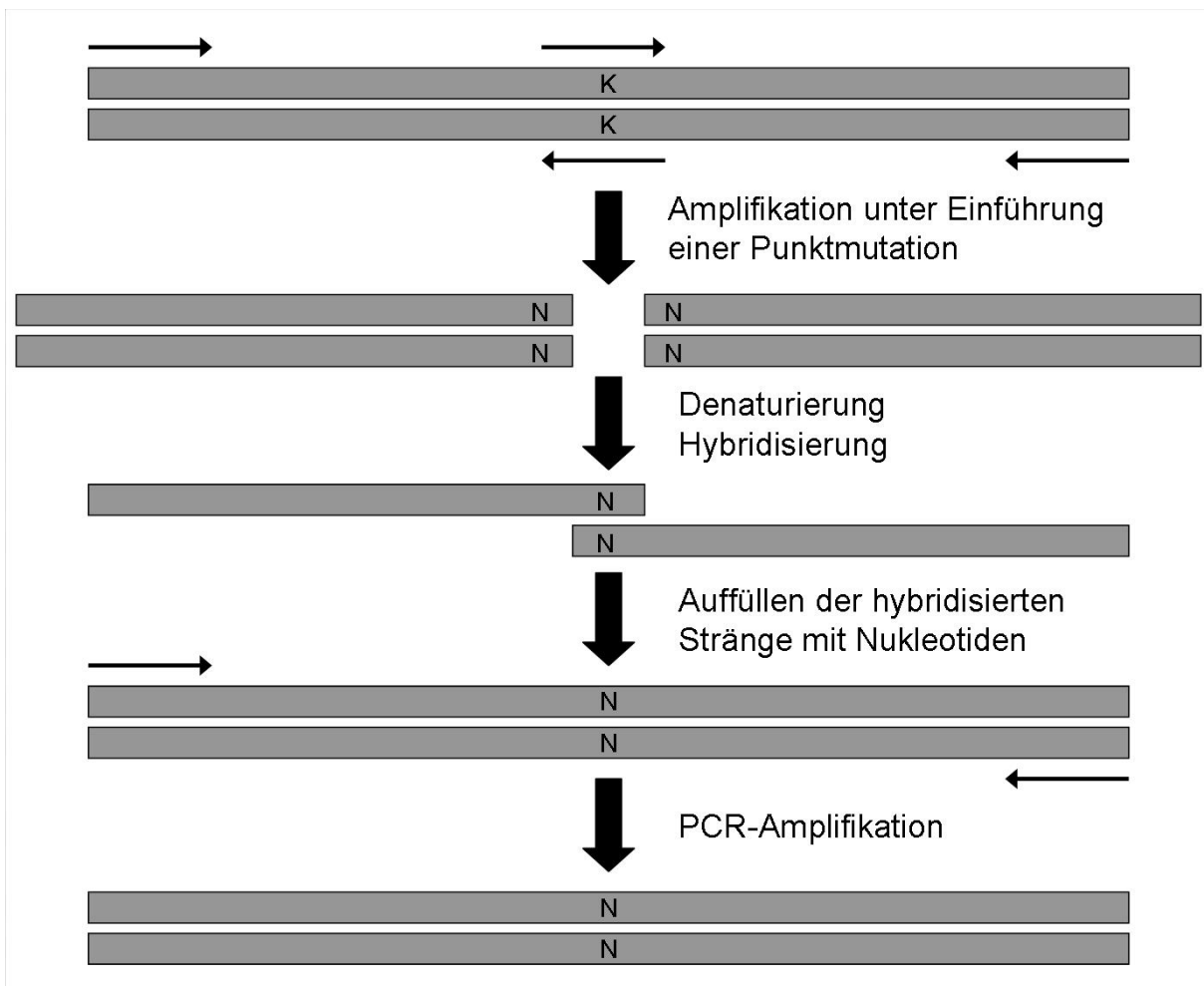
Mutationen können mit Hilfe von "sense"- und "antisense"-Primern in die DNA eingeführt werden, wobei beide Primer die Mutation im überlappenden Teil ihrer Sequenz enthalten müssen. **Abbildung 4.1** zeigt das Schema der Mutagenese, wie sie im **Abschnitt 4.4.0.2** verwendet wurde.

Das neue Konstrukt wurde mit spezifischen Primern erstellt, die in ihrer Sequenz die Mutation enthielten und zu beiden Seiten von Nukleotiden flankiert wurden, die an die DNA binden konnten. Die zwei Fragmente wurden mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Beide Fragmente wurden anschließend denaturiert und miteinander hybridisiert. Die äußeren Primer dienten zur anschließenden Vervielfältigung des Hybrids.

Auf gleiche Weise wurden auch Sequenzabschnitte deletiert, kurze Sequenzen eingefügt oder aber – indem im ersten Schritt die Amplifikation aus zwei unterschiedlichen Genen erfolgt – chimäre Proteine erzeugt.

### 4.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Durch die Bestimmung der Extinktion (OD) einer DNA-Lösung bei 260 nm wurde deren Konzentration errechnet. Für die Messung wurde eine 10fache Verdünnung der DNA in H<sub>2</sub>O verwendet. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe folgender Formel:



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Erzeugung einer K->N-Mutation. Die DNA-Abschnitte sind in Form von grauen Balken und die Primer als Pfeile dargestellt.

$$OD_{260nm} * (\text{Verdünnung} * \text{Koeffizient}/1000) = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Für doppelsträngige DNA gilt der Koeffizient 50.

#### 4.3.4 Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen führen an bestimmten, meist palindromischen Erkennungssequenzen oder in deren Nähe Doppelstrangbrüche in die DNA ein. Dabei entstehen entweder stumpfe oder überhängende Enden. Vor der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen musste die DNA mit dem *PCR-Purification Kit* gereinigt werden.

Für die Spaltung von 1 µg Plasmid-DNA wurden 2 U des entsprechenden Enzyms und ein geeigneter Puffer eingesetzt. Sollten die Enden eines PCR-Fragments geschnitten werden, so wurden 20 U pro Reaktionsansatz verwendet.

Die Spaltungen erfolgten entsprechend den Herstellerangaben. Plasmide wurden 1 bis 2 Stunden mit Restriktionsendonukleasen bei 37°C inkubiert, PCR-Fragmente über Nacht.

### **4.3.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen. Dieses kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken genutzt werden. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente lag die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 1,5%. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht, welches sich zwischen die Basen der DNA lagert und ein orangefarbenes Licht emittiert, wenn es durch UV-Strahlung angeregt wird.

Die Elektrophorese wurde in Kammern der Firma Keutz durchgeführt. Für analytische Zwecke erfolgte sie in einem TBE-Gel für eine halbe Stunde bei 130 V, zur DNA-Präparation für eine Stunde in einem TAE-Gel.

Anschließend wurde das Gel im Ethidiumbromidbad für fünf Minuten gefärbt, für zehn Minuten gewässert und unter UV-Licht (300 nm) betrachtet.

### **4.3.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Diese Methode wurde nach Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen zur Auftrennung und Reinigung der Proben genutzt. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung von TAE-Puffer durchgeführt.

In die erste Tasche des Gels wurde der Größenstandard aufgetragen, in die zweite Tasche 10 µl der mit Laufpuffer versetzten Probe und die dritte Tasche blieb frei. In die Taschen 4-6 wurde das restliche Probenmaterial gegeben. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 80 Volt wurde das Gel in der freien dritten Spur mit einem Skalpell durchtrennt und nur die ersten beiden Spuren in die Ethidiumbromidlösung gelegt. Beim Betrachten unter UV-Licht wurden

die gesuchten DNA-Banden mit Hilfe von kleinen Skalpelleinschnitten im Gel markiert. Diese Markierungen konnten auf den nicht gefärbten Teil des Gels übertragen werden, und so konnten die Proben aus diesem Anteil des Gels isoliert werden.

Die Extraktion der Proben aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des *Gel Extraction Kits* nach Anleitung des Herstellers.

### 4.3.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Zur Verhinderung der Religation der Plasmid-DNA nach der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen, wurde das geschnittene Plasmid immer über ein präparatives Agarosegel mit anschließender DNA-Extraktion gereinigt, und dann einer Dephosphorylierungsreaktion unterzogen. Die in 50 µl eluierte DNA wurde mit 2 µl CIAP (*calv intestine alkaline phosphatase*), 2 µl Wasser und 6 µl CIAP-Puffer versetzt, und der Ansatz für dreißig Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit dem *PCR-Purification Kit* gereinigt.

### 4.3.8 Ligation von DNA

Für die Ligation eines PCR-Produktes mit einem Vektor wurden beide im Vorfeld mit Restriktionsendonukleasen behandelt, ggf. dephosphoryliert, über ein TAE-Agarosegel aufgetrennt und mittels *Gel Extraction Kit* aus dem Gel extrahiert. Die DNA-Ligase des T4-Bakteriophagen wurde für die Ligation genutzt. Sie katalysiert die Bindung der Phosphodiester-Gruppen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA. Die Ligation wurde über Nacht bei 14°C oder eine bis zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. PCR-Fragment und Vektor-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 5:1 bis 10:1 in der Reaktion eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA.

### 4.3.9 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie *E. coli*-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 250 ml frisches LB-Medium angeimpft und für 2-3 Stunden unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,8

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl
Vektor-DNA (100-300 ng)	X µl
PCR-Fragment	X µl
10 x Ligase-Puffer	2 µl
Ligase	(5 U/µl ) 2 µl

**Tabelle 4.4:** Standard-Ligations-Ansatz

inkubiert. Dann wurden die Bakterien pelletiert, in 75 ml TFB I resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 10 ml TFB II resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

#### 4.3.10 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

4 µl des Ligationsansatzes wurden zu den chemisch kompetenten Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde für 30 Sekunden in einem 42°C warmes Wasserbad inkubiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,25 ml LB-Medium folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und 180 U/min. Die Bakterien wurden auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen und solange bei 37°C inkubiert, bis gut sichtbare Kolonien zu erkennen waren (ca. 12-24 Stunden ).

#### 4.3.11 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die Plasmide rekombinante oder religierte Plasmide aufgenommen hatten, wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurde eine Bakterienkolonie in ein PCR-Gefäß mit dem entsprechenden Reaktionsansatz gegeben und die gleiche Kolonie in ein Eppendorf-Gefäß mit 0,25 ml LB-Medium und Ampicillin überführt.

Zunächst wurden die Reaktionsgefäße mit den PCR-Ansätzen und dem Medium vorbereitet. Mit einer 10-µl -Pipette mit aufgesetzter steriler Pipettenspitze wurde dann eine Kolonie von der Agarplatte abgenommen und fünfmal im PCR-Gefäß resuspendiert. Anschließend ging man mit der gleichen Pipettenspitze in das Eppendorf-Gefäß und resuspendierte die Kolonie im LB-Medium. Auf diese Weise stand der Bakterienklon gleichzeitig für die PCR und eine eventuelle

spätere Bakterienvermehrung zur Verfügung. Die PCR wurde in einem Thermocycler unter den in **Tabelle 4.6** angegebenen Bedingungen durchgeführt:

Die Eppendorf-Röhrchen mit dem LB-Medium wurden bis zum Erreichen des PCR-Ergebnisses bei 37°C und 180 U/min inkubiert. Bakterienklone mit einem positiven Resultat wurden weiter vermehrt und/oder bei 4°C aufbewahrt.

### 4.3.12 Präparation von Plasmid-DNA

Als Ausgangsmaterial wurden 40 bzw. 100 ml einer LB-Übernachtskultur verwendet, die mit Ampicillin (50 mg/l Medium) und 40 bzw. 100 µl LB-Bakterien-Gemisch aus der Kolonie-PCR beimpft wurde. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 180 U/min inkubiert.

Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kits* oder des *PureYield Plasmid Midiprep Systems* nach den Angaben der Hersteller.

### 4.3.13 Sequenzierung

Die Plasmide wurde von der Firma *MWG Biotech AG* mit dem Programm "Value Read" sequenziert.

DEPC-H <sub>2</sub> O	11,0 µl
10x Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
dNTP	0,3 µl
Primer "sense"	0,45 µl
Primer "antisense"	0,45 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1 µl

**Tabelle 4.5:** Standard-Ansatz für eine Kolonie-PCR



	95°C	2 min
	95°C	15 sec
25 Zyklen	55°C	30 sec
	72°C	1 min
	72°C	5 min
	4°C	bis zum Abbruch

**Tabelle 4.6:** Bedingungen der Kolonie-PCR

### 4.3.14 Transiente Expression in eukaryotischen Zellen

Unter einer Transfektion versteht man das Einführen von nackter DNA in eukaryotische Zellen. Diese DNA wird in Form von Plasmiden in die Zelle geschleust, wobei ihre Lebensdauer auf wenige Tage beschränkt ist. Da die DNA nach wenigen Tagen abgebaut wird oder nicht an die Tochterzellen weitergegeben wird, spricht man von einer transienten Expression.

Für die Transfektion von BHK21-Zellen wurden die Zellen am Vortag mit einer Dichte von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen pro ml in 6-Napf-Platten ausgesät. Die Zellen waren am Tag der Transfektion 80-100% konfluent. Eingesetzt wurden 2 µg DNA für einen Napf. MDCK-Zellen wurden bei der Aussaat in 24-Napf-Schalen mit Deckgläsern ( $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Napf) mit 1 µg DNA pro Napf transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels *Lipofectamine 2000 Reagent* in EMEM ohne Zusatz von Antibiotikum und mit 5% Serum. Pro 1 µg DNA wurden 2 µl Lipofectamine in EMEM ohne Antibiotika gemischt und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch für 24 Stunden zu den Zellen gegeben.

## 4.4 Klonierungen

### 4.4.0.1 Klonierung der F-Protein-GFP-Mutanten

Zur Herstellung der transgenen Zelllinien wurden das HRSV-F-Protein und davon abgeleitete Mutanten C-terminal an GFP gekoppelt und in das Plasmid pGene kloniert.

Die Klonierung der Mutante bF<sub>Strep-hpep</sub>GFP in pGene erfolgte durch Ligierung eines aus dem

Vektor pPCR-Script-bFhpsynStrep durch die Enzyme *HindIII* und *AsiS1* geschnittenen DNA-Abschnitts in pGene-bF-GFP.

Zur Generation von pGene-hF-GFP wurde das F-Protein aus dem Vektor pcD-hF mittels der Primer 1 und 2 (siehe **Tabelle 3.7**) amplifiziert und über die Enzyme *HindIII* und *KpnI* in den Vektor pEGFPN1 ligiert. Nach der Sequenzierung wurde das Protein hF-GFP über die Enzyme *HindIII* und *NotI* in den Vektor pGene ligiert. Dieses Schema der Klonierung des Proteins zuerst in pE-GFP-N1 und pGene über die angegebenen Schnittstellen wurde – soweit nicht anders vermerkt – für alle folgenden Konstrukte beibehalten.

Zur Klonierung der Spaltmutanten wurden das F-Protein aus dem Plasmid pGene-hF-GFP in zwei Fragmenten amplifiziert. Für das erste Fragment wurden die Primer 1 und 4 (hF<sub>SANN</sub>GFP), die Primer 1 und 6 (hF<sub>KGR</sub>GFP) sowie die Primer 1 und 8 (hF<sub>RR</sub>GFP) verwendet; für das zweite die Primer 2 und 3 (hF<sub>SANN</sub>GFP), die Primer 2 und 5 (hF<sub>KGR</sub>GFP) sowie die Primer 2 und 7 (hF<sub>RR</sub>GFP). Nach der Hybridisation der passenden Fragmente wurde das F-Protein in den Vektor pE-GFP-N1 und dann in den Vektor pGene ligiert.

In gleicher Weise wurde die Glykosylierungsmutante hF<sub>N126Q</sub>GFP aus mit den Primern 1 und 10 sowie 2 und 9 generierten Fragmenten kloniert. Für die Mutanten mit den verkürzten Peptiden fanden die Primerpaare 1 und 12 sowie 2 und 11 im Falle der Mutante hF<sub>pep-4</sub>GFP und im Fall der Mutante hF<sub>pep-5</sub>GFP die Primerpaare 1 und 14 sowie 2 und 13 Verwendung.

Ebenso wurden die Fusionspeptid-Mutanten generiert. Für die Mutante hF<sub>fus-3</sub>GFP wurden die Primerpaare 1 und 40 sowie 2 und 39 eingesetzt, für die Mutante hF<sub>L141N</sub>GFP die Primerpaare 1 und 18 sowie 2 und 17.

Um die chimäre Mutante bF<sub>hF2+pep</sub>GFP zu generieren, wurden zwei Fragmente amplifiziert und anschließend hybridisiert. Das erste wurde mit dem Primerpaar 1 und 20 aus dem Plasmid pE-hF-GFPN1 amplifiziert, das zweite aus dem Plasmid pGene-bFGFP mit dem Primerpaar 36 und 19. Entsprechend wurde die Mutante hF<sub>bF2+pep</sub>GFP durch die Hybridisierung eines Fragments, das aus dem Plasmid pGene-bFGFP mit den Primern 35 und 22 amplifiziert wurde, und eines anderen, welches durch die Primer 2 und 21 aus dem Plasmid pE-hF-GFPN1 amplifiziert wurde, generiert.

Die Mutante hF<sub>bpep</sub> wurde durch Hybridisierung der aus dem Plasmid pE-bF<sub>hF2+pep</sub>GFP durch Amplifikation der DNA mit den Primern 1 und 24 und aus dem Plasmid pE-hF<sub>bF2+pep</sub>GFP durch

Amplifikation mit den Primern 35 und 23 gewonnen Fragmente generiert. Entsprechend wurde die Mutante durch Hybridisation der aus dem Plasmid pGene-bF<sub>Strep-hpep</sub>GFP mit den Primern 1 und 26 sowie mit den Primern 2 und 25 amplifizierten Fragmente generiert.

Die Mutanten mit den in das Pep27 eingefügten Flag-Sequenzen wurden generiert, indem jeweils drei DNA-Fragmente miteinander hybridisiert und anschließend in den Vektor pE-GFP-N1 ligiert wurden. Dabei wurden die beiden äußeren durch die Primerpaare 1 und 28 sowie 2 und 29 im Fall der Mutante hF<sub>Flag-pep</sub>GFP bzw. durch die Primerpaare 1 und 32 sowie 2 und 33 im Fall der Mutante hF<sub>pep-Flag</sub>GFP amplifiziert, das innere durch Amplifikation aus dem Plasmid pFLAG-CMV-3.3 durch die Primer 27 und 30 (hF<sub>Flag-pep</sub>GFP) bzw. 31 und 34 im Fall der Mutante hF<sub>pep-Flag</sub>GFP.

Ebenfalls drei Fragmente wurden zur Klonierung der Mutante hF<sub>Strep-pep</sub>GFP benötigt. Das erste und dritte wurde durch Amplifikation des Plasmids pGene-hFGFP durch die Primer 1 und 38 bzw. 15 und 2. Das mittlere wurde mit den Primern 37 und 16 aus dem Plasmid pGene-bF<sub>Strep-hpep</sub>GFP amplifiziert. Zur Generierung der Fusionsmutante hF<sub>fus-3</sub>GFP wurden statt der Primer 15 und 16 die Primer 39 und 40 verwendet.

Zur Klonierung des löslichen HRSV-F-Proteins wurden die ersten 524 Aminosäuren mittels der Primer 41 und 42 aus dem Plasmid pGene-hFGFP amplifiziert und nach Verdau mit dem Enzym EcoRI in das Plasmid pIRES-hrGFPII ligiert.

#### 4.4.0.2 Klonierung der HRSV/SeV-F-Mutanten

Zur Herstellung der Pseudotypen wurde das HRSV-F-Protein, das SeV-F-Protein sowie die Chimären in den Vektor pcDNA3.1 kloniert.

Zur Klonierung des SeV-F-Proteins wurde das entsprechende Gen aus dem Plasmid pGene-SeV-F unter Verwendung der Primer 84 und 46 amplifiziert und über die Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* in den Vektor pcDNA3.1 ligiert. Zur Erzeugung des Plasmids pcDNA3.1-hF wurde das hF-Gen aus dem Vektor pE-hFGFP-N1 mit den Primern 1 und 45 amplifiziert und das Gen abschließend über die Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* in den Vektor ligiert. Die Chimäre hF<sub>T</sub> wurde erzeugt, indem der HRSV-F-Abschnitt mit den Primern 1 und 64 aus dem Plasmid pE-hFGFP-N1 amplifiziert und der SeV-F-Abschnitt aus dem Plasmid pGene-SeV-F mit den Primern 63 und 46 amplifiziert wurden. Die Fragmente wurden miteinander hybridisiert und

Mutation	Primer für das vordere Fragment	Primer für das hintere Fragment
K65N	hFsyn-s(HindIII) / hFs-K65N-as	hFs-K65N-s / hFsyn-XhoI(478)-as
K68N	hFsyn-s(HindIII) / hFs-K68N-as	hFs-K68N-s / hFsyn-XhoI(478)-as
K75N	hFsyn-s(HindIII) / hFs-K75N-as	hFs-K75N-s / hFsyn-XhoI(478)-as
K77N	hFsyn-s(HindIII) / hFs-K77N-as	hFs-K77N-s / hFsyn-XhoI(478)-as
K80N	hFsyn-s(HindIII) / hFs-K80N-as	hFs-K80N-s / hFsyn-XhoI(478)-as
K85N	hFsyn-s(HindIII) / hFs-K85N-as	hFs-K85N-s / hFsyn-XhoI(478)-as
K87N	hFsyn-s(HindIII) / hFs-K87N-as	hFs-K87N-s / hFsyn-XhoI(478)-as

**Tabelle 4.7:** Klonierungsschema für die Einführung von Mutationen in die basische Domäne der HRSV-F<sub>2</sub>-Untereinheit. Die entsprechenden Primersequenzen sind **Abschnitt 3.7** zu entnehmen.

über die Schnittstellen HindII und XbaI in den Vektor ligiert.

Um die Lysine in der basischen Region der F<sub>2</sub>-Untereinheit des HRSV-F-Protein in den chimären F-Proteine durch Asparagine zu ersetzen, wurde zuerst – ohne die Aminosäuresequenz zu ändern – eine *XhoI*-Schnittstelle an der Position 479 eingeführt, indem der vordere Teil der Proteins mit den Primern 1 und 44 und der hintere Teil mit den Primern 43 und 46 amplifiziert, diese anschließend miteinander hybridisiert und über die Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* in das Plasmid pcDNA3.1 kloniert wurden. Dieser Prozedur wurden sowohl die hF<sub>MT</sub>- und hF<sub>T</sub>-Chimäre unterzogen. Die Mutationen in der basischen Domäne wurden mittels CR unter Verwendung der Primer in **Tabelle 4.7** erzeugt und die PCR-Fragmente über *HindIII* und *XhoI* in das hF<sub>T</sub>- oder hF<sub>MT</sub>-Gen eingebracht.

## 4.5 Methoden zum Nachweis von Proteinen

### 4.5.1 Immunfluoreszenztest

Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät. Nach Transfektion oder Induktion standen sie für den Immunfluoreszenztest zur Verfügung. Sie wurden mit 3%igem Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgten ein Waschschrift und eine Inkubation von 5 min mit 0,1 M PBS-Glycin.

Zur Detektion des F-Proteins wurde die Zellen mit anti-RSV-F-Antikörper (*Serotec*, Verdünnung 1:500) und anschließend mit anti-Maus-Cy3-Antikörper (*Sigma*, Verdünnung 1:500) inkubiert.

Zum Nachweis von p65 wurden die Zellen nach einer einminütigen Permeabilisierung mit Aceton/Methanol (Verhältnis 1:1) mit anti-p65-Antikörper (*Stressgene*, Verdünnung 1:100) und anschließend mit anti-Kaninchen-Cy3-Antikörper (*Sigma*, Verdünnung 1:500) inkubiert.

Zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und 15 min bei 37°C mit DAPI (0,1 µg /ml in Ethanol) inkubiert.

Nach jedem Färbeschritt wurde dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Abschluss aller Färbungen wurden die Deckgläser mit warmem Mowiol auf einem Objektträger eingebettet. Zum Nachweis der Fluoreszenz wurde ein *Zeiss Axioplan 2* Mikroskop verwendet.

### 4.5.2 Trypsinbehandlung von F-exprimierenden Zellen

Konfluent mit BHK-21-Zellen bewachsene 6-Napf-Schalen wurden mit 2 µg pcDNA3.1-F transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit warmem PBSM abgelöst, resuspendiert und für eine Stunde bei 37°C mit unterschiedlichen Mengen Trypsin behandelt. Anschließend wurde das Trypsin mit Serum neutralisiert und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden sodann eine Stunde mit  $\alpha$ -RSV-Fitc (Verdünnung 1:100) inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Der Prozentanteil der fluoreszierenden Zellen wurden im Durchflusszytometer bestimmt.

### 4.5.3 Immunpräzipitation

Die Zellen wurden in 6-Napf-Schalen ausgesät. 24 Stunden nach der Induktion mit Mifepriston oder 24 Stunden nach der Transfektion wurde der Zellrasen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, und anschließend wurden die Oberflächenproteine durch eine Inkubation mit 0,5 ml Sulfo-NHS-Biotin (0,5 mg/ml PBS) bei 4°C für 20 min unter leichtem Schwenken markiert. Zur Inaktivierung überschüssigen Biotins wurden die Zellen mit 0,1 M Glycinlösung gewaschen und noch einmal mit dieser Lösung für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde erneut mit kaltem PBS gewaschen.

Die Zellen wurden mit 0,6 ml NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren für 10 min auf Eis lysiert. Mit einer Pipette wurden die abgelösten Zellen resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden bei 16.000 x g für 30 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß gegeben und mit 50 µl Protein-A-Sepharose und 3 µl anti-RSV-F-Antikörper (*Serotec*) über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Ansätze bei 16.000 x g für 3 min abzentrifugiert und dreimal mit je 1 ml NP40-Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen. Zu der ProteinA-Sepharose wurden 50 µl SDS-Probenpuffer gegeben und für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 16.000 x g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und stand für die sofortige Auftrennung durch die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) bereit oder wurde bei -20°C gelagert.

Zur Präzipitation des löslichen F-Proteins aus dem Überstand wurden die Zellüberstände durch Zentrifugation bei 1000 x g für 10 min von Zelltrümmern befreit. Zu 500 µl Überstand wurden 50 µl Protein-A-Sepharose und 3 µl  $\alpha$ -RSV-F-Antikörper (*Serotec*) gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Aufarbeitung am folgenden Tag erfolgte analog zur obigen Beschreibung.

#### **4.5.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach ihrer Größe getrennt (LAEMMLI, 1970). Die Trenngele hatten die Maße 50 \* 80 \* 0,75 mm<sup>3</sup> und eine Acrylamidkonzentration von 10%. Erfolgte die Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen, so wurde den Proben zusätzlich 10% 1 M DTT zugefügt und für 3 min bei 95°C erhitzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Einlaufen der Proben ins Trenngel bei 80 V, anschließend bei 110 V, bis der Farbstoff des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Der verwendete Marker bestand aus vorgefärbten Proteinen mit einer Molekularmasse zwischen 11 und 170 kDa und wurden mit SDS-Probenpuffer verdünnt aufgetragen.

### 4.5.5 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel auf eine mit H<sub>2</sub>O getränkte Nitrozellulosemembran mit Hilfe der "Semi-Dry-Blot"-Technik (Kyhse-Andersen, 1984) transferiert. Auf die Graphitplatte (Anode) der Blotkammer (Keutz) wurden Filterpapier, Nitrozellulose und Gel in der folgenden Reihenfolge gelegt: 6 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer I, 3 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer II, Nitrozellulose getränkt in H<sub>2</sub>O, Trenngel und 9 Blatt Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer. Die Kammer wurde mit der oberen Graphitplatte (Kathode) geschlossen und der Transfer erfolgte für 60 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit Blocking Reagenz (0,5% in PBSM) über Nacht oder eine Stunde bei 4°C abgesättigt.

Die Nitrozellulose wurde dreimal 10 min mit PBSM-0,1% Tween auf einem Schwenker gewaschen und dann zur Detektion der biotinylierten Proteine eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1 µl Streptavidin-Peroxidase in 1 ml PBS unter Parafilm inkubiert. Die Membran wurde dreimal für jeweils 10 Minuten mit 10 ml PBSM-0,1% Tween und einmal mit PBS unter Schwenken gewaschen. Der gebundene Peroxidasekomplex konnte nach ein- bzw. fünfminütiger Inkubation mit *Super Signal* mit Hilfe des Chemi Imagers (BIO-RAD) sichtbar gemacht werden.

Zur Detektion des löslichen F-Proteins wurde die Membran abweichend vom obigen Protokoll erst mit α-Flag M2-Antikörper (Sigma, Verdünnung 1:100), dann mit α-Maus-Biotin (Amersham, Verdünnung 1:500) und anschließend mit Streptavidin-Peroxidase (Amersham, Verdünnung 1:1000) für jeweils eine Stunde inkubiert.

Zur Detektion des F-Proteins in pelletierten Pseudotypen wurde die Membran abweichend vom obigen Protokoll erst mit einem Gemisch aus α-RSV-F (Serotec, Verdünnung 1:200), α-RSV-F (Mab 13, Verdünnung 1:300) und α-RSV-F (Mab 19, Verdünnung 1:300) dann mit α-Maus-Biotin (Amersham, Verdünnung 1:500) und anschließend mit Streptavidin-Peroxidase (Amersham, Verdünnung 1:1000) für jeweils eine Stunde inkubiert. Abweichend hiervon wurden für die Detektion des M-Proteins in den Pseudotypen α-SeV-M-Serum (Verdünnung 1:10) als erster Antikörper eingesetzt.

## 4.6 Andere Methoden

### 4.6.1 Heterologe Zellfusion mit R18-markierten Zellen

Eine konfluent bewachsene 75 cm<sup>2</sup>-Flasche mit BHK-21-Zellen wurde zweimal mit Medium gewaschen und für 30 min bei 37°C mit 5 ml Medium und 5 µl *Octadecylrhodamine B chloride* (R18) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS mit 5% BSA gewaschen, eine halbe Stunde in dieser Lösung bei 37°C inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Dann wurden die Zellen trypsinisiert und zusammen mit der jeweiligen transgenen MDCK-Zelllinie im Verhältnis 2:1 in 24-Napf-Platten in EMEM ausgesät. Zur Induktion der F-Protein-Expression enthielt das Medium 10<sup>-9</sup> M Mifepriston.

Nach 24, 48 oder 72 Stunden wurden die Zellen trypsinisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, indem jeweils hundert GFP-exprimierende Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der mit R18 markierten Zellen in dieser Population bestimmt wurde.

### 4.6.2 Caspase-3-Assay

Transgene MDCK-Zellen wurden in einer Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/Napf in 24-Napf-Platten ausgesät, am folgenden Tag mit Mifepriston (10<sup>-9</sup> M) induziert und für 24 bis 96 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt, und die Zellen mit 100 µl Trypsinlösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit ihren Überständen vereinigt, die Zelldichte bestimmt und auf 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt. Zu 50 µl Zellsuspension wurden 50 µl *Caspase-Glo 3/7 Substrat (Promega)* gegeben und in 96-Napf-Platte gemischt. Nach einer Inkubation von vierzig Minuten im Dunklen wurde die Lumineszenz im Plattenleser (*Tecan*) detektiert.



# 5. Ergebnisse

## 5.1 Charakterisierung des HRSV-F-Proteins durch transgene Zelllinien

Zur Charakterisierung des HRSV-F-Proteins wurden transgene MDCK-Zelllinien erstellt (**siehe 4.1.3**). Es wurde ein induzierbares System gewählt, da das F-Protein zytopathogene Eigenschaften hat, welche eine konstitutive Expression in einer Zelllinie nicht zugelassen hätte. Um die Expression des F-Proteins, welches für die Expression innerhalb eines viralen Systems im Zytoplasma optimiert ist, über den Zellkern zu verbessern, wurden synthetische Gene verwendet, deren Codongebrauch für Säugerzellen optimiert war und die nicht mehr über kryptische Spleißstellen verfügten (TERNETTE et al., 2007). Um den Nachweis des F-Proteins zu vereinfachen, wurde die zytoplasmatische Domäne mit GFP versehen. Eine Übersicht über die verschiedenen Konstrukte bietet **Tabelle 5.1**.

Das hydrophobe, konservierte Fusionspeptid ist für die Fusionsaktivität des Proteins von entscheidender Bedeutung. Um den Einfluss der Fusionsaktivität für die proapoptotischen Eigenschaften des F-Proteins zu untersuchen, sollten Mutanten hergestellt werden, welche Modifikationen im Fusionspeptid aufwiesen. MARTÍN et al. (2006) beschrieben einige Mutanten, welche durch Austausch einer einzigen Aminosäure im Fusionspeptid des HRSV-F-Proteins ihre Fähigkeit, Synzytien zu bilden, verloren hatten. Von diesen wählten wir die Mutante hF<sub>L141N</sub> aus, bei welcher Leucin<sup>141</sup> gegen ein Asparagin ausgetauscht worden war. Darüber hinaus ist die Länge des Fusionspeptids konserviert. Um den Einfluss dieses Faktors zu untersuchen, verfügt die Mutante hF<sub>fus-3</sub> über ein um drei Aminosäuren verkürztes Fusionspeptid. Durch diese Kürzung blieb auch das konservierte Phenylalanin am N-terminalen Ende des Fusionspeptids erhalten,

hF	RARR	ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLGFLL
bF	<b>RAKR</b>	<b>GIPELIHYKRNSTKKFYGLMGKKRKRR</b>	<b>FLGFLL</b>
hF <sub>L141N</sub>	RARR	ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLGF <b>N</b> L
hF <sub>fus-3</sub>	RARR	ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLL
hF <sub>SANN</sub>	<b>SANN</b> -----	ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLGFLL
hF <sub>RR</sub>	RARR	ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLS----	RR FLGFLL
hF <sub>KGR</sub>	RARR	ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLS---	KGR FLGFLL
hF <sub>N126Q</sub>	RARR	ELPRFMNYTLNNTKKT <b>Q</b> VTL	SKKRKRR FLGFLL
hF <sub>pep-5</sub>	RARR	MNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLGFLL
hF <sub>Flag-hpep</sub>	RARR	flag-ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLGFLL
hF <sub>Strep-hpep</sub>	RARR	strepELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLGFLL
hF <sub>bpep</sub>	RARR	<b>GIPELIHYKRNSTKKFYGLMGKKRKRR</b>	FLGFLL
hF <sub>bF2+pep</sub>	<b>RAKR</b>	<b>GIPELIHYKRNSTKKFYGLMGKKRKRR</b>	FLGFLL
hF <sub>Strep-hpep.fus-3</sub>	RARR	strepELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLL
bF <sub>Strep-hpep</sub>	<b>RAKR</b>	strepELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	<b>FLGFLL</b>
hF <sub>sol</sub>	RARR	ELPRFMNYTLNNTKKTNTVLSKKRKRR	FLGFLL

**Tabelle 5.1:** RSV-F-GFP-Konstrukte. Die Sequenzen beginnen mit Aminosäure 106 des RSV-F-Proteins. Vom BRSV-F-Protein abgeleitete Sequenzen sind rot markiert. Mutationen der Aminosäuren wurden grün gekennzeichnet.

Das Furin-Spaltmotiv lautet RXK/RR. RARR bzw. RAKR stellt die Spaltungssequenz am N-terminalen Ende des Pep27 dar, RKRR die Spaltungssequenz am C-terminalen Ende des Pep27. Die Spaltung erfolgt unmittelbar hinter den Erkennungssequenzen. Dies ist durch eine Lücke in der Sequenz angedeutet.

Die Zelllinie MDCK-bF-GFP wurde nicht selbst kloniert (siehe 3.1).

welches möglicherweise einen Einfluss auf die Spaltung des F-Proteins haben könnte.

Die Mutanten hF<sub>SANN</sub> wurde erstmals von ZIMMER et al. (2002) beschrieben. Sie bildete weniger Synzytien, konnte jedoch expremiert werden. Bei dieser Mutante war die Spaltungsstelle stromaufwärts des Pep27 so mutiert worden, dass die Furinerkennungssequenz RXK/RR nicht mehr vorlag, und die Mutante an dieser Stelle nicht mehr durch Furin gespalten werden sollte. Weiter wurden zwei Konstrukte hF<sub>RR</sub> und hF<sub>KGR</sub> generiert, welche Veränderungen der anderen Furinspaltstelle enthielten, so dass auch hier eine Spaltung durch Furin nicht mehr möglich sein sollte.

Das Pep27 des HRSV-F-Proteins verfügt über drei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 116, 120 und 126, von denen jedoch nur die beiden äußeren genutzt werden (ZIMMER et al., unveröffentlicht). Es konnte bisher nachgewiesen werden, dass eine Mutation der dritten Glykosylierungsstelle N<sup>126</sup> zu einer Zunahme der Synzytienbildung führte (ZIMMER et al., 2001b). Es ist denkbar, dass die Glykosylierung des Pep27 einen regulatorischen Effekt auf die Spaltung des F-Proteins hat, da sie eine sterische Hinderung für Furin darstellt. Die Mutation der Glykosylierungsstelle N<sup>126</sup> in der Mutante hF<sub>N126Q</sub> könnte so die Spaltung am C-terminalen Ende des Pep27 regulieren. Die Glykosylierungsstellen an den Positionen 116 und 120 blieben unverändert.

(KÖNIG et al., 2004) zeigten, dass die Länge der zwischen den beiden Spaltstellen vorliegenden Sequenz einen Einfluss auf die Fusionsaktivität des BRSV-F-Proteins hat. Um dies beim HRSV-F-Protein nachzuvollziehen, wurde für die Mutante hF<sub>pep-5</sub> das N-terminale Ende des Pep27 um fünf Aminosäuren verkürzt. Dadurch rücken auch die Glykosylierungsstellen näher an die Furinspaltstelle heran und könnten so ebenfalls die Spaltung beeinflussen. Die Mutanten hF<sub>Flag-hpep</sub> und hF<sub>Strep-hpep</sub>, bei denen eine dreifache Flag-Sequenz bzw. eine Strep-Sequenz eingefügt worden ist, stellen eine Verlängerung des Pep27 am N-Terminus dar. Sie entfernten die Glykosylierungen weiter von der Spaltungsstelle und könnten so den Zugang dazu erleichtern. Die Zufallsmutante hF<sub>Strep-hpep,fus-3</sub> enthält sowohl ein mit dem Strep-Tag verlängertes Pep27 als auch ein um drei Aminosäuren verkürztes Fusionspeptid.

Für die Mutante hF<sub>bpep</sub> wurde das humane Pep27 gegen ein bovines Pep27 ausgetauscht. Hier sollte der Einfluss der Sequenz des bovinen Pep27 - unter Beibehaltung der gleichen Längen - auf die Fusionsaktivität des HRSV-F-Proteins geklärt werden. Für die Mutante bF<sub>Strep-hpep</sub> wurde hingegen ein durch eine Strep-Sequenz verlängertes HRSV Pep27 mit den BRSV F<sub>1</sub>- und F<sub>2</sub>-Untereinheiten kombiniert. Bei der Mutante bF<sub>hF2+pep</sub> wurden die F<sub>2</sub>-Untereinheit und das Pep27 von HRSV mit der F<sub>1</sub>-Untereinheit von BRSV kombiniert. Ähnliche Chimären wurden bereits als fusionsaktiv beschrieben (SCHLENDER et al., 2003).

Das lösliche F-Protein enthielt im Gegensatz zu allen anderen Mutanten keine Modifikationen in oder in der Nähe des Pep27. Membrananker und zytoplasmatische Domäne wurden durch Deletion der Aminosäuren 525-574 entfernt und durch eine dreifache Flag-Sequenz ersetzt. Außerdem wurde dieses Protein nicht induzierbar sondern konstitutiv in MDCK-Zellen exprimiert.

### 5.1.1 Generierung der transgenen Zelllinien

Die transgenen Zelllinien wurden wie unter 4.1.3 beschrieben, generiert. Es war jedoch nicht möglich, mit allen oben dargestellten Konstrukten transgene Zelllinien zu generieren, die das F-Protein in vergleichbarer Weise exprimierten. Die Spaltungsmutanten  $hF_{RR}$  und  $hF_{KGR}$  ließen sich jeweils nur in sehr wenigen Fällen und stets auch nur in den ersten Stunden unmittelbar nach der Induktion nachweisen.

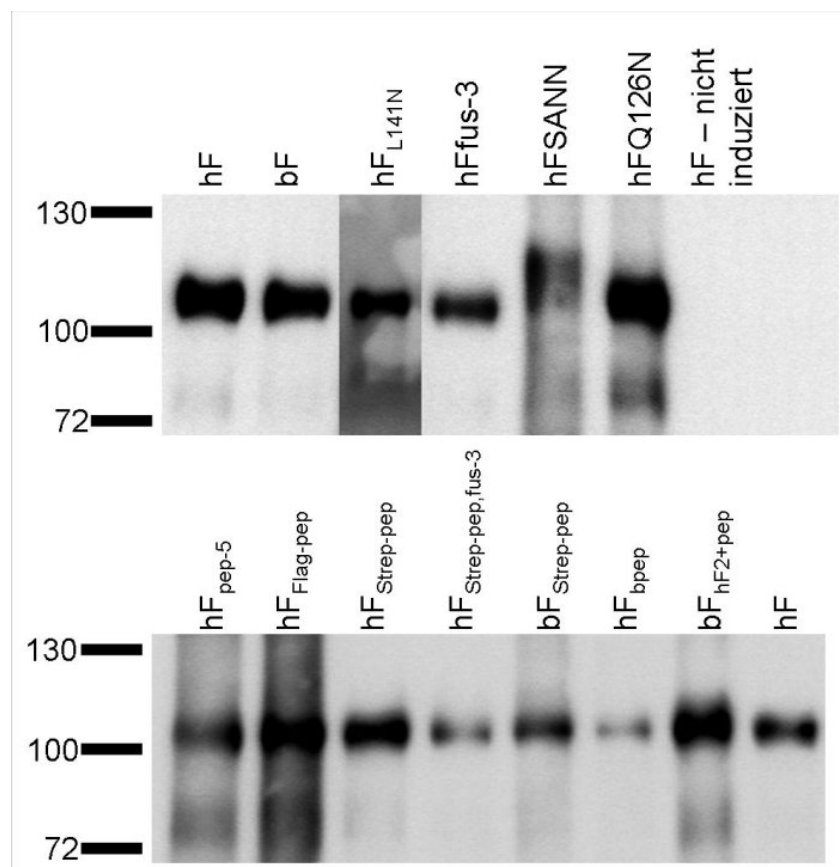
Neben den angegebenen Zelllinien wurde zum Vergleich zwischen dem F-Protein von HRSV und BRSV noch MDCK-(bF-GFP)-Zellen verwendet. Weiter dienten die Zelllinien MDCK-(SeV-F-GFP) und MDCK-(gp40-GFP) als Kontrollzelllinien. Die MDCK-SeVF-GFP-Zellen exprimieren das F-Protein des Sendaivirus. Es handelt sich um ein Typ-I-Membranprotein, welches bei Zugabe von Trypsin extracellular gespalten wird. Ohne diese Spaltung und ohne Assoziation mit dem Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN-Protein) ist es nicht fusionsaktiv. Die MDCK-(gp40-GFP)-Zellen exprimieren das gp40-Protein, welches ein canines membranprotein darstellt, welches ursprünglich aus MDCK-I-Zellen kloniert worden war (ZIMMER et al., 1997).

### 5.1.2 Expression der F-Proteinmutanten

Um die Expression und die korrekte Prozessierung der F-Proteinmutanten in den transgenen Zelllinien zu demonstrieren, wurden die Zellen in 6-Napf-Schalen ausgesät, am folgenden Tag induziert, nach vierundzwanzig Stunden wurden die Oberflächenproteine mit Biotin markiert und das F-Protein aus den zelllysaten immunpräzipitiert. Das biotinylierte F-Protein wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen (**Abbildung 5.1**).

Das RSV-F-Protein hat eine Größe von ca. 70 kDa. Im Blot haben die RSV-F-Proteine eine Größe von etwa 100 kDa, da das F-Protein mit dem GFP-Protein verknüpft ist. Mit Ausnahme des  $hF_{SANN}$ -Protein weisen alle Mutanten dieselbe Größe wie das hF-GFP- und das bF-GFP-Protein auf. Die Spaltung der Mutanten, die Glykosylierung der  $F_1$ - und  $F_2$ -Untereinheiten sowie der Oberflächentransport der F-Proteine war also nicht beeinträchtigt.

Der Massenunterschied im Fall der Mutante  $hF_{SANN}$  beruht auf der Glykosylierung des Pep27,

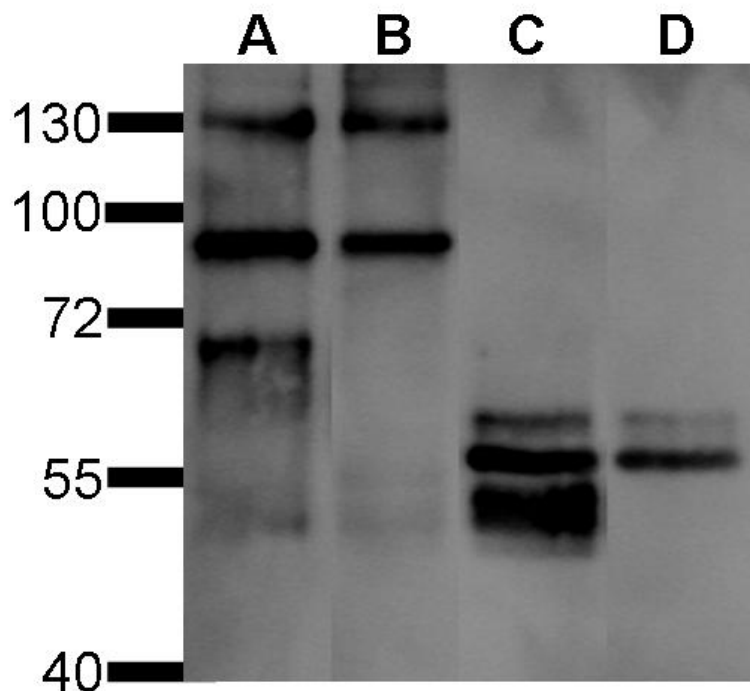


**Abbildung 5.1:** Immunpräzipitation der F-Proteine induzierter stabiler Zelllinien. Zur Kontrolle wurde die Präzipitation aus nicht induzierten MDCK-(hF-GFP)-Zellen aufgetragen.

welches wegen der unterbleibenden Spaltung am N-terminalen Ende des Pep27 nicht abgespalten wird. Auch in diesem Fall ist der Oberflächentransport nicht beeinträchtigt.

### 5.1.3 Expression des löslichen HRSV-F-Proteins

Um die Expression und die korrekte Prozessierung des löslichen F-Proteins in transgenen MDCK-Zellen zu zeigen, wurde aus dem Überstand konfluenter MDCK-hF<sub>sol</sub>- und MDCK-Zellen das F-Protein mit einem monoklonalem Antikörper immunpräzipitiert und im Western-Blot mit dem  $\alpha$ -Flag-M2-Antikörper nachgewiesen (**Abbildung 5.2**). Das lösliche F-Protein hat unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa (Spalte A). Unter reduzierenden Bedingungen ist nur noch die F<sub>1</sub>-Untereinheit zu erkennen. Sie hat eine Größe von etwas unter 55 kDa (Spalte C). Das lösliche F-Protein wird also trotz des fehlenden Membranankers und zytoplasmatischen Abschnitts korrekt glykosyliert und gespalten.



**Abbildung 5.2:** Immunpräzipitation des löslichen HRSV-F-Protein. Die Spalten A und C zeigen das lösliche F-Protein unter nicht-reduzierenden bzw. reduzierenden Bedingungen. Die Spalten B und D die entsprechend behandelten Kontroll-Präzipitation aus dem Überstand von MDCKII-Zellen. Die zusätzlichen Banden im Blot, die sowohl in den Spuren A und B bzw. C und D zu erkennen sind, rühren von dem für die Immunpräzipitation verwendeten  $\alpha$ -RSV-F-Antikörper her.

#### 5.1.4 RSV-F-Protein induzierte Bildung von Synzytien

Auf der Zelloberfläche expremierte F-Proteine können die Fusion mit Nachbarzellen induzieren und so die Bildung von Synzytien bewirken. Um zu überprüfen, ob die Mutanten noch diese Fusionsaktivität aufwiesen, wurden die transgenen Zelllinien auf Deckgläsern in 24-Napf-Schalen ausgesät, induziert und für einen bis vier Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die **Abbildung 5.3** zeigt Beispiele von Synzytien 24 Stunden nach Induktion. Die Kinetik der Synzytienbildung über vier Tage ist in **Tabelle 5.2** dargestellt.

Die Zellen, welche das HRSV-F-GFP-Protein expremierten, wiesen nach einem Tag viele und große Synzytien auf, deren Anzahl jedoch durch den Tod der F-Protein-expremierenden Zellen

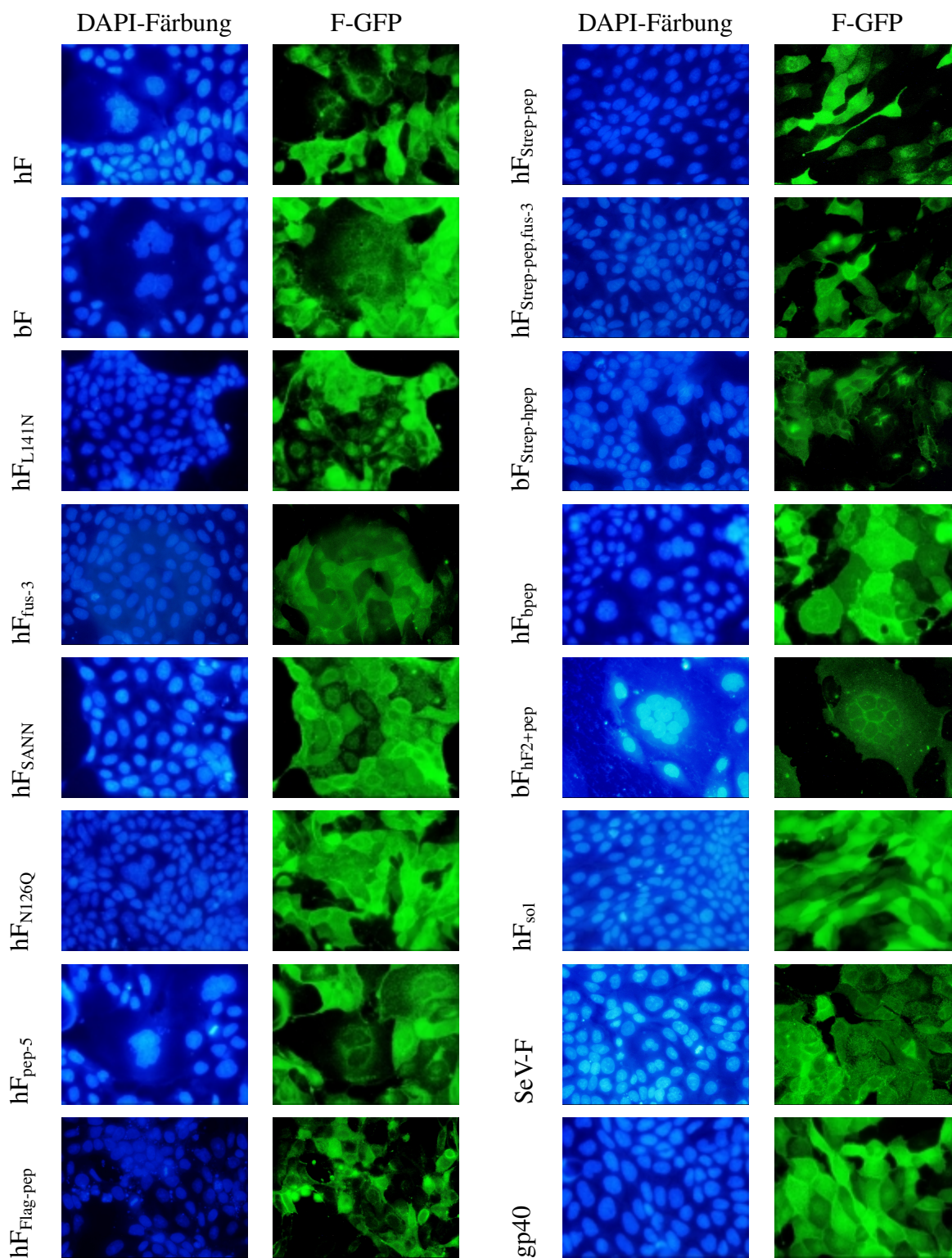


Abbildung 5.3: Durch RSV-F-Proteine induzierte Synzytienbildung nach 24 Stunden.

in den folgenden Tagen abnahm. Noch stärker ausgeprägt war dieses Phänomen bei den bF-GFP-exprimierenden Zellen; am dritten Tag waren kaum noch lebende Zellen vorhanden.

Die Mutationen im Fusionspeptid hatten einen deutlichen Effekt auf die Synzytienbildung: Die Mutante hF<sub>L141N</sub> wies erst am vierten Tag Synzytien auf, während bei der Mutante hF<sub>fus-3</sub> über den ganzen Zeitraum keine Synzytien nachweisbar waren.

Die Spaltungsmutante hF<sub>SANN</sub> entwickelte erst am vierten Tag einige wenige Synzytien, während die Synzytienbildung der Glykosylierungsmutante hF<sub>N126Q</sub> verglichen mit dem unmodifizierten F-Protein nur leicht verzögert auftrat. Nachdem an den beiden ersten Tag weniger Synzytien als bei den MDCK-(hF-GFP) und MDCK-(bF-GFP) zu finden waren, erreichte deren Anzahl und Größe am dritten Tag das Niveau der Synzytien bei diesen.

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
hF	+++	++	++	+
bF	+++	+++		
hF <sub>L141N</sub>	-	-	-	++
hF <sub>fus-3</sub>	-	-	-	-
hF <sub>SANN</sub>	-	-	-	+
hF <sub>N126Q</sub>	++	++	+++	+++
hF <sub>pep-5</sub>	+	++	++	+++
hF <sub>Flag-pep</sub>	-	-	-	-
hF <sub>Strep-pep</sub>	-	-	-	-
hF <sub>Strep-pep, fus-3</sub>	-	-	-	-
bF <sub>Strep-hpep</sub>	++	+++	+++	+++
hF <sub>bpep</sub>	+	++	++	+
bF <sub>hF2+pep</sub>	+++	+++	++	++
hF <sub>sol</sub>	-	-	-	-
SeV-F	-	-	-	-
gp40	-	-	-	-

**Tabelle 5.2:** Kinetik der Synzytienbildung in transgenen Zelllinien. +++ steht für viele und große Synzytien, ++ für weniger und nicht so große Synzytien, + für kleine und wenig Synzytien und - für das Ausbleiben von Synzytien



Deutlicher verzögert war die Synzytienbildung im Fall des N-terminal verkürzten Pep27 ( $hF_{\text{pep-5}}$ ). Die Zellen erreichten hier erst am dritten Tag das Ausmaß an Zellfusion, die MDCK-(hF-GFP)-Zellen bereits nach 24 Stunden aufwiesen. MDCK-Zellen, die F-Proteinmutanten mit N-terminaler Verlängerung des Pep27 (MDCK-( $hF_{\text{Flag-pep}}$ -GFP) und MDCK-( $hF_{\text{Strep-pep}}$ -GFP)) expremierten, wiesen überhaupt keine Synzytienbildung mehr auf. Ein ähnliches Phänomen wurde bei Zellen beobachtet, welche die Doppelmutante  $hF_{\text{Strep-pep,fus-3}}$  expremierten. Allerdings wies die chimäre Mutante  $bF_{\text{Strep-hpep}}$ , in der das HRSV-Pep27 mit einem Strep-Tag vor dem Hintergrund des BRSV-F-Proteins expremiert wird, nur eine leichte Verzögerung der Synzytienbildung auf. Am ersten Tag zeigte sie zwar weniger Synzytien als hF-GFP, doch ab dem zweiten Tag hatte deren Anzahl und Größe das gleiche Ausmaß erreicht.

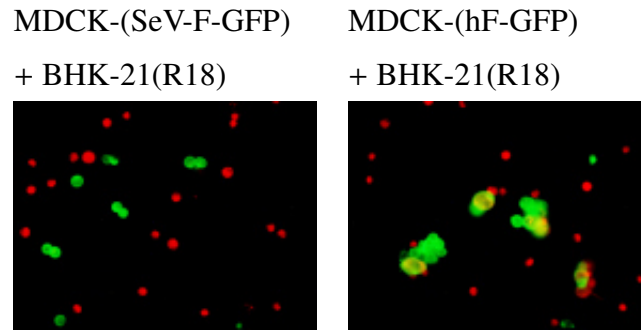
Stärker gestört war die Synzytienbildung im Fall des chimären Proteins  $hF_{\text{bpep}}$ . Diese Mutante bildete am ersten Tag nur vereinzelt Synzytien, deren Anzahl zwar bis zum zweiten Tag zunahm, aber nach dem dritten Tag wieder abfiel. Die Synzytienbildung durch die Mutante  $bF_{\text{hF2+pep}}$  war der durch das unmodifizierte F-Protein sehr ähnlich.

Sowohl die Zellen, welche das lösliche HRSV-F expremierten, als auch die Kontrollzelllinien MDCK-(SeV-F-GFP) und MDCK-(gp40-GFP) wiesen keine Synzytien auf.

### 5.1.5 Heterologe Zellfusion mit R18-markierten Zellen

Die Synzytienbildung in den MDCK-Zellen war nur schwer quantifizierbar, da die Größe der Synzytien selbst innerhalb eines Ansatzes stark variierte. Um die Fusionsaktivität der Mutanten besser quantifizieren zu können, wurden BHK-21-Zellen mit dem kationischen, lipophilen rot-fluoreszierendem Farbstoff *Octadecylrhodamine B chloride* (R18) markiert, gewaschen, zusammen mit den transgenen Zellen in 24-Napf-Schalen ausgesät und die Expression des F-Proteins induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen trypsiniert, resuspendiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Bei der Markierung der BHK21-Zellen lagerte sich der Farbstoff R18 in die Zellmembranen ein. Fusionierten diese Zellen nun mit F-GFP-expremierenden Zellen, so bildeten sich Zellen, die sowohl das GFP des F-GFP-Proteins als auch die R18-Markierung trugen (**Abbildung 5.4**). MDCK-(SeV-F-GFP)-Zellen fusionierten nicht mit R18-markierten BHK21-Zellen, da das F-Protein während des Inkubationszeitraumes nicht durch Trypsin gespalten wurde und das HN-



**Abbildung 5.4:** Beispiele der heterologen Zellfusion. MDCK-(F-GFP)-Zellen sind grün dargestellt. Die mit R18 markierten BHK21-Zellen sind rot dargestellt. Fusionierte Zellen sind doppelt gefärbt und daher gelb.

SeV-F-GFP führte nicht zur Fusion der MDCK-Zellen mit den markierten BHK-21-Zellen. hF-GFP führte zur Fusion der MDCK- und BHK-21-Zellen.

Protein nicht vorliegt. Hingegen bewirkt das hF-GFP-Protein die Fusion der MDCK-Zellen mit den BHK-21-Zellen. Zur Quantifizierung der Fusionsaktivität wurde der Anteil der fusionierten und somit doppelt gefärbten Zellen an der Gesamtheit der GFP-exprimierenden Zellen bestimmt. **Tabelle 5.3** fasst die Ergebnisse aus diesem Versuch zusammen.

Zellen, die das nicht mutierte HRSV-F-GFP-Protein bzw. das BRSV-F-GFP-Protein exprimierten, wiesen am ersten Tag 39% bzw. 34% fusionierte MDCK-(F-GFP)-Zellen auf. Diese Werte stiegen auf etwa 60% am zweiten Tag und 64% bzw. 85% am dritten Tag an.

Mutationen im Fusionspeptid hatten einen deutlichen Einfluss auf die Fusionsaktivität. Das F-Protein mit der Mutation L141N führte erst nach drei Tagen zu dem geringen Prozentsatz von 4% an fusionierten Zellen, während die Verkürzung des Fusionspeptid im Konstrukt hF<sub>fus-3</sub> dazu führte, dass keine Fusionsaktivität messbar war.

Die Fusionsaktivitäten der Spaltungsmutante hF<sub>SANN</sub> und der Glykoysilierungsmutante hF<sub>N126Q</sub> waren im Vergleich zum nicht mutierten HRSV-F-Protein reduziert. Am ersten Tag erreichten sie beide nur einen Anteil von 8% fusionierter Zellen, am zweiten Tag 16% bzw. 10% und am dritten Tag 17% bzw. 10% fusionierter Zellen.

Die Fusionsaktivität der am N-Terminus des Pep27 verkürzten Mutante hF<sub>pep-5</sub> war noch stärker herabgesetzt. Am ersten Tag waren nur 1% der F-exprimierenden Zellen fusioniert, am zweiten Tag 3% und am dritten Tag lediglich 8%. War das Pep27 N-terminal um eine 3-fache Flag-Sequenz verlängert worden (hF<sub>Flag-pep</sub>), so waren am ersten Tag lediglich 1% der Zellen

	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
hF	39	60	64
bF	34	63	85
hF <sub>L141N</sub>	0	0	4
hF <sub>fus-3</sub>	0	0	0
hF <sub>SANN</sub>	8	16	17
hF <sub>N126Q</sub>	8	10	7
hF <sub>pep-5</sub>	1	3	8
hF <sub>Flag-pep</sub>	1	0	0
hF <sub>Strep-pep</sub>	0	12	6
hF <sub>Strep-pep, fus-3</sub>	0	0	0
bF <sub>Strep-hpep</sub>	23	17	30
hF <sub>bpep</sub>	5	5	17
bF <sub>hF2+pep</sub>	10	7	3
hF <sub>sol</sub>	0	0	0
SeV-F	0	0	0
gp40	0	0	0

**Tabelle 5.3:** Prozentualer Anteil der fusionierten MDCKII-GFP-Zellen bezogen auf die Gesamtanzahl der GFP-exprimierenden Zellen

fusioniert. War das Pep27 jedoch an derselben Stelle durch eine Strep-Markierung verlängert (hF<sub>Strep-pep</sub>), so wurden erstmals am zweiten Tag fusionierte Zellen nachgewiesen; dieser Anteil fiel jedoch von 12% wieder auf 6% am dritten Tag. Die Doppelmutante hF<sub>Strep-pep, fus-3</sub> wies keinerlei Fusionsaktivität auf, während die chimäre BRSV-F-Mutante mit dem um eine Strep-Markierung verlängerten humanen Pep27 (bF<sub>Strep-hpep</sub>) am ersten Tag einen Anteil von 23% doppelt fluoreszierender Zellen aufwies, am zweiten Tag 17% und am dritten Tag 30%.

Die beiden anderen chimären F-Proteine waren stärker attenuiert. Das HRSV-F mit dem bovinen Pep27 (hF<sub>bpep</sub>) zeigte an den ersten beiden Tagen jeweils 5% fusionierte Zellen und am dritten Tag 17%. Das BRSV-F, dessen F<sub>2</sub>-Untereinheit und Pep27 gegen jene des HRSV-F-Proteins ausgetauscht worden waren, wies am ersten Tag 10% fusionierte Zellen auf, am zweiten Tag nur noch 7% am am dritten Tag lediglich 3%.

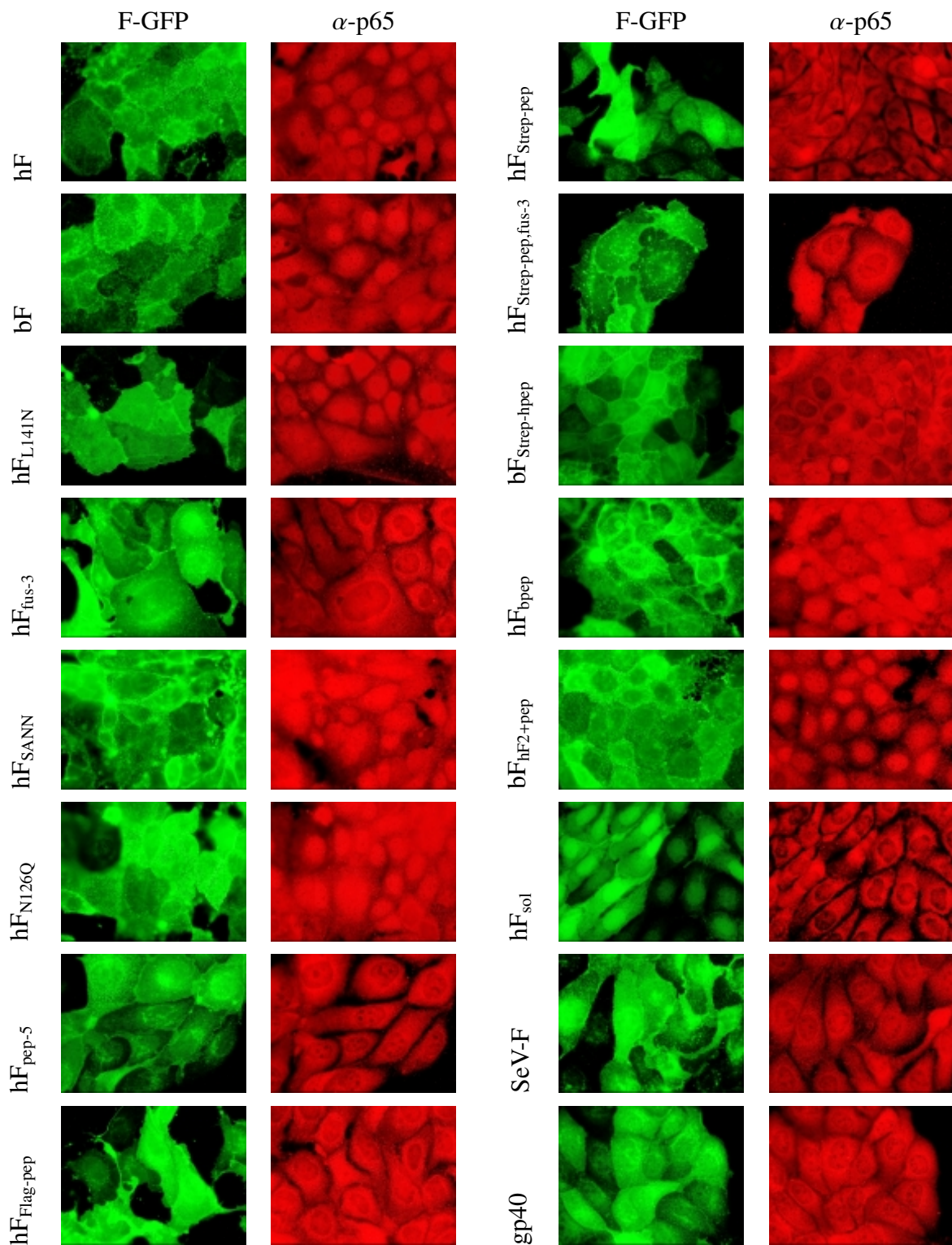
Weder das lösliche F-Protein noch die beiden Kontrollproteine SeVF und gp40 führten zu einer Fusion zwischen MDCK- und BHK-21-Zellen. Allerdings war in allen drei Zelllinien eine vom ersten Tag an immer stärker werdende Hintergrundfärbung durch R18 in den MDCK-Zellen beobachtbar, die darauf hindeutet, dass auch eine nicht F-vermittelte Interaktion der Zellen zur Übertragung des R18 führen konnte. In den ersten 72 Stunden konnte diese Hintergrundfärbung gut von dem bei MDCK-(hF-GFP)-Zellen beobachteten Lipidtransfers unterschieden werden. Am vierten Tag war diese Unterscheidung nicht mehr eindeutig möglich.

### 5.1.6 RSV-F-Protein induzierte Translokation von $\text{NF}_{\kappa}\text{B}$ (p65)

Es ist bekannt, dass die Infektion mit RSV zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}_{\kappa}\text{B}$  führt (BIRKO et al., 2004).  $\text{NF}_{\kappa}\text{B}$  ist ein Komplex aus den Proteinen p50 und p65. Normalerweise liegt  $\text{NF}_{\kappa}\text{B}$  im Cytosol an den Inhibitor  $\text{I}_{\kappa}\text{B}$  gebunden vor. Durch Stimulierung erfolgt eine Phosphorylierung von  $\text{I}_{\kappa}\text{B}$  und die nachfolgende Ubiquitinierung und der Abbau von  $\text{I}_{\kappa}\text{B}$ . Das  $\text{NF}_{\kappa}\text{B}$  wird sodann in den Zellkern transportiert und die Transkription einer Vielzahl von Genen induziert, die unter anderem im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen und der Apoptose stehen. In unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass die Translokation der p65-Untereinheit in den Zellkern durch die Expression des F-Proteins ausgelöst wird. Es sollte nun geklärt werden, ob diese Translokation mit der Fusionsaktivität in Zusammenhang steht.

Dazu wurden die transgenen Zelllinien auf Deckgläsern ausgesät und mit Mifepriston in Abwesenheit von Serum für vierundzwanzig Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit Aceton/Methanol permeabilisiert und mit den Antikörpern  $\alpha$ -p65 und  $\alpha$ -Kanninchen-Cy3 gefärbt. **Abbildung 5.5** zeigt die Lokalisation von p65 in den verschiedenen MDCK-Zelllinien. In den Zellen, in denen keine Translokation stattfand, sparte p65 den Zellkern aus und war im Zytoplasma lokalisiert. In den Zellen, in denen eine Translokation erfolgte, ist das p65 vor allem im Zellkern nachweisbar.

Sowohl das HRSV-F-Protein als auch BRSV-F-Protein führten zur Translokation von p65. Von den beiden Mutanten, die das Fusionspeptid betrafen, induzierte jedoch nur hF<sub>L141N</sub> die Translokation von p65, nicht aber die Mutante hF<sub>fus-3</sub>. Die Expression der Spaltungsmutante hF<sub>SANN</sub> und der Glykosylierungsmutante hF<sub>N126Q</sub> gingen dagegen wieder mit einer Translokation von p65 in den Zellkern einher.



**Abbildung 5.5:** Translokation von p65. p65 ist rot gefärbt, das F-GFP- bzw. das gp40-GFP-Protein ist grün dargestellt.

Die N-terminale Verlängerung von Pep27 ( $hF_{\text{pep-5}}$ ) bewirkte ebenso wie die Einführung einer Flag- ( $hF_{\text{Flag-pep}}$ ) oder Strep-Sequenz ( $hF_{\text{Strep-pep}}$ ) in das Pep27 keine Translokation von p65. Ein ähnliches Phänomen wies die Doppelmutante  $hF_{\text{Strep-pep,fus-3}}$  und die Chimäre  $bF_{\text{Strep-hpep}}$  auf.

Die Expression der beiden anderen chimären Proteine,  $hF_{\text{bpep}}$  und  $bF_{\text{hF2+pep}}$ , führte dagegen zur Translokation von p65. Die Expression des löslichen HRSV-F-Proteins sowie der Kontrollen SeV-F und gp40 löste keine Translokation aus. Die Mutationen im HRSV-F-Protein hatten also einen deutlichen Effekt auf die Translokation von p65.

### 5.1.7 Aktivierung von Caspase-3

Die Cystein-Protease Caspase 3 ist ein Schlüsselenzym der Apoptose. Um die Auswirkung der Mutationen im F-Protein auf die Induktion der Apoptose zu studieren, wurden die Aktivitäten der Caspase 3 bzw. 7 in F-exprimierenden Zellen mit Hilfe eines luminiszierenden Substrates gemessen.

Die transgenen Zellen wurden in 24-Napf-Platten ausgesät, am folgenden Tag induziert und für 24 bis 96 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Caspase-3/7-Aktivität im Zellextrakt bestimmt. Zum Vergleich wurden die Messungen mit nicht-induzierten Zellen durchgeführt. Die Steigerung der Enzymaktivität wurde ermittelt, indem das Verhältnis zwischen den Caspase 3-Aktivitäten der induzierten Zellen zu den Caspase 3-Aktivitäten der nicht-induzierten Zellen bestimmt wurde (**Tabelle 5.4**).

Nach 24 Stunden betrug die durch das HRSV-F-Protein induzierte Caspase-3-Aktivität das Fünffache gegenüber den nicht induzierten Zellen. Nach achtundvierzig Stunden war der Wert auf das 19,6-fache gestiegen. Das BRSV-F-Protein bewirkte eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität nach 24 Stunden um das 3,1-fache und nach 48 Stunden um das 17,8-fache. In beiden Fällen waren nach 96 Stunden nicht mehr genug Zellen für die Messung der Caspase-Aktivität vorhanden.

Eine deutliche Caspase-3-Aktivität zeigten die Mutanten  $hF_{\text{L141N}}$ ,  $hF_{\text{SANN}}$ ,  $hF_{\text{N126Q}}$  und  $hF_{\text{Flag-pep}}$ . Die Mutante  $hF_{\text{L141N}}$  führte zu einer Caspase-3-Aktivität in Höhe des 6,3-fachen am zweiten Tag. Auch die Glykosylierungsmutante  $hF_{\text{N126Q}}$  führte zu einer vergleichbaren Caspase-3-Aktivität. Die Mutante  $hF_{\text{Flag-pep}}$  bewirkte einen Anstieg der Caspase-Aktivität auf das 7,6-fache

	24h	48h	72h	96h
hF	4,9 ± 1,7	19,6 ± 8,9		
bF	3,1 ± 1,5	17,8 ± 2,7		
hF <sub>L141N</sub>	2,1 ± 1,1	6,3 ± 2,9	2,9 ± 0,8	4,2 ± 1,2
hF <sub>fus-3</sub>	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,2
hF <sub>SANN</sub>	3,2 ± 0,7	9,6 ± 3,6	19,1 ± 6,7	3,5 ± 0,7
hF <sub>N126Q</sub>	2,2 ± 0,4	6,3 ± 1,8	5,3 ± 0,9	6,8 ± 2,1
hF <sub>pep-5</sub>	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,9 ± 0,9	2,3 ± 0,9
hF <sub>Flag-pep</sub>	2,0 ± 0,5	7,6 ± 2,3	4,1 ± 1,3	2,4 ± 0,6
hF <sub>Strep-pep</sub>	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,3	1,1 ± 0,3
hF <sub>Strep-pep,fus-3</sub>	1,0 ± 0,5	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,5
bF <sub>Strep-hpep</sub>	1,1 ± 0,3	2,7 ± 0,9	2,4 ± 0,3	2,7 ± 1,0
hF <sub>bpep</sub>	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,4
bF <sub>hF2+pep</sub>	3,3 ± 1,4	2,0 ± 0,4	2,5 ± 0,2	1,0 ± 0,3
hF <sub>sol</sub>	1,6 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,4 ± 0,6	1,7 ± 0,9
SeV-F	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,3
gp40	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,4

**Tabelle 5.4:** Verhältnis der Caspase-3/7-Aktivitäten von induzierten und nicht-induzierten transgenen MDCK-Zelllinien. Es wurden Werte aus drei unabhängigen Experimenten einbezogen.

der nicht induzierten Zellen. Lediglich die Mutante hF<sub>SANN</sub> erreichte mit dem 19,1-fachen am dritten Tag eine Caspase-3-Aktivität in Höhe der unmodifizierten F-Proteine. Allerdings war diese um einen Tag verzögert.

Die Mutanten bF<sub>Strep-hpep</sub> und bF<sub>hF2+pep</sub> zeigten mit dem 2,7-fachen am zweiten bzw. dem 3,3-fachen am ersten Tag nur eine sehr geringe Caspase-3-Aktivität. Die übrigen Mutanten und die Kontrollzellen zeigten praktisch keine Caspase-3-Aktivität zwischen dem 0,7- und dem 2,3-fachen der nichtmodifizierten Zellen.

Im Fall des löslichen HRSV-F-Proteins lagen aufgrund des verwendeten Systems zur Erzeugung dieser Zelllinie keine nicht exprimierenden Zellen vor. Die Caspase-3-Aktivitäten wurden daher durch die Mittelwerte der nicht induzierten Proben aller anderen Zelllinien geteilt. Es ergaben sich Caspase-3-Aktivitäten im Bereich vom 1,1- bis 1,6-fachen. Eine signifikante Veränderung

wurde nicht beobachtet.

Die Mutationen im F-Protein hatten also eine deutliche Auswirkung auf die F-induzierte Apoptose.

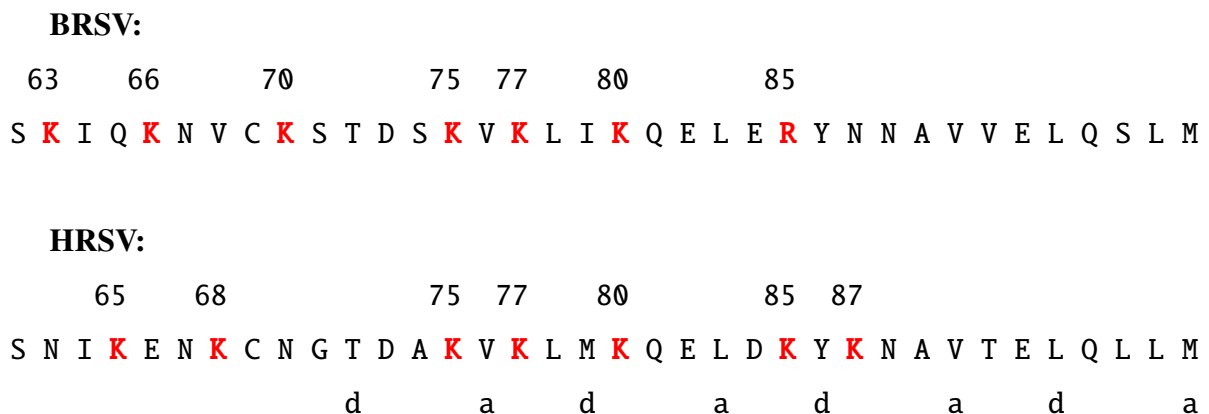


## 5.2 Charakterisierung des RSV-F-Proteins mittels Sendavirus-Pseudotypen

In der F<sub>2</sub>-Untereinheit des RSV-F-Proteins findet sich eine im BRSV- bzw. HRSV-F-Protein konservierte basische Domäne, die teilweise mit einer *heptad repeat*-Region überlappt und mehrere Lysine aufweist. Die basischen Domänen von BRSV und HRSV sind einander ähnlich (**Abbildung 5.6**).

An rekombinanten BRSV konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen der Lysine und des Arginins in der basischen Domäne K<sup>63</sup>-R<sup>85</sup> des BRSV-F-Proteins Auswirkungen auf die Replikation der Viren, ihre Infektiosität und die Bildung von Synzytien in infizierten Zellen haben. Während die basischen Aminosäuren K<sup>63</sup>, K<sup>66</sup>, K<sup>80</sup> und R<sup>85</sup> eine modulatorische Wirkung auf diese Parameter hatten, waren die Aminosäuren K<sup>75</sup> und K<sup>77</sup> essentiell für die Bildung infektiöser Partikel (PANAYOTOVA, 2005).

Eine Besonderheit der basischen Domäne ist, dass sie in der *heptad repeat*-Sequenz 1 (HR1) liegt. Innerhalb eines *heptad repeats* liegen meist hydrophobe Aminosäuren auf den Positionen a und d, während die Positionen e und g üblicherweise von geladenen Aminosäuren besetzt



**Abbildung 5.6:** Schema der basischen Domäne in den F<sub>2</sub>-Untereinheiten der BRSV- und im HRSV-F-Proteine. Die rot markierten Aminosäuren waren im Fall von BRSV in rekombinanten Viren in Asparagine mutiert worden. Die darüberstehenden Zahlen geben die Position der zugehörigen Aminosäure an.

In der HRSV-Sequenz wurden die rot markierten Lysine in Einzelmutation in Asparagine mutiert. Die darüberstehenden Zahlen geben die Position der zugehörigen Aminosäure an.

Die *heptad repeat*-Sequenz beginnt mit Threonin<sup>72</sup>. Die Positionen a und d in der *heptad repeat*-Sequenz sind unter den zugehörigen Aminosäuren markiert.

werden. Die Funktion von HR1 ist bisher noch nicht geklärt. Es wurde jedoch eine *coiled coil*-Region für die Aminosäuren 72 bis 100 vorhergesagt (MATTHEWS et al., 2000).

Aufgrund der großen Ähnlichkeit dieser Domäne mit der im HRSV-F-Protein vorkommenden Domäne K<sup>65</sup>-K<sup>87</sup> wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der Lysine in der basischen Domäne des HRSV-F-Proteins mit Sendaivirus-Pseudotypen untersucht.

Das Sendaivirus (SeV), das auch als murines Parainfluenzavirus Typ 1 bezeichnet wird, gehört zusammen mit dem humanen Parainfluenzavirus Typ 1 und Typ 3 sowie dem bovinen Parainfluenzavirus Typ 3 zum Genus *Respirovirus* innerhalb der Unterfamilie *Paramyxovirinae*. Diese bildet mit der Subfamilie *Pneumovirinae*, zu der auch das unter **1.1** beschriebene respiratorische Synzytialvirus gehört, die Familie *Paramyxoviridae* (**Tabelle 1.1**) (CHANOCK et al., 2001). Die Viruspartikel ähneln im Aufbau RSV; jedoch existieren nur zwei Glykoproteine, das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN-Protein) und das Fusions-Protein (F-Protein).

Das HN-Protein vermittelt die Adsorption des Viruspartikels an die Zelle, indem es an sialinsäurehaltige Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet. Nach der Freisetzung neuer Viren aus der Zelle kann es mittels seiner Neuraminidase-Aktivität endständige N-Acetyl-Neuraminsäurereste (Sialinsäuren) von den Rezeptoren abspalten, wodurch sich die Tochterviren von der Zelloberfläche lösen können (SCHEID und CHOPPIN, 1974a).

Das Fusions-Protein (F-Protein) wird als Vorläuferprotein mit einer Länge von 565 Aminosäuren synthetisiert. Die Spaltung des inaktiven Vorläuferproteins F<sub>0</sub> erfolgt durch Trypsin hinter der Aminosäure 116. Die Peptide bleiben über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (HOMMA und OUCHI, 1973; SCHEID und CHOPPIN, 1974b). Die Spaltung bewirkt eine Konformationsänderung des F-Proteins, wodurch eine hydrophobe Domäne am N-Terminus des F<sub>1</sub>-Proteins exponiert wird, welche als Fusionspeptid dient (HSU et al., 1981, 1987). Das F-Protein verfügt über drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (BLUMBERG et al., 1985; YOSHIMA et al., 1981), wobei die mittlere Glykosylierungsstelle für den intrazellulären Transport und die Fusionsaktivität essentiell ist (SEGAWA et al., 2000). Desweiteren spielt auch das HN-Protein eine Rolle bei der durch das F-Protein vermittelten Fusion zweier Zellen miteinander (BOUSSE et al., 1994).

Es wurde bereits gezeigt, dass sich aus dem SeV-F-Protein und dem HRSV-F-Protein Chimären erzeugen lassen, die in Viruspartikel eingebaut werden und das SeV-F-Protein in rekombinanten

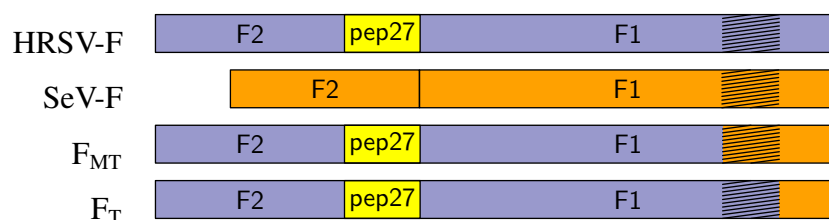
Viren ersetzen können (ZIMMER et al., 2003). In dem in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten SeV- $\Delta$ F ist das Gen für das F-Protein deletiert und durch ein GFP ersetzt worden, so dass es einfach zu detektieren ist. Da das Fusionsprotein für die Replikation des Sendavirus essentiell ist, wurde SeV- $\Delta$ F auf MDCK-SeV-F-Zellen propagiert.

### 5.2.1 Generierung von SeV-Pseudotypen

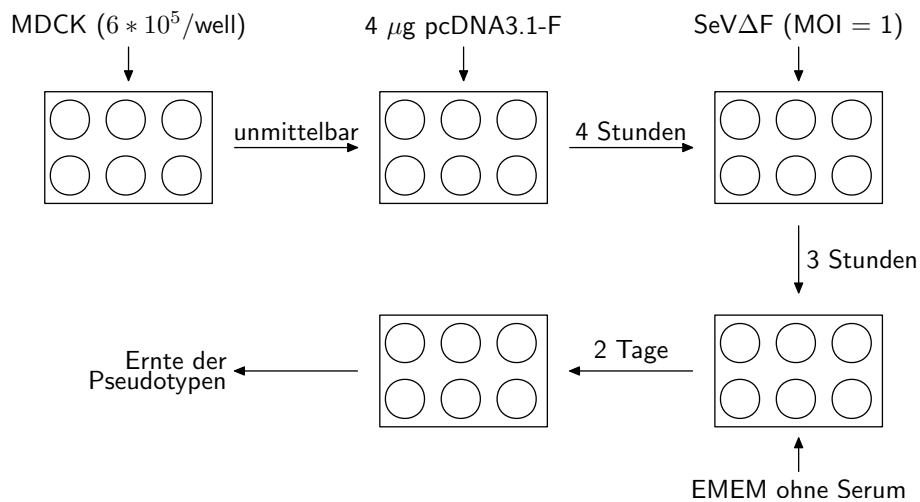
Es wurde bereits demonstriert, dass chimäre HRSV/SeV-F-Proteine in Sendaviruspartikel eingebaut werden (ZIMMER et al., 2005). Für die Herstellung von Pseudotypen wurden in dieser Arbeit zwei Chimären erstellt: Die Chimäre hF<sub>MT</sub> ist ein HRSV-F-Protein, dessen Membranker und zytoplasmatischer Abschnitt gegen die entsprechenden Domänen des SeV-F-Proteins ausgetauscht worden waren. Bei der Chimäre hF<sub>T</sub> wurde der zytoplasmatische Abschnitt gegen die entsprechende Domäne des SeV-F-Proteins ausgetauscht. Als Kontrollen wurde das HRSV-F-Protein und das Sendavirus-F-Protein genutzt (**Abbildung 5.7**).

Die Generierung von Pseudotypen erfolgte in MDCK-Zellen. Diese wurden in 6-Napf-Schalen mit  $6 \cdot 10^5$  Zellen/Napf ausgesät, mit 4  $\mu$ g der pcDNA3.1-F-Plasmide transfiziert, vier Stunden später gewaschen und für drei Stunden mit SeV- $\Delta$ F in einer MOI von 1 infiziert. Nach dreimaligen Waschen wurden die Zellen mit Medium ohne Serum für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmern abzentrifugiert und der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren oder sofort auf Vero-Zellen titriert (**Abbildung 5.8**). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA3.1 transfiziert worden waren.

Auf der transgenen MDCK-SeV-F-Zelllinie wurde ein Titer von  $5 \cdot 10^6$  ffu erreicht (**Abbildung 5.9**). Auf MDCK-Zellen, die das chimäre Protein hF<sub>T</sub> expremierten, wurde mit etwa  $3 \cdot 10^5$  ffu

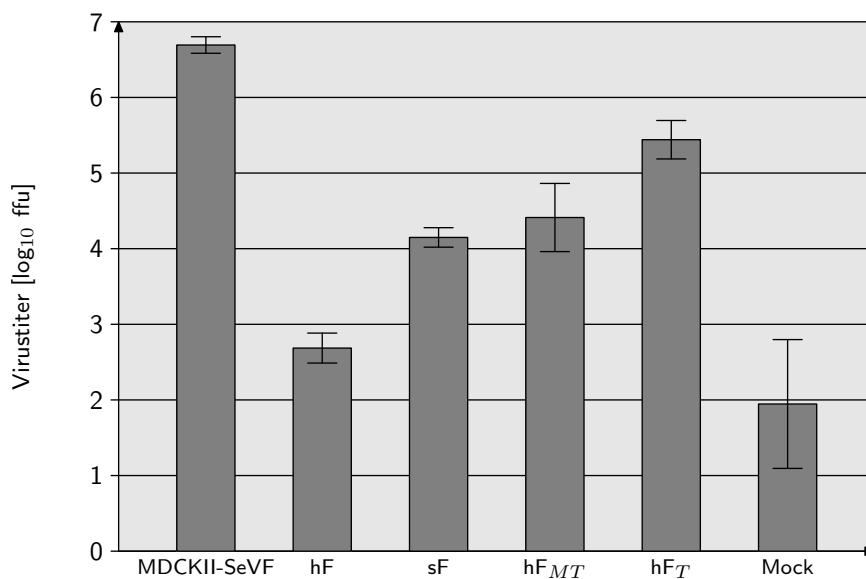


**Abbildung 5.7:** Schema der chimären HRSV/SeV-F Konstrukte. Die Aminosäuresequenzen der Mutanten hF<sub>T</sub> und hF<sub>MT</sub> finden sich im Anhang.



**Abbildung 5.8:** Schema der Generierung von Pseudotypen

der höchsten Virustiter nachgewiesen. Mit dem chimären Protein  $\text{hF}_{\text{TM}}$ , das sowohl die zytoplasmatische Domäne als auch den Membrananker des SeV-F-Protein enthielt, wurde mit ca.  $3 \times 10^4$  ffu ein um den Faktor 10 reduzierter Titer erreicht, während mit dem SeV-F-Protein Titer von  $1 \times 10^4$  ffu erzielt wurden. Allerdings sanken auch die Titer der Pseudotypen mit chimärem F-Protein auf die Größenordnung der mit dem SeV-F-Protein erzielten Titer, wenn auch zu diesen Ansätzen Trypsin zugefügt worden war. Auf MDCK-Zellen, die das HRSV-F-Protein expremierten, ergaben sich Titer in der Größenordnung der Negativkontrolle.

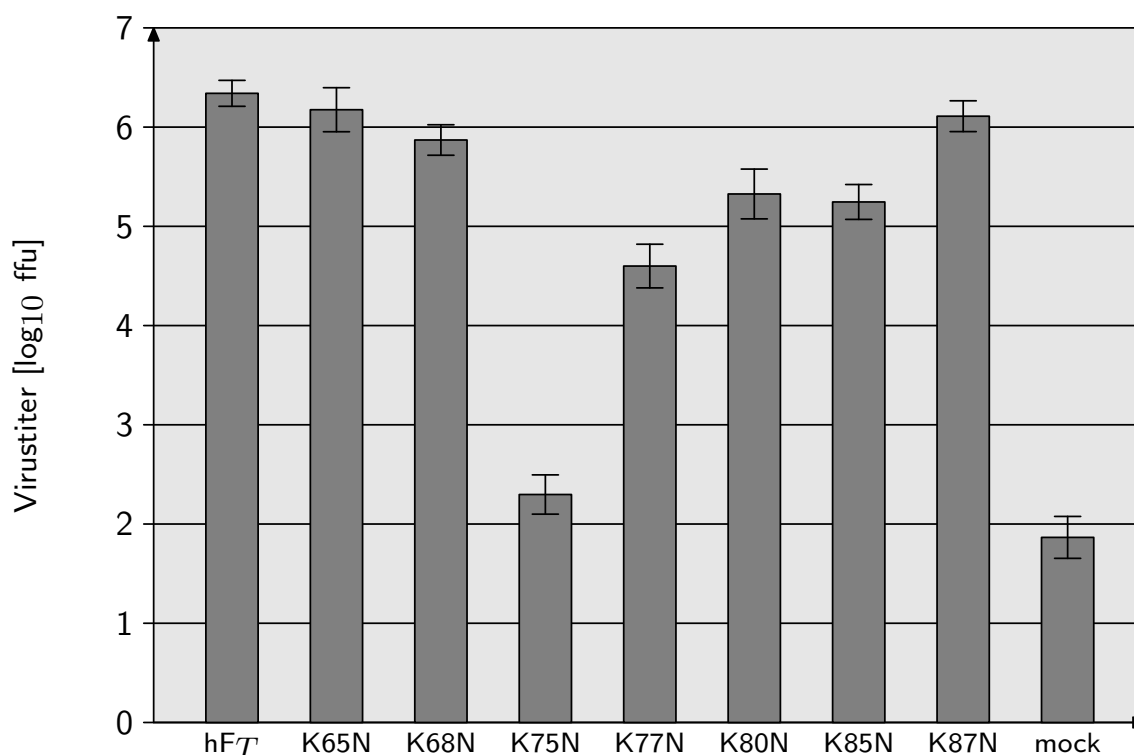


**Abbildung 5.9:** Infektiösität der Pseudotypen mit chimären F-Proteinen

### 5.2.2 Infektiösität der chimären HRSV/SeV-F-Protein-Pseudotypen

Alle Lysine in der basischen Region der F<sub>2</sub>-Untereinheit des HRSV-F-Protein wurden in den chimären F-Proteine durch Asparagine ersetzt (**Abbildung 5.6**). Um die Infektiösität der mit den chimären Mutanten erzeugten Pseudotypen zu ermitteln, wurden die Pseudotypen wie in Abschnitt **5.2.1** dargestellt, erzeugt, geerntet und titriert. Eingesetzt wurden die pcDNA3.1-Plasmide mit den Genen für die Chimäre hF<sub>T</sub> und die von dieser abgeleiteten Mutanten. Als Kontrolle diente pcDNA3.1 ohne inseriertes Gen. Das Ergebnis des Experiments ist in **Abbildung 5.10** gezeigt. Mit den analogen Mutanten der Chimäre hF<sub>MT</sub> ließen sich keine infektiösen Pseudotypen generieren.

Die Chimäre hF<sub>T</sub> wuchs zu Titer von  $2,2 \cdot 10^6$  ffu. Die Mutanten hF<sub>T</sub>K65N, hF<sub>T</sub>K68N und hF<sub>T</sub>K87N erreichten mit  $1,5 \cdot 10^6$ ,  $7,4 \cdot 10^5$  und  $1,3 \cdot 10^6$  ffu vergleichbare Titer. Die Mutanten hF<sub>T</sub>K80N und hF<sub>T</sub>K85N wuchsen mit  $2,1 \cdot 10^5$  bzw.  $1,8 \cdot 10^5$  zu niedrigeren Titern. Die Mutante hF<sub>T</sub>K77N ergab nur Titer von  $4 \cdot 10^4$  ffu, während im Fall der Mutante hF<sub>T</sub>K75N mit  $2 \cdot 10^2$



**Abbildung 5.10:** Titer der mit den hF<sub>T</sub>-Mutanten in MDCKII-Zellen erzeugten Pseudotypen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle wurde das Plasmid pcDNA3.1 transfiziert.

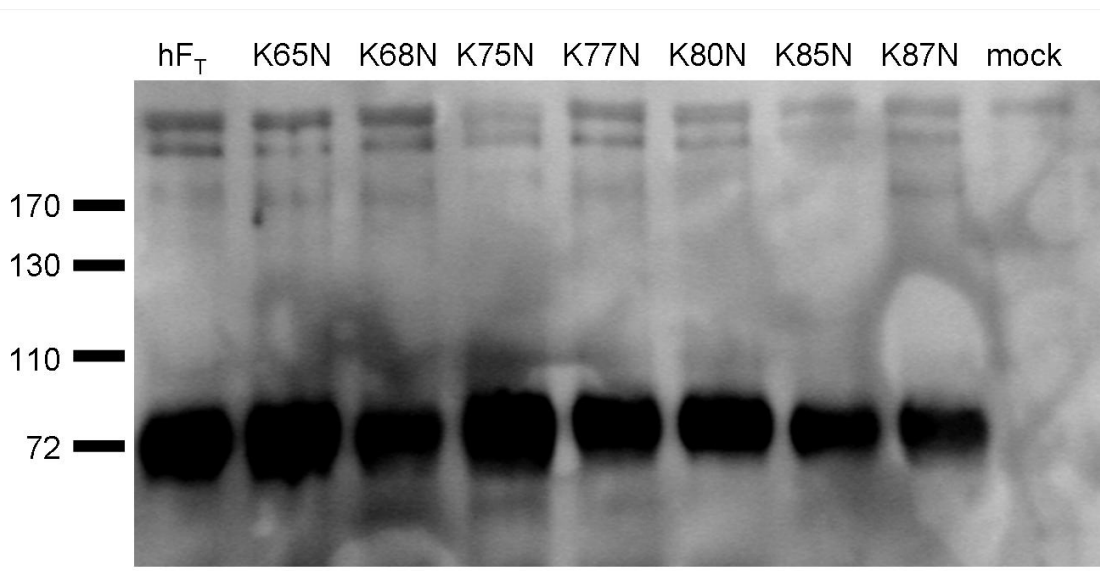
nur Titer, die kaum höher waren als die Negativkontrolle mit  $7 * 10^1$  ffu, nachweisbar waren.

Das Experiment beweist, dass die Mutationen in der basischen Domäne einen Einfluss auf die Infektiösität der Pseudotypen haben.

### 5.2.3 Oberflächenexpression der chimären HRSV/SeV-F-Mutanten

Während beide chimären Proteine  $hF_T$  und  $hF_{MT}$  an der Oberfläche transfizierter Zellen nachweisbar waren, ließen sich lediglich die Mutanten der Chimären  $hF_T$  in vergleichbaren Mengen auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Einführung der Mutationen K75N und K77N in die Chimäre  $hF_{MT}$  führte dazu, dass sich das Protein fast gar nicht an der Oberfläche nachweisen ließ, während die Mutationen K65N, K68N, K80N, K85N und K87N zu einer nachweisbaren, aber geringen Mengen F-Protein an der Zelloberfläche führten. Auch intrazellulär ließen sich alle Mutanten der Chimäre  $hF_{MT}$  nur in sehr geringen Mengen nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Faltung dieser Proteine gestört war, so dass sie wieder abgebaut wurden.

Um die Oberflächenexpression von Mutanten der Chimäre  $hF_T$  zu vergleichen, wurden konfluente BHK-21-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert, vierundzwanzig Stunden später biotinyliert, die F-Proteine immunopräzipitiert und im Western-Blot analysiert (**Abbil-**



**Abbildung 5.11:** Oberflächenexpression der  $hF_T$ -Mutanten im Western-Blot. Die Proben wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert.

**dung 5.11).**

Alle Proteine wurden in vergleichbaren Mengen expremiert. Die geringen Abweichungen sind vermutlich auf Schwankungen in der Transfektionseffizienz zurückzuführen.

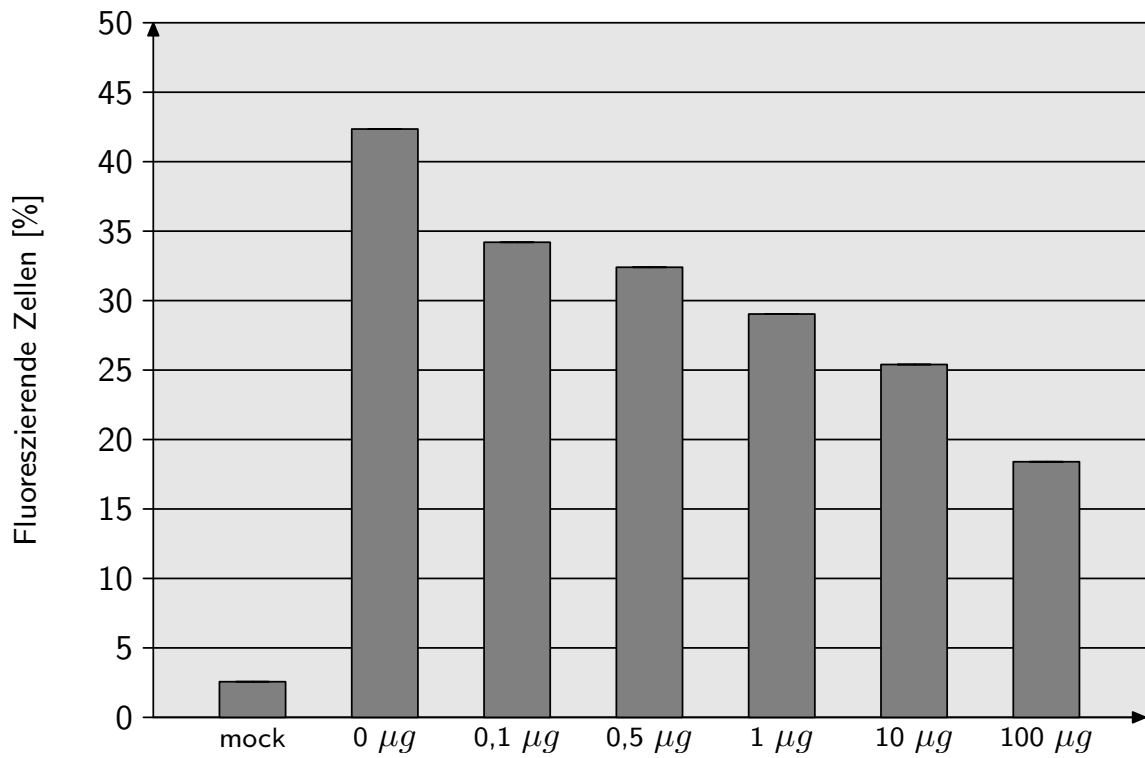
Darüber hinaus zeigt der Blot, dass alle Mutanten korrekt gespalten wurden. Eine fehlende Spaltung bei einem der Konstrukte hätte sich aufgrund der Glykosylierung des Pep27 durch eine höheren Masse des F-Proteins bemerkbar gemacht (vgl. hierzu die Bande des hF<sub>SANN</sub>-GFP-Proteins in **Abbildung 5.1**).

#### **5.2.4 Behandlung des chimären hF<sub>T</sub>-Proteins mit Trypsin**

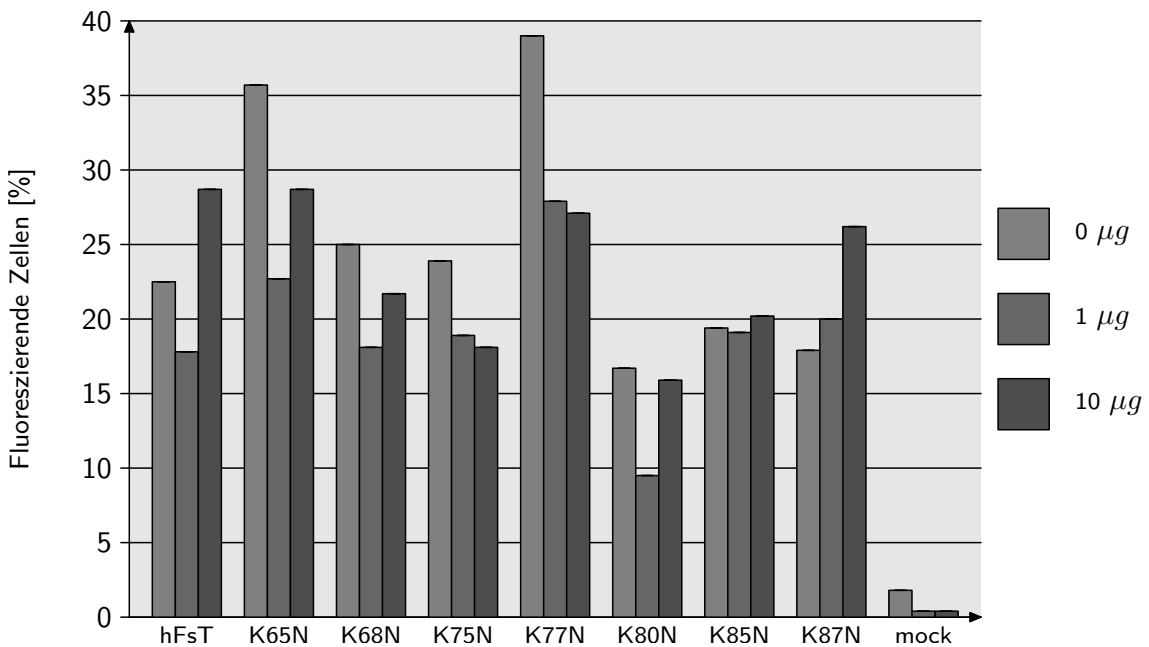
Eine mögliche Erklärung für einen Funktionsverlust eines Proteins stellt eine fehlerhafte Faltung dar. In vielen Fällen ist das fehlerhaft gefaltete Protein sehr empfindlich gegenüber einer Behandlung mit Proteasen. Um die Sensibilität von hF<sub>T</sub> gegenüber der Protease Trypsin zu untersuchen, wurden BHK-21-Zellen mit den Expressionsplasmiden transfiziert, vierundzwanzig Stunden später resuspendiert und für eine Stunde bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen Trypsin behandelt. Die Zellen wurden mit einem FITC-markierten polyklonalem F-Antikörper markiert und mittels Durchflusszytometrie der Prozentanteil der fluoreszierenden Zellen bestimmt (**Abbildung 5.12**).

Ohne Behandlung mit Trypsin expremierten etwa 42% der Zellen das F-Protein. Bei einer Trypsin-Menge von 0,1 µg sank dieser Anteil um 8% auf etwa 32%. Eine zehnfach so hohe Trypsinmenge ließ den Anteil der F-expremierenden Zellen nochmal um 5% sinken, eine hundertfache Trypsinmenge um 9% auf etwa 25% . Bei einer Trypsinmenge 100 µg betrug der Anteil der F-expremierenden Zellen 18%. Es konnte somit eine gewisse Empfindlichkeit, aber keine vollständige Zerstörung, wie erwartet, nachgewiesen werden (ZIMMER et al., 2001a).

Die Behandlung von BHK-21-Zellen, welche die verschiedenen hF<sub>T</sub>-Mutanten expremierten, mit 1 µg bzw. 10 µg Trypsin führte bei keiner Mutante zu einem auffällig geringen Anteil an F-expremierenden Zellen. Es traten zwar Schwankungen auf, jedoch nicht in Richtung niedrigerer Anteile (**Abbildung 5.13**).



**Abbildung 5.12:** Die Empfindlichkeit von hF<sub>T</sub> gegenüber Trypsin. Angegeben ist der prozentuale Anteil der F-exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation.



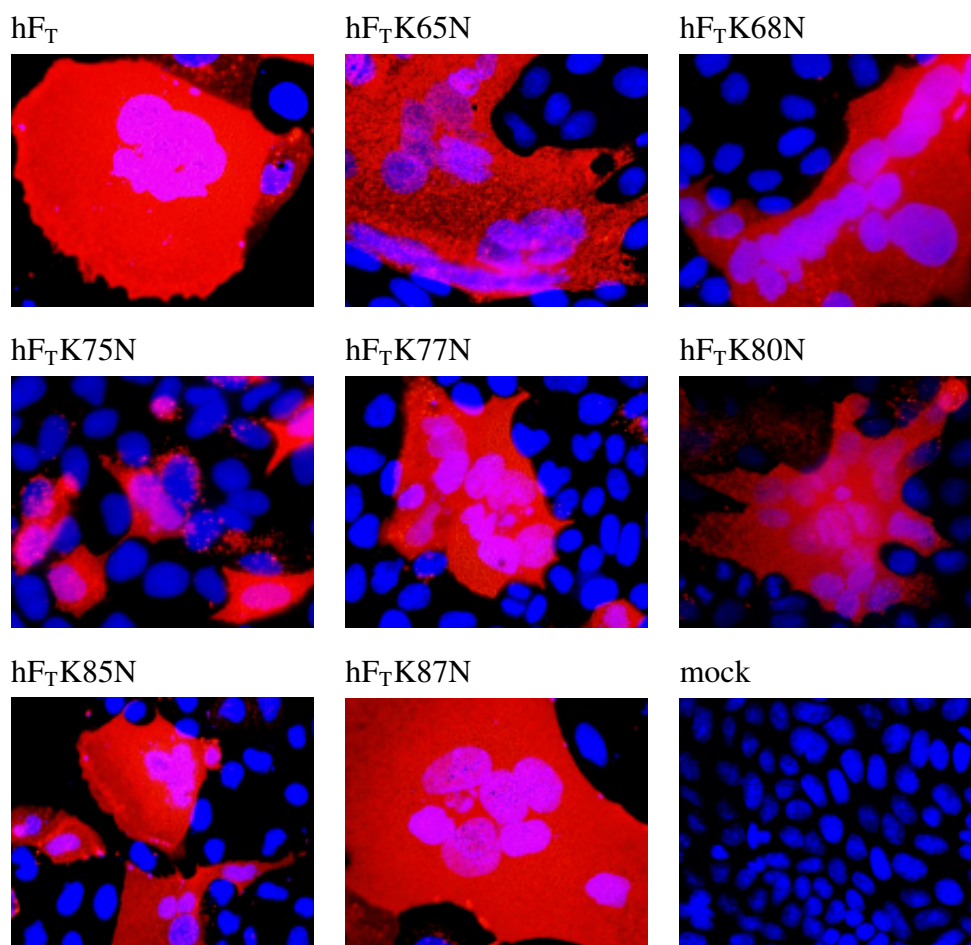
**Abbildung 5.13:** Der Einfluss einer einstündigen Trypsinbehandlung auf die Mutanten der Chimäre hF<sub>T</sub>. Angegeben ist der prozentuale Anteil der F-Expimierenden Zellen an der Gesamtpopulation.



### 5.2.5 Bildung von Synzytien durch die chimären HRSV/SeV-F-Mutanten

Ein Ausdruck der Fusionsaktivität des F-Proteins ist die Bildung von Synzytien in infizierten oder transfizierten Zellen. Um die Fähigkeit der Mutanten, Synzytien zu bilden, zu analysieren, wurden MDCK-Zellen bei der Aussaat mit den Plasmiden der chimären hF<sub>T</sub>-Mutanten transfiziert, achtundvierzig Stunden später fixiert und das F-Protein mittels Immunofluoreszenz nachgewiesen und die Zellkerne mit DAPI gefärbt (**Abbildung 5.14**).

Alle Mutanten außer der Mutante hF<sub>T</sub>K75N bildeten Synzytien.



**Abbildung 5.14:** Synzytien der mit chimären HRSV/SeV-F-Mutanten transfizierten MDCK-Zellen. Die hF<sub>T</sub>-Proteine sind rot gefärbt. Die Zellkerne sind blau dargestellt.

### 5.2.6 Einbau der chimären Mutanten in Viruspartikel

Eine mögliche Erklärung der geringeren Infektiosität einiger Pseudotypen könnte ein geringerer Einbau der F-Protein in die Viruspartikel sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Pseudotypen durch Ultrazentrifugation konzentriert und im Wester-Blot analysiert (**Abbildung 5.15**).

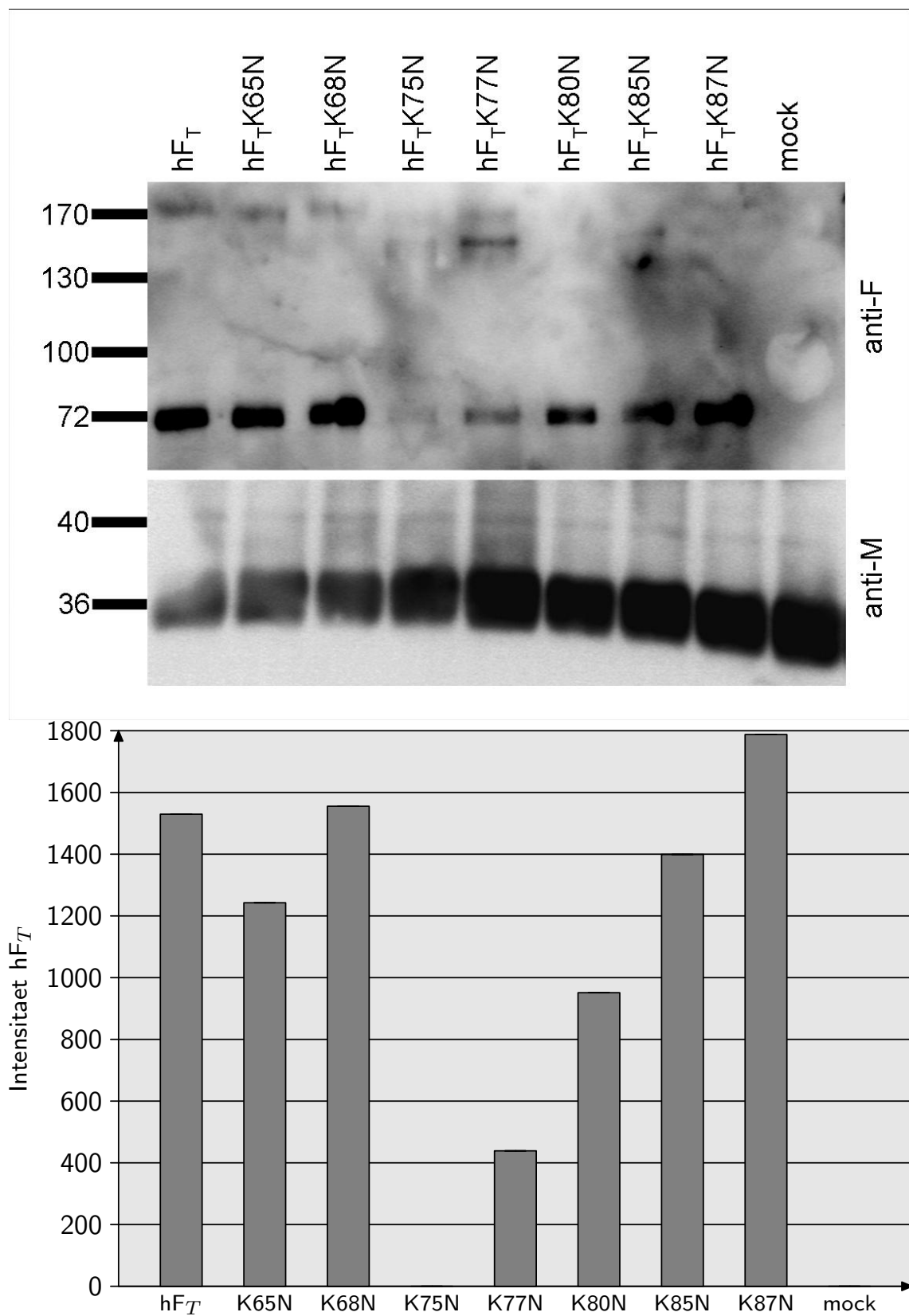
Die Mutanten hF<sub>T</sub>K65N, hF<sub>T</sub>K68N und hF<sub>T</sub>K87N fanden sich in etwa gleichen Mengen in den Pseudotypen wieder wie die Chimäre hF<sub>T</sub>. Ein geringerer Einbau hingegen wurde bei den Mutanten hF<sub>T</sub>K77N, hF<sub>T</sub>K80N und hF<sub>T</sub>K85N beobachtet. Die Mutante hF<sub>T</sub>K75N ist kaum in den Pseudotypen nachweisbar.

Der Vergleich mit den Virustitern zeigt, dass es im Fall der Mutanten hF<sub>T</sub>, hF<sub>T</sub>K65N, hF<sub>T</sub>K68N und hF<sub>T</sub>K87N eine grobe Übereinstimmung zwischen den Virustitern und den Mengen an nachweisbarem F-Protein in den Pseudotypen gab.

Die Mutanten hF<sub>T</sub>K85N erreichte einen geringeren Virustiter und wird etwas weniger in Viruspartikel eingebaut. Die Mutante hF<sub>T</sub>K80N erreichte zwar vergleichbare Virustiter, wurde jedoch in noch geringerer Mengen in Viruspartikel eingebaut. Die Mutante hF<sub>T</sub>K77N ist zwar nur schwach in Viruspartikeln nachweisbar, ergibt aber immer noch infektiöse Pseudotypen, während die Mutante hF<sub>T</sub>K75N kaum zu infektiösen Viruspartikeln führt und auch nur sehr schwach in diesen nachweisbar ist.

Die Analyse der SeV-M-Proteine zeigt, dass der geringere Einbau einiger Mutanten nicht auf eine geringere Anzahl an Partikeln zurückzuführen ist. Es finden sich ebenfalls Partikel in der Kontrolle, da das SeV-M-Protein die Bildung von virusähnlichen Partikeln bewirkt (TAKIMOTO et al., 2001).

Die Mutationen in der basischen Domäne haben also einen Einfluss auf den Einbau der F-Proteine in Viruspartikel.



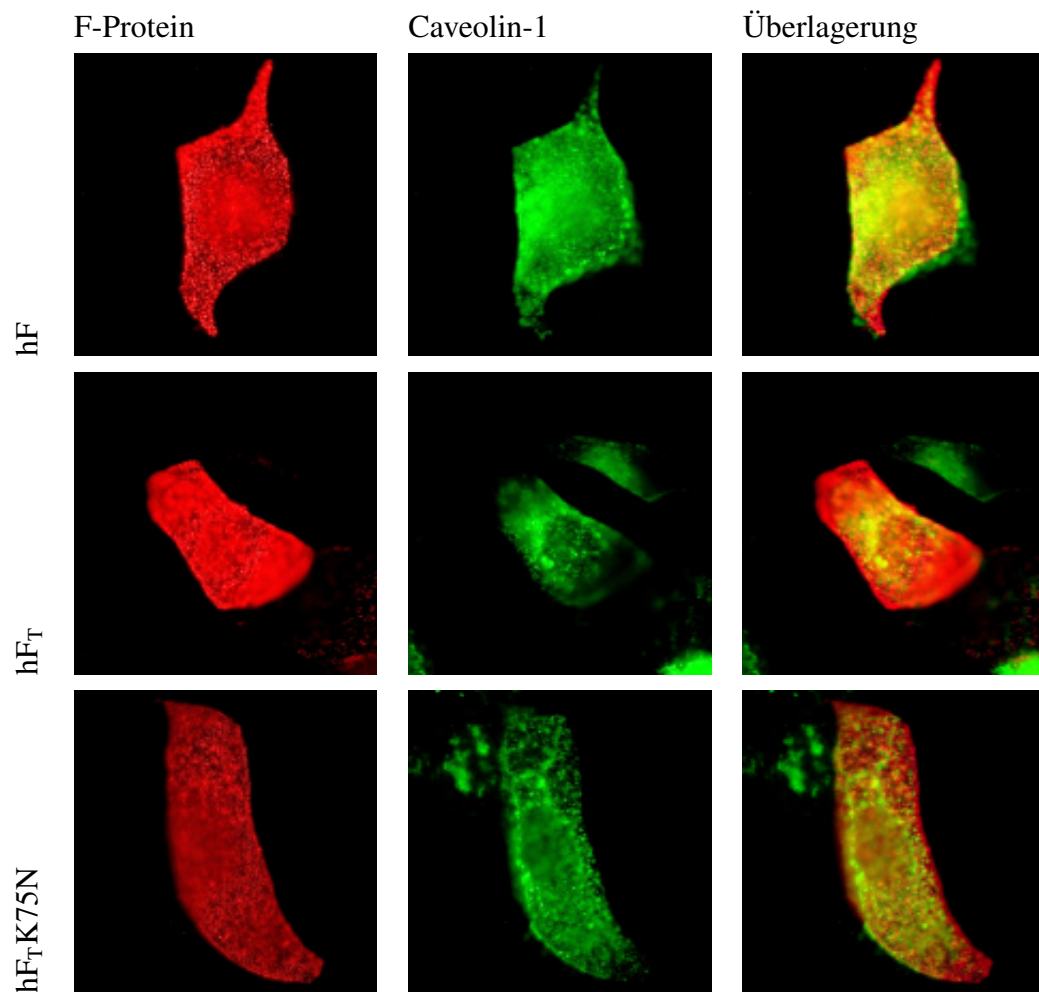
**Abbildung 5.15:** Analyse der pelletierten hF<sub>T</sub>-Pseudotypen im Western Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen. Die Blots zeigen die hF<sub>T</sub>-Mutanten bzw. die SeV-M-Proteine. Die Grafik darunter zeigt die Quantifizierung der hF<sub>T</sub>-Mutanten. Kontrolle und Hintergrund wurden von allen Proben abgezogen.

### 5.2.7 Kolokalisierung der hF<sub>T</sub>-Mutanten mit Caveolin

Sowohl der mangelhafte Einbau in Viruspartikel als auch der Verlust der Fusionsaktivität der Mutante hF<sub>T</sub>K75N könnte damit zusammenhängen, dass die Mutante nicht in den richtigen Domänen der Plasmamembran lokalisiert sind. Es wurde berichtet, dass das RSV-F-Protein in *Lipid rafts*, Mikrodomänen in der Plasmamembran, die insbesondere für die Signaltransduktion von Bedeutung sind, zu finden ist und mit Caveolin-1 kolokalisiert (McCURDY und GRAHAM, 2003).

Um zu überprüfen, ob die hF<sub>T</sub>K75N-Mutante auch diese Lokalisation aufweist, wurden MDCK-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit je 1 µg pcDNA3.1-hF, pcDNA3.1-hF<sub>T</sub> bzw. pcDNA3.1-hF<sub>T</sub>K75N und zusätzlich mit 1 µg pEGFPC1-Caveolin-1 transfiziert. Nach vierundzwanzig Stunden wurden die Zellen zwei Stunden bei 4°C mit α-RSV-F inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine halbe Stunde mit warmem Medium bei 37°C inkubiert, fixiert und noch einmal mit α-Maus-Cy3 gefärbt. Die Immunofluoreszenzen wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet (**Abbildung 5.16**).

Obwohl alle drei F-Proteine und Caveolin-1-GFP gut expremiert wurden, konnte keine Kolokalisation nachgewiesen werden. Dies galt jedoch nicht nur für die Mutanten hF<sub>T</sub>K75N, sondern auch für die Chimäre hF<sub>T</sub> und das unmodifizierte HRSV-F-Protein. Zwar bildet das F-Protein bei allen drei Proteinen typische Cluster auf der Oberfläche und schien sich in distinkten Domänen anzuordnen. Diese entsprachen jedoch nicht der Lokalisation des Caveolin-1-GFP.



**Abbildung 5.16:** Lokalisation des F-Proteins und des Caveolin-1. Das F-Protein ist rot dargestellt, Caveolin-1 grün.



## 6. Diskussion

### 6.1 Regulation der Fusionsaktivität des F-Proteins und F-induzierte Apoptose

Die Fusion des Viruspartikels mit der Plasmamembran ist ein Schlüsselprozess für die Infektion der Zelle mit einem Virus. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, wie dieser Eintritt erfolgen kann. Einige Viren wie das Influenza A-Virus treten über Endosomen in ihre Wirtszellen ein. Dabei ist die Ansäuerung des Endosoms für die Aktivierung des Fusionsproteins und damit für die Induzierung der Verschmelzung des Viruspartikels mit der Endosomenmembran verantwortlich (HELENIUS, 2007).

Andere Viren, wie die Paramyxoviren, fusionieren direkt mit der Plasmamembran. Die Aktivierung des Fusionsprotein ist bei ihnen nicht pH-abhängig. Statt dessen ist eine Interaktion mit der Plasmamembran, oftmals mit einem spezifischen Rezeptor, notwendig.

Bei den Paramyxoviren erfolgt die Aktivierung des Fusionsproteins über die Spaltung eines Vorläuferproteins. Diese kann auf der Oberfläche der Zellen wie im Fall des SeV-F-Proteins (TASHIRO et al., 1992) oder intrazellulär wie im Fall des RSV-F-Proteins erfolgen. Beim RSV-F-Protein liegt eine besondere Situation vor. Während alle anderen Paramyxoviren, einschließlich des eng verwandten murinen Pneumovirus, an einer einzigen Position gespalten werden, erfolgt die Spaltung beim RSV-F-Protein an zwei Positionen (ZIMMER et al., 2001a). Veröffentlichungen der letzten Jahren gaben Hinweise darauf, dass die dazwischenliegenden 27 Aminosäuren einen regulatorischen Effekt auf die Fusionsaktivität des F-Proteins haben (KÖNIG et al., 2004; GONZÁLEZ-REYES et al., 2001; ZIMMER et al., 2002).

Um die Fusionsaktivität zu messen, wurden zwei Verfahren angewandt. Es wurde erstens das

Ausmaß der Synzytienbildung bestimmt, und zweitens die Heterologe Zellfusion mit R18-markierten BHK-21-Zellen. Obwohl die Quantifizierung im ersten Assay nur ungefähr möglich war, zeigt sich dennoch, dass für die Synzytienbildung und für den Lipid-Transfer unterschiedliche Voraussetzungen gelten. Zum einen handelt es sich bei der Messung der Synzytienbildung um eine Fusion zwischen Zellen desselben Zelltyps. Die Interaktion der Zellen miteinander könnte daher intensiver sein als bei der Heterologen Zellfusion. Mehr noch, die miteinander fusionierenden Zellen exprimieren im Idealfall alle das F-Protein. Die Fusion sollte daher im ersten Assay erleichtert und schneller nachweisbar sein als bei der heterologen Zellfusion.

Es muss jedoch noch berücksichtigt werden, dass es sich bei MDCK-Zellen um polare Zellen handelt. Werden die Zellen im Monolayer bis zur Konfluenz kultiviert und dann induziert, schreitet die Synzytienbildung nur langsam voran, da das F-Protein vornehmlich apikal exprimiert wird (ROBERTS et al., 1995; BROCK et al., 2005) und daher kaum in Kontakt mit benachbarten Zellen kommt. Erst der teilweise oder vollständige Verlust des polaren Charakters ermöglicht dann das schnellere Wachstum des betreffenden Synzytiums.

Besteht die Zellkultur jedoch aus MDCK- und BHK-21-Zellen, so kann sich zumindest an den Stellen, an denen MDCK- und BHK-21-Zellen unmittelbar nebeneinander wachsen, keine vollständig polare Expression des F-Proteins herausbilden. Die Synzytienbildung ist daher zwar dadurch verlangsamt, dass nicht mehr alle miteinander fusionierenden Zellen das F-Protein exprimieren, kann aber auch zu einem späteren Zeitpunkt und langsamer vonstatten gehen, da das F-Protein auch dann noch im höheren Maß in direkten Kontakt mit der Zellmembran der Nachbarzelle kommen kann.

### **6.1.1 Regulation der Fusionsaktivität über Pep27**

#### **Einfluss der Mutationen in den Spaltungsstellen**

Um die Bedeutung der Spaltung an der Position 109 für die Fusionsaktivität zu klären, war die Sequenz der Mutante hF<sub>SANN</sub> so verändert worden, dass die Spaltungsstelle RARR am N-Terminus des Pep27 nicht mehr für Furin erkennbar war und deshalb nicht mehr gespalten wurde (siehe 5.1.2). Frühere Arbeiten zeigten, dass die Spaltung an den Position 109 und 136 unabhängig voneinander erfolgt, und eine unterbleibende Spaltung an der Position 109 nicht



zur Bildung von Synzytien führt (GONZÁLEZ-REYES et al., 2001; ZIMMER et al., 2001a, 2002).

Die hier verwendete Mutante hF<sub>SANN</sub> zeigte eine verzögerte und reduzierte Fusionsaktivität, jedoch keinen vollständigen Verlust. Die herabgesetzte Fusionsaktivität ließe sich durch eine sterische Hinderung aufgrund der verlängerten F<sub>2</sub>-Untereinheit handeln, welche die Wechselwirkung des F-Proteins mit seinem Rezeptor stört, und somit die Fusionsaktivität herabsetzt. Ebenfalls denkbar ist, dass die Verlängerung der F<sub>2</sub>-Untereinheit die Konformation des F-Proteins verändert hat. Es ist jedoch auch möglich, dass durch die verlängerte F<sub>2</sub>-Untereinheit die Wechselwirkung mit Proteinen, die sich in der gleichen Lipidmembran wie das F-Proteinen befinden, behindert wird. So ist zum Beispiel nachgewiesen, dass eine Inhibition der Interaktion des F-Proteins mit RhoA die Fusionsaktivität stark herabsetzt (PASTEY et al., 1999; GOWER et al., 2001; McCURDY und GRAHAM, 2003; GOWER et al., 2005).

Die Mutanten hF<sub>KGR</sub> und hF<sub>RR</sub>, in denen die Spaltungsstelle am C-terminalen Ende des Pep27 mutiert worden war, wurden im Unterschied zu allen anderen Mutanten nicht korrekt exprimiert. Diese Mutationen beeinträchtigen vermutlich die Proteinfaltung in einem solchen Ausmaß, dass die synthetisierten Proteine wieder abgebaut wurden. Es lässt sich daraus folgern, dass eine korrekte Spaltung der C-terminalen Spaltungsstelle des Pep27 für die korrekte Faltung und Expression des F-Proteins erforderlich ist.

### **Einfluss der Glykosylierung des Pep27**

Die Glykosylierungsmutante hF<sub>N126Q</sub> wies eine leicht verzögerte und reduzierte Fusionsaktivität auf. Für das BRSV-F-Protein konnte früher gezeigt werden, dass eine solche Mutante in rekombinanten Viren zu einem beschleunigten Wachstum führte. Ebenso konnte gezeigt werden, dass diese Viren zwar genauso große Synzytien bildeten wie das Elternvirus, jedoch in einem Fusionsassay eine um 30% verringerte Fusionsaktivität aufwiesen (LOREK, 2004). Letztere Ergebnisse stimmen tendenziell mit den hier gemachten Beobachtungen überein. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das BRSV-F-Protein nur eine einzige Glykosylierungsstelle im Pep27 aufweist, während es im humanen Pep27 drei konservierte Positionen gibt, von denen jedoch nur die beiden äußeren verwendet werden (ZIMMER et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen berichteten ZIMMER et al. (2001b) eine um 65% erhöhte Fusionsaktivität durch die Mutation N126Q in transienter Expression. Diese Diskrepanz in

den Ergebnissen könnte möglicherweise durch die unterschiedlichen Zelltypen – BSR-T7- bzw. MDCK-Zellen – verursacht worden sein.

Der Einfluss einer fehlenden Glykosylierungsstelle auf das ungespaltene F-Protein lässt sich nur schwer ermitteln, solange keine Strukturdaten für das ungespaltene und das reife F-Protein vorliegen. Es ist jedoch denkbar, dass die fehlende Glykosylierung eine sterische Hinderung für das Furin aufhebt, und die Spaltung am C-Terminus des Pep27 so beschleunigt und erleichtert wird. Für das Hämagglutinin-Protein des Influenza A Virus konnte gezeigt werden, dass eine Glykosylierung die Spaltung des Proteins durch Furin modulieren kann (KAWAOKA und WEBSTER, 1989; KAWAOKA, 1991; DANIELS et al., 2003). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch beim RSV-F-Protein eine Rolle spielen.

### **Einfluss der Länge des Pep27 auf die Fusionsaktivität**

Ein ähnlicher Effekt sollte auf der N-terminalen Seite des Pep27 erzeugt werden, indem das Pep27 durch eine 3-fache-Flag- bzw. Strep-Sequenz verlängert wurde. Die Mutanten  $hF_{\text{Flag-pep}}$  und  $hF_{\text{Strep-pep}}$  wiesen nur noch eine sehr geringe und verzögerte Fusionsaktivität auf. Demgegenüber zeigte die chimäre Mutante  $bF_{\text{Strep-hpep}}$  nur eine vergleichsweise leicht reduzierte Fusionsaktivität.

Die gegenteilige Wirkung, eine sterische Behinderung durch eine näher herangerückte Glykosylierungsstelle, sollte in der Mutante  $hF_{\text{pep-5}}$  durch die Verkürzung des Pep27 um fünf Aminosäuren bewirkt werden. Die fünf deletierten Aminosäuren befanden sich in dem Pep27 unmittelbar hinter der Furinerkennungssequenz RARR. Der Abstand von der Furinerkennungssequenz zur nächsten Glykosylierungsstelle betrug damit nur noch eine Aminosäure. Dennoch trat keine erkennbare sterische Hinderung der Spaltung auf. Das Pep27 wird nach wie vor abgespalten (siehe **Abbildung 5.1**). Seine Fusionsaktivität ist jedoch herabgesetzt.

Obwohl Spaltung und Oberflächentransport dieser Mutanten nicht beeinträchtigt schien, wirkte sich die Sequenz des Pep27 eindeutig auf die Fusionsaktivität der Mutanten auf. Ähnliche Beobachtungen waren bereits mit dem BRSV-F-Protein gemacht worden. KÖNIG et al. (2004) demonstrierten, dass im BRSV-F-Protein ein Austausch des Pep27 gegen andere, längere Sequenzen zu einer Einstellung der Synzytienbildung führte. Die Deletion des Pep27 sowie der Austausch des Pep27 gegen eine andere Sequenz gleicher Länge führte zur signifikanten Re-

duktion der Synzytienbildung. Auch ZIMMER et al. (2002) berichteten die Reduktion der Synzytienbildung durch Deletion des Pep27.

Es kann daraus gefolgert werden, dass sowohl die Länge des Pep27 als auch seine Sequenz einen entscheidenden Einfluss auf die Fusionsaktivität des F-Proteins haben.

### **Fusionsaktivität der chimären F-Protein-Mutanten**

Die Chimären  $hF_{\text{bpep}}$  und  $bF_{\text{hF2+pep}}$  weisen verminderte Fusionsaktivitäten auf. Im Vergleich dazu war die Chimäre  $bF_{\text{Strep-hpep}}$  wie oben beschrieben nur leicht beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass die Fusionsaktivität durch das Pep27 bei BRSV und HRSV unterschiedlich reguliert wird. Es ist auffällig, dass die  $F_1$ -Untereinheit von HRSV und BRSV in den 50 Aminosäuren 137-186 nur in drei Positionen Austausch aufweist, während die  $F_2$ -Untereinheit in den 50 Aminosäuren vor der Spaltungsstelle 19 Austausch aufweist. Diese Austausche könnten einen Einfluss auf die Spaltung des F-Proteins und damit auf die Fusionsaktivität des F-Proteins haben. Eine schrittweise Mutation dieser Aminosäuren könnte weitere Aufschlüsse darüber bringen, wie Spaltung und Fusionsaktivität der RSV-F-Proteine reguliert werden.

### **Mögliche Funktionsweise der Regulation der Fusionsaktivität über das Pep27**

Sicherlich sind leichte Schwankungen in der Fusionsaktivität, gemessen durch die Synzytienbildung und den Lipid-Transfer-Assay, auf Schwankungen in den Mengen der exprimierten F-Proteine zurückzuführen. Es ist ohne weitgehende Automatisierung der Herstellung dieser Zelllinien und des Screening der Expressionen unmöglich, zwölf transgene Zelllinien mit identischen Expressionspegeln herzustellen, die diese zudem noch nach mehrmaligem Umsetzen behalten. Auch dürften unterschiedliche Zellzyklen zu Schwankungen in der Expression geführt haben. Dennoch sind einige Ergebnisse festzuhalten. Mit Ausnahme der Mutante  $hF_{\text{SANN}}$  weisen alle Mutanten eine korrekte Spaltung auf. Sie zeigen im Westernblot das gleiche Molekulargewicht. Dieses Verfahren ist jedoch nicht dazu geeignet, festzustellen, ob die Spaltung nicht um ein paar Aminosäuren verschoben an einer anderen Stelle erfolgte. Besonders drastisch wäre dies im Fall der hinteren Spaltungsstelle, da sie an das Fusionspeptid grenzt. In diesem Fall wäre entweder das Fusionspeptid um eine oder mehrere Aminosäuren verlängert worden, was die Fusionsaktivität drastisch senken würde, oder die Spaltung möglicherweise im

Fusionspeptid erfolgte, so dass ein Phänotyp, wie ihn die Mutante hF<sub>fus-3</sub> aufweist, die Folge wäre.

Möglich ist dies vor allem bei den chimären Mutanten und der Glykosylierungsmutante, da nur hier Mutationen in der Nähe des Fusionspeptids erfolgten. Über die chimären Mutanten ist es schwer, eine eindeutige Aussage zu treffen. Das F-Protein von HRSV und BRSV scheint unterschiedlich reguliert zu sein, was nicht nur die vollkommen unterschiedlichen Sequenzen der Pep27 untereinander nahelegen, sondern auch die Tatsache, dass das eine drei, das andere aber nur eine Glykosylierungsstelle im Pep27 aufweist. Die Glykosylierungsmutante hF<sub>N126Q</sub> hingegen weist eine so ausgeprägte Synzytienbildung aus, dass eine fehlerhafte Spaltung im oder vor dem Fusionspeptid eher unwahrscheinlich erscheint. Möglicherweise wird auch die fehlende Glykosylierung an der Position 126 ausgeglichen, indem Asparagin<sup>120</sup> glykosyliert wird, oder aber die Glykosylierung an der Position 116 kann den Effekt der fehlenden Glykosylierung an der Position 126 zumindest teilweise ausgleichen.

Eine fehlerhafte Spaltung an der ersten Spaltungsstelle (hinter Arginin<sup>109</sup>) scheint auf den ersten Blick viel wahrscheinlicher. Es ist bekannt, dass eine Deletion der Aminosäuren 106 bis 130 in rekombinanten BRSV zwar zu infektiösen Viren jedoch nicht zur Ausbildung von Synzytien in den infizierten Zellen führt, und dass eine unvollständige Mutation der vorderen Spaltungsstelle in Anwesenheit von Trypsin zwar zur Spaltung des F-Proteins, aber nur zu einer verminderten Synzytienbildung führt. ZIMMER et al. (2002) schlossen daraus, dass das C-terminale Ende der F<sub>2</sub>-Untereinheit – möglicherweise durch eine sterische Hinderung – einen Einfluss auf die Fusionsaktivität hat. Die Verkürzung oder Verlängerung der N-terminalen Seite in den Mutanten hF<sub>pep-5</sub>, hF<sub>Strep-pep</sub> und hF<sub>Flag-pep</sub> könnte möglicherweise eine andere Spaltstelle eingefügt haben, so dass die Spaltung nicht an der Position 109 sondern ein paar Aminosäuren weiter stromauf- oder stromabwärts durch eine andere Protease erfolgte. Dies würde den Phänotyp dieser Mutanten erklären.

Eine andere, spekulative Erklärung, die all diese Faktoren berücksichtigt und erklären würde, wäre, dass das HRSV-F-Protein vor der Spaltung eine bestimmte Konformation einnimmt, aus der durch die Spaltung dann eine weitere Konformation hervorgeht, die nur auf diese Weise erlangt werden kann. Große Abweichungen, wie sie durch eine fehlende Glykosylierung, einen Austausch der Sequenz zwischen den Spaltstellen oder eine größere Veränderung des Pep27 durch Deletion oder Insertion von Sequenzen eingeführt werden, würden das F<sub>0</sub>-Protein daran

hindern, seine eigentlich Konformation einzunehmen und damit auch nach der Spaltung die richtige Konformation einzunehmen.

Um die Frage zu klären, welche dieser Hypothesen richtig ist, müssten die Mutanten gereinigt und das C-terminale Ende der F<sub>2</sub>-Untereinheit und das N-terminale Ende der F<sub>1</sub>-Untereinheiten sequenziert werden. Damit könnte geklärt werden, ob die Spaltung in den mutierten Proteinen an den Positionen 109 und 136 erfolgt.

Desweiteren wäre es zur genaueren Analyse des Einflusses der Mutationen sinnvoll, Zeitkinetiken der Expression des F-Proteins nach Induktion zu erstellen, um eventuelle Verzögerungen oder Beschleunigungen in der Expression und dem Oberflächentransport der Mutanten ermitteln zu können. Um die Fusionsaktivität weiter zu charakterisieren, wäre auch das im zweiten Teil der Arbeit beschriebene SeV-Pseudotyp-System geeignet, da es eine vergleichsweise schnelle Analyse der Mutanten im Hinblick auf ihre Fähigkeit, infektiöse Partikel zu bilden erlaubt.

### 6.1.2 Induktion der Apoptose durch das F-Protein

Es ist seit längerem bekannt, dass eine Infektion mit RSV in den betroffenen Zellen Apoptose induziert (KOTELKIN et al., 2003). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass das RSV-F-Protein in Zellen, in denen es expremiert wird, Apoptose induziert (ECKARDT-MICHEL, 2007). Ein ähnliches Phänomen wurde schon früher beim *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) entdeckt. Der Envelope-Glykoproteinkomplex (Env) des HIV – bestehend aus einem Trimer von gp120/gp41-Heterodimeren – vermittelt die Fusion mit und den Eintritt in die Wirtszelle (POIGNARD et al., 2001). Die Einzelexpression des Env-Komplexes auf Zellen führt sowohl zur Bildung von Synzytien als auch zur Induktion von Apoptose (SODROSKI et al., 1986; FERRI et al., 2000; PERFETTINI et al., 2005).

Für den Mechanismus der Induktion der Apoptose durch das F-Protein gibt es drei Hypothesen: Die Induzierung der Apoptose kann eine Folge der Fusionsaktivität des F-Proteins sein. So kann das F-Protein die Fusion mehrerer Zellen miteinander bewirken, und im Synzytium wird die Apoptose eingeleitet, sobald Konflikte im Zellzyklus zwischen den Zellkernen der Tochterzellen auftreten (ZHIVOTOVSKY und KROEMER, 2004; PERFETTINI et al., 2005). Zweitens kann die Apoptose durch die Interaktion des F-Proteins mit anderen, zellulären Proteinen innerhalb der

Zelle oder an ihrer Oberfläche verursacht werden. Eine dritte Möglichkeit ist die Induzierung der Apoptose durch ER-Stress (HE, 2006). Da die Proteine jedoch korrekt prozessiert und an die Oberfläche transportiert werden, erscheint diese Hypothese zumindest bei dem hier verwendeten Expressionssystem von geringer Wahrscheinlichkeit.

In dieser Arbeit gelang der Nachweise der Induktion der Apoptose durch Messung der Caspase-3/7-Aktivität. MDCK-Zellen, die nach Induktion mit Mifepreston das HRSV- oder BRSV-F-Protein expremierten, zeigten einen deutlichen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivitäten bis hin zum 19-fachen der Aktivitäten in den nicht induzierten Zellen.

### **Die Induzierung der Apoptose erfolgt nur durch das membrangebundene HRSV-F-Protein**

Das lösliche F-Protein führte nicht zu einer erhöhten Caspase-3/7-Aktivität. Dies war keine Überraschung. Hätte es die Apoptose induziert, so wäre es nicht möglich gewesen, eine Zelllinie zu erzeugen, die das lösliche F-Protein permanent expremiert. Zur Induzierung der Apoptose muss das HRSV-F-Protein demnach als membrangebundene Form vorliegen.

**Abbildung 5.2** zeigt, dass auch das lösliche F-Protein in üblicher Weise prozessiert wird. Dies stimmt mit den Beobachtungen von MARTÍN et al. (2006) überein. Da dies ebenfalls eine Prozessierung des Pep27 in gewohnter Weise nahelegt, scheidet damit auch eine Induktion der Apoptose durch das humane Pep27 aus. SCHLENDER et al. (2002) beschrieben eine Inhibition der mitogen-induzierten Apoptose durch zellgebundenes RSV-F-Protein. Es wäre interessant, zu überprüfen, ob dieser Effekt auch durch Kontakt mit dem löslichen F-Protein ausgelöst wird.

### **Die Fusionsaktivität des RSV-F-Proteins bewirkt die Induzierung von Apoptose**

MARTÍN et al. (2006) beschrieben eine Reihe von Punktmutationen und eine Deletion im Fusionspeptid des F-Proteins, welche die Bildung von Synzytien verhinderten. Darunter war auch die Mutante hF<sub>L141N</sub>. Transgene Zellen, die diese Mutante expremierten, bildeten erst 96 Stunden nach der Induktion Synzytien aus. In der heterologen Zellfusion zeigten erst nach drei Tagen einige wenige Zellen eine geringe Fusionsaktivität. Die Fusionsaktivität dieser Mutante schien daher stark herabgesetzt, aber nicht vollständig aufgehoben zu sein. Ebenfalls reduziert war die Caspase-3-Aktivität und damit die Induktion von Apoptose in diesen Zellen, verglichen mit den

Zellen, die das unmodifizierte HSRV-F-Protein exprimierten.

Die Verkürzung des Fusionspeptids um drei Aminosäuren hatte einen vollständigen Verlust der Synzytienbildung zur Folge; auch in der heterologen Zellfusion konnte keine Fusion nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Fusionsaktivität der Mutant  $hF_{\text{fus-3}}$  vollkommen zerstört worden ist, obwohl Oberflächentransport und Spaltung nicht gestört waren. Apoptose konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass zwischen der Fusionsaktivität des F-Proteins und der durch das F-Protein induzierten Apoptose ein Zusammenhang besteht.

Dieses Schlussfolgerung wird durch die Mutante  $hF_{\text{Strep-pep, fus-3}}$ , die weder über Fusionsaktivität noch über Caspase-3/7-Aktivität verfügte, und durch die Mutanten  $hF_{\text{pep-5}}$ ,  $hF_{\text{Strep-pep}}$  und  $hF_{\text{bpep}}$ , welche verringerte bzw. verzögerte Fusionsaktivitäten und Caspase-3/7-Aktivitäten aufwiesen, gestützt. Auch die nur leicht verringerten Fusionsaktivitäten der Mutanten  $hF_{\text{N126Q}}$  und  $bF_{\text{hF2+pep}}$  schlugen sich in nur leicht verringerten Caspase-3/7-Aktivitäten nieder.

Im Gegensatz dazu verfügten die Mutanten  $hF_{\text{L141N}}$ ,  $hF_{\text{Flag-pep}}$  und insbesondere  $hF_{\text{SANN}}$  zwar über eine stark verringerte oder verzögerte Fusionsaktivität, jedoch über vergleichsweise hohe Caspase-3/7-Aktivitäten. Dies deutet darauf hin, dass die Fusionsaktivität zwar ein wichtiger, aber nicht der einzige Faktor bei der Induzierung der Apoptose ist. Auch für HIV ist beschrieben, dass zusätzlich zur oben beschriebenen Induzierung der Apoptose über die Fusionsaktivität auch die Induktion von Apoptose in benachbarten Zellen durch Env-vermittelten Austausch von Lipiden möglich ist (PERFETTINI et al., 2005; GARG und BLUMENTHAL, 2006; GARG et al., 2007). Ein solcher Mechanismus wäre auch für die Mutanten  $hF_{\text{L141N}}$ ,  $hF_{\text{Flag-pep}}$  und  $hF_{\text{SANN}}$  denkbar. Um dies zu überprüfen, wäre es nötig, den in dieser Arbeit verwendeten Assay zur Detektion der heterologen Zellfusion weiter zu entwickeln und sensitiver zu machen, so dass damit auch eine Hemi-Fusion nachgewiesen werden kann.

Im Unterschied zu allen anderen Mutanten weist die Mutante  $bF_{\text{Strep-hpep}}$  zwar eine hohe Fusionsaktivität auf, die Induktion der Apoptose fällt aber vergleichsweise gering aus. Eine Erklärung wäre, dass in diesem Klon der durch das F-Protein zur Induktion der Apoptose genutzte Stoffwechselweg beschädigt ist. Dies könnte untersucht werden, indem die Expression und Induzierbarkeit anderer an der Apoptose beteiligter Proteine, wie z.B. p53, überprüft würden.

### **NF<sub>κ</sub>B-Translokation und Caspase-3/7-Aktivierung**

Ein weiterer untersuchter Parameter war die Translokation von NF<sub>κ</sub>B nach vierundzwanzig Stunden. NF<sub>κ</sub>B ist ein Transkriptionsfaktor, der in den letzten Jahren ebenfalls in Zusammenhang mit der viralen Induktion von Apoptose gebracht wurde. So konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Simianvirus 5 (SV5), dem das Gen für das SH-Protein fehlt, über die Aktivierung und Translokation von NF<sub>κ</sub>B Apoptose induziert (LIN et al., 2003). Auch bei der durch den Env-Komplex des HIV induzierten Apoptose ist die Translokation von NF<sub>κ</sub>B ein wichtiger Faktor (PERFETTINI et al., 2004, 2005). Es ist weiter bekannt, dass NF<sub>κ</sub>B auch bei Infektionen mit RSV aktiviert wird und vom Zytoplasma in den Zellkern wandert (LINDEMANS et al., 2006; GROSKREUTZ et al., 2006; BITKO et al., 2004; CHOUDHARY et al., 2005).

Die Translokation von NF<sub>κ</sub>B 24 Stunden nach Induktion der F-Protein-Expression war nicht nur in den Zellen, die das HRSV-F-Protein und das BRSV-F-Protein expremierten nachzuweisen, sondern auch in den Zellen, welche die Mutanen hF<sub>L141N</sub>, hF<sub>SANN</sub>, hF<sub>N126Q</sub>, hF<sub>bpep</sub> und hF<sub>bF2+pep</sub> expremierten. Demgegenüber wurde die NF<sub>κ</sub>B-Translokation durch die Mutanten hF<sub>fus-3</sub>, hF<sub>pep-5</sub>, hF<sub>Flag-pep</sub>, hF<sub>Strep-pep</sub>, hF<sub>Strep-pep, fus-3</sub> und bF<sub>Strep-hpep</sub> nicht ausgelöst. Mit Ausnahme der Mutante hF<sub>bpep</sub>, welche zwar eine Translokation von NF<sub>κ</sub>B, jedoch keine Caspase-3/7-Aktivierung aufwies, korrelieren damit die Induktion der Apoptose und der Translokation von NF<sub>κ</sub>B. Es ist daher möglich, dass das HRSV-F-Protein Apoptose durch Aktivierung der Caspase-3 wie auch durch Translokation von NF<sub>κ</sub>B induziert. Es könnte aber auch sein, dass die Aktivierung von NF<sub>κ</sub>B eine Begleiterscheinung der Apoptose ist. Dies ließe sich durch Ausschalten von NF<sub>κ</sub>B, beispielsweise durch eine dominant negative Mutante, klären.



## 6.2 Bedeutung der basischen Domäne K<sup>65</sup>-K<sup>87</sup> für die Funktionalität des HRSV-F-Proteins

Der Königsweg zur Charakterisierung von Mutanten viraler Glykoproteine ist die Herstellung und Analyse rekombinanter Viren. Die reverse Genetik von HRSV und BRSV ist jedoch langwierig, aufwendig und anfällig für Fehler (COLLINS et al., 1995; BUCHHOLZ et al., 1999). Dies führt dazu, dass es im Fall von für die Virusreplikation essentiellen Proteinen nicht möglich ist, zwischen Fällen zu unterscheiden, in denen die Mutationen fatal für die Funktion des Proteins, und solchen, in denen die reverse Genetik aus anderen Gründen nicht zu infektiösen Viren führte.

Es ist bekannt, dass die zytoplasmatische Domäne von Glykoproteinen von Negativstrang-RNA-Viren eine wichtige Rolle beim Budding und in Bezug auf die Infektiösität der gebildeten Viruspartikel spielt (JIN et al., 1997; SPIELHOFER et al., 1998; ZHANG et al., 2000; CHEN et al., 2005). Eine Interaktion des zytoplasmatischen Abschnitts des Glykoproteins mit anderen Virusbestandteilen ist in vielen Fällen für den Einbau des Glykoproteins notwendig oder zumindest förderlich (MEBATION et al., 1997; TAKIMOTO et al., 1998; ZHOU et al., 1998; OVERBY et al., 2007), während in anderen Fällen das Glykoprotein auch ohne Modifikation effektiv in die Viruspartikel eingebaut wird (KAHN et al., 1999; KLENK und ROBERTS, 2002). ZIMMER et al. (2005) demonstrierten anhand rekombinanter Sendaiviren, dass chimäre HRSV-F-Proteine, deren zytoplasmatische Domäne gegen die entsprechende Domäne des SeV-F-Protein ausgetauscht worden war, in SeV-Partikel eingebaut werden, wenn das SeV-F-Protein deletiert war.

Ausgehend von diesen Ergebnissen verwendeten wir rekombinantes Sendaivirus SeV- $\Delta$ F, dessen F-Protein gegen ein GFP ausgetauscht worden war. Dieses Virus konnte auf transgenen MDCK-Zellen propagiert werden, die das SeV-F-Protein expremierten. Es konnte jedoch auch auf MDCK-Zellen propagiert werden, in denen transient ein geeignetes Oberflächenprotein expremiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit gelang die Generation infektiösen SeV- $\Delta$ F mit dem SeV-F-Protein und zwei chimären HRSV-F-Proteinen, hF<sub>T</sub> und hF<sub>MT</sub>, deren zytoplasmatischer Abschnitte gegen die des SeV-F-Proteins ausgetauscht worden waren, jedoch nicht die Generation infektiöser Pseudotypen mit dem HRSV-F-Protein. Der zytoplasmatische Abschnitt des SeV-F-Proteins

enthält folglich eine oder mehrere Domänen, die für den Einbau des Proteins in die Viruspartikel notwendig sein. TAKIMOTO et al. (2001) konnten zwei Motive nachweisen, die einen wichtigen Einfluss auf den Einbau des SeV-F-Protein in Virus-ähnliche Partikel hatten. FOUILLOT-CORIOU und ROUX (2000) berichteten im Gegensatz dazu, dass eine Verkürzung des zytoplasmatischen Abschnitts des SeV-F-Proteins zu einer geringeren Bildung von Viruspartikeln führt, während sich die Zusammensetzung der Virionen in bezug auf das F-Protein nicht ändert.

### **6.2.1 Die Konformation des HRSV-F-Proteins wird durch einen heterologen Membrananker gestört**

Pseudotypen, die mit der Chimäre hF<sub>T</sub> generiert worden waren, wuchsen zu höheren Titern als Pseudotypen, die mit der Chimäre hF<sub>MT</sub> generiert worden waren. Dies steht in Einklang mit bereits veröffentlichten Experimenten, die zeigten, dass rekombinante Sendaiviren, die HRSV-F/SeV-F Chimären anstatt des SeV-F-Proteins enthielten, höhere Titer erreichten, wenn lediglich der zytoplasmatische Abschnitt ausgetauscht wurde (ZIMMER et al., 2005).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Mutanten der Chimäre hF<sub>T</sub> gut exprimierbar waren und in fast allen untersuchten Fällen auch zur Generation infektiöser SeV-Pseudotypen verwendet werden konnten. Mutanten der Chimäre hF<sub>MT</sub>, die neben der zytoplasmatischen Domäne des Sendaivirus auch dessen Membrananker enthielten, wurden jedoch kaum expremiert, nur in geringem Maß an die Zelloberfläche transportiert und führten nicht zu infektiösen Pseudotypen. Dies deutet drauf hin, dass diese Proteine nicht richtig gefaltet werden konnten. Die Einführung eines heterologen Membranankers in das HRSV-F-Proteins hat demnach eine destabilisierende Wirkung auf die Konformation des HRSV-F-Proteins. Weitere Mutationen beeinträchtigten die Konformation dann so sehr, dass die Expression der Mutanten gestört war.

### **6.2.2 Die Aminosäuren K<sup>65</sup>, K<sup>68</sup> und K<sup>87</sup> spielen eine untergeordnete Rolle für die Funktion des HRSV-F-Proteins**

Die chimären Proteine hF<sub>T</sub>K65N, hF<sub>T</sub>K68N und hF<sub>T</sub>K87N wurden alle im gleichen Maß auf der Oberfläche von BHK21-Zellen expremiert wie hF<sub>T</sub>. Sie führten ebenso zur Bildung von Synzytien und ergaben Pseudotypen mit vergleichbaren Titern. Ein signifikanter Einfluss auf die

Funktionalität des F-Proteins und seinen Einbau in Viruspartikeln konnte nicht nachgewiesen werden. Dies korreliert mit früheren Untersuchungen an rekombinantem BRSV (PANAYOTOVA, 2005).

Anders als die Aminosäuren K<sup>65</sup> und K<sup>68</sup> liegt die Aminosäure K<sup>87</sup> in der vorhergesagten *coiled coil*-Sequenz. Sie liegt auf der Position e und sollte daher eine geladene Seitenkette besitzen. Der Austausch des Lysins zum Asparagin scheint jedoch keine Auswirkung zu haben.

### 6.2.3 Die Aminosäuren K<sup>77</sup>, K<sup>80</sup> und K<sup>85</sup> modulieren die Funktion des HRSV-F-Proteins

Die Chimären hF<sub>K77N</sub>, hF<sub>K80N</sub> und hF<sub>K85N</sub> bildeten Synzytien aus und wurden im gleichen Maß wie hF<sub>T</sub> auf der Oberfläche von BHK-21-Zellen expremiert. Keine von ihnen zeigte eine signifikante Empfindlichkeit gegenüber Trypsin. Dennoch wurden diese Mutanten schlechter in Viruspartikel eingebaut.

Die Aminosäure K<sup>85</sup> nimmt keine besondere Position in der *hetad repeat*-Sequenz ein. Die Mutante hF<sub>T</sub>K85N führte zu Titern, die etwas unter den Titern der Chimäre hF<sub>T</sub> lagen. Sie zeigte einen Einbau der F-Proteine in die Virionen, der vergleichbar mit den der Chimären hF<sub>T</sub>, hF<sub>T</sub>K65N und hF<sub>T</sub>K68N ist. Von diesen wird die Mutante hF<sub>T</sub>K65N sogar noch etwas schlechter in die Partikel eingebaut. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die nachgewiesenen Mengen an F-Protein möglicherweise nicht alle aus Viruspartikeln stammen. Das Matrix-Protein des Sendaivirus kann die Bildung von virusähnlichen Partikeln induzieren TAKIMOTO et al. (2001), welche ebenfalls F-Proteine aufnehmen können und mitpelletiert wurden. Gewisse Schwankungen in den Mengen des F-Proteins rühren möglicherweise daher. Es scheint deshalb so, als habe K<sup>85</sup> nur eine geringe modulierende Wirkung auf das F-Protein.

Die Mutante hF<sub>T</sub>K77N ergab von diesen drei Mutanten den schlechtesten Einbau in Viruspartikel und auch die geringsten Titer. Da alle drei Mutanten dennoch im gleichen Maß Synzytien bildete wie hF<sub>T</sub>, können die geringen Titer nicht mit einer geringeren Fusionsaktivität erklärt werden. In diesem Fall muss ein Defekt im Einbau in die Viruspartikel die Ursache sein.

Die Aminosäure K<sup>80</sup> liegt in der *heptad repeat*-Sequenz auf der Position e. Die Ersetzung durch das polare, aber ungeladene Asparagin könnte die Struktur des *hetad repeats* stören. Diese Stö-

ung scheint jedoch nicht allzu groß zu sein. Die Chimäre führt zu Titern, die mit denen von hF<sub>T</sub>K85N vergleichbar sind. Dennoch wird die Mutanten hF<sub>T</sub>K80N schlechter in Viruspartikel eingebaut als die Mutante hF<sub>T</sub>K85N.

Die hier konnten die Ergebnisse von PANAYOTOVA (2005) tendenziell bestätigt werden. Allerdings hat die Mutation K77N Beim HRSV-F-Protein keine so deutlichen Phänotyp wie im BRSV-F-Protein.

#### **6.2.4 Die Aminosäure K<sup>75</sup> hat einen großen Einfluß auf die Funktion des HRSV-F-Proteins**

Die Mutante hF<sub>T</sub>K75N zeigt zwar einen mit den anderen Mutanten vergleichbaren Oberflächentransport und ebenso keine signifikante Empfindlichkeit gegenüber Trypsin. Sie bewirkte jedoch nicht die Bildung von Synzytien, und es ließen sich mit dieser Mutante keine infektiösen Pseudotypen erzeugen. Die naheliegende Vermutung war, dass die Mutation von Lysin<sup>75</sup> in ein Asparagin die Fusionsaktivität des F-Proteins stark herabsetzt oder sogar ganz zerstört. Eine Analyse der pelletierten Pseudotypen zeigte jedoch, dass nicht nur die Fusionsaktivität verloren gegangen war, sondern auch der Einbau in Viruspartikel empfindlich gestört war. Die Aminosäure K<sup>75</sup> liegt auf der Position g der *heptad repeat*-Region. Der Austausch der geladenen Aminosäure Lysin gegen das polare Asparagin könnte die Konformation der *heptad repeat*-Region gestört haben.

Um die Fusion von zwei Lipidmembranen miteinander zu induzieren, ist es erforderlich, dass das F-Protein Trimere bildet und diese miteinander kooperieren. Auch für den Knospungsprozess ist eine Konzentration des F-Proteins erforderlich. Es wurde nachgewiesen, dass das RSV-F-Protein sich in *lipid rafts* anreichert und dort mit Caveolin-1 kolokalisiert (McCurdy und Graham, 2003; Oomens et al., 2006). Um festzustellen, ob möglicherweise die Anordnung der Mutane hF<sub>T</sub>K75N auf der Oberfläche gestört war, wurde deren Expression im Vergleich zu der Chimäre hF<sub>T</sub> und dem nicht mutierten HRSV-F-Protein untersucht. In der Fluoreszenzmikroskopie ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Konstrukten nachweisen. Ebenso ließ sich auch für den Wildtyp keine Kolokalisation mit Caveolin-1 nachweisen. Um die Lokalisation der Mutante und des unmodifizierten hF-Proteins weiter zu klären, müsste die Kolokalisation des F-Proteins mit anderen Proteine, wie z.B. RhoA, überprüft wer-

den.

Die Mutation K75N scheint sowohl im HRSV-F-Protein als auch im BRSV-F-Protein eine fatale Auswirkung auf die Fusionsaktivität und die Fähigkeit, infektiöse Partikel zu bilden, zu haben. Es ist jedoch anzumerken, dass die Mutation K75N zwar in den BRSV-Stamm Atue51908 und dem HRSV-Stamm Long fatal ist, aber im BRSV-F-Protein des Stammes Stormond vorhanden ist. Hier scheinen weitere Sequenzunterschiede, die jedoch nicht in der basischen Domäne liegen, den Effekt dieser Mutation wieder auszugleichen.

Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die basische Domäne im HRSV- und BRSV-F-Protein eine ähnliche Funktion hat. Um dies genauer zu untersuchen, wäre es allerdings notwendig, auch das BRSV-F-Protein und die entsprechenden Mutanten in eine entsprechende BRSV/SeV-F-Chimäre zu klonieren und die Versuche damit zu wiederholen.

Worin die genaue Funktion der basischen Domäne besteht, ist schwer zu bestimmen. Da der Rezeptor nicht bekannt ist, können keine Bindungsstudien an diesen unternommen werden. PANAYOTOVA (2005) zeigte, dass Mutationen in der basischen Domäne zu einer erhöhten Sensitivität der Mutanten für die Inhibierung durch Glykosaminglykane führten. Darüber hinaus wiesen CRIM et al. (2007) nach, dass Peptide aus dem Bereich 54-77 an Glykosaminglykane banden. Es ist deshalb möglich, dass die basische Domäne auch bei der Bindung von Glykosaminglykane eine Rolle spielt. Der Defekt im Einbau der Mutanten hF<sub>T</sub>K75N, hF<sub>T</sub>K77N und hF<sub>T</sub>K80 legt allerdings noch eine andere Möglichkeit nahe. MATTHEWS et al. (2000) vermuteten, dass die *heptad repeat*-Domäne, zu der sie gehören, an Wechselwirkungen zwischen verschiedenen F-Oligomeren beteiligt sind. Wenn die eingeführten Mutationen an den Positionen K<sup>77</sup>, K<sup>80</sup>, K<sup>85</sup> und insbesondere K<sup>75</sup> diese stören, könnte die lokale Konzentrierung der F-Proteine, die sowohl für den Knospungsprozess als auch für die Induzierung der Zellfusion benötigt wird, beeinträchtigt sein, was zu den beobachteten Phänomenen führen würde. Um dies genauer zu untersuchen, wäre es notwendig, die Interaktion der F-Trimeren untereinander zu charakterisieren.



# Literaturverzeichnis

- ARUMUGHAM, R. G., R. C. SEID, S. DOYLE, S. W. HILDRETH und P. R. PARADISO (1989): Fatty acid acylation of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Biol Chem* **264**, Nr. 18, 10339–10342
- BERMINGHAM, A. und P. L. COLLINS (1999): The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, Nr. 20, 11259–11264
- BITKO, V., N. E. GARMON, T. CAO, B. ESTRADA, J. E. OAKES, R. N. LAUSCH und S. BARIK (2004): Activation of cytokines and NF-kappa B in corneal epithelial cells infected by respiratory syncytial virus: potential relevance in ocular inflammation and respiratory infection. *BMC Microbiol* **4**, 28
- BLUMBERG, B. M., C. GIORGI, K. ROSE und D. KOLAKOSKY (1985): Sequence determination of the Sendai virus fusion protein gene. *J Gen Virol* **66 ( Pt 2)**, 317–331
- BOSSERT, B., S. MAROZIN und K.-K. CONZELMANN (2003): Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**, Nr. 16, 8661–8668
- BOURGOIS, C., J. B. BOUR, K. LIDHOLT, C. GAUTHRAY und P. POTHIER (1998): Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *J Virol* **72**, Nr. 9, 7221–7227
- BOUSSE, T., T. TAKIMOTO, W. L. GORMAN, T. TAKAHASHI und A. PORTNER (1994): Regions on the hemagglutinin-neuraminidase proteins of human parainfluenza virus type-1 and Sendai virus important for membrane fusion. *Virology* **204**, Nr. 2, 506–514

- BOWEN, H. A. und D. S. LYLES (1982): Kinetics of incorporation of Sendai virus proteins into host plasma membranes and virions. *Virology* **121**, Nr. 1, 1–11
- BRATT, M. A. und W. R. GALLAHER (1969): Preliminary analysis of the requirements for fusion from within and fusion from without by Newcastle disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**, Nr. 2, 536–543
- BROCK, S. C., J. M. HECK, P. A. MCGRAW und J. E. CROWE (2005): The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation-independent apical plasma membrane sorting sequence. *J Virol* **79**, Nr. 19, 12528–12535
- BUCHHOLZ, U. J., S. FINKE und K. K. CONZELMANN (1999): Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* **73**, Nr. 1, 251–259
- BUDGE, P. J., J. LEBOWITZ und B. S. GRAHAM (2003): Antiviral activity of RhoA-derived peptides against respiratory syncytial virus is dependent on formation of peptide dimers. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, Nr. 11, 3470–3477
- BUKREYEV, A., S. S. WHITEHEAD, B. R. MURPHY und P. L. COLLINS (1997): Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol* **71**, Nr. 12, 8973–8982
- CALDER, L. J., L. GONZÁLEZ-REYES, B. GARCÍA-BARRENO, S. A. WHARTON, J. J. SKEHEL, D. C. WILEY und J. A. MELERO (2000): Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* **271**, Nr. 1, 122–131
- CASH, P., C. R. PRINGLE und C. M. PRESTON (1979): The polypeptides of human respiratory syncytial virus: products of cell-free protein synthesis and post-translational modifications. *Virology* **92**, Nr. 2, 375–384
- CHANOCK, R., B. ROIZMAN und R. MEYERS (1957): Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* **66**, Nr. 3, 281–290



- CHANOCK, R. M., B. R. MURPHY und P. L. COLLINS (2001): Parainfluenza viruses. In: D. M. KNIPE und P. M. HOWLEY (Hrsg.) *Fields Virology*. 4 Aufl., Lippincott, Philadelphia., S. 1341–1379
- CHEN, B. J., M. TAKEDA und R. A. LAMB (2005): Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. *J Virol* **79**, Nr. 21, 13673–13684
- CHIN, J., R. L. MAGOFFIN, L. A. SHEARER, J. H. SCHIEBLE und E. H. LENNETTE (1969): Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *Am J Epidemiol* **89**, Nr. 4, 449–463
- CHOPPIN, P. und R. COMPANS (1975): Reproduction of paramyxoviruses. In: R. R. WAGNER (Hrsg.) *Comprehensive Virology*. Plenum Pub. Corp., New York., S. 95–178
- CHOUDHARY, S., S. BOLDOGH, R. GAROFALO, M. JAMALUDDIN und A. R. BRASIER (2005): Respiratory syncytial virus influences NF-kappaB-dependent gene expression through a novel pathway involving MAP3K14/NIK expression and nuclear complex formation with NF-kappaB2. *J Virol* **79**, Nr. 14, 8948–8959
- COLLINS, P. L. (1991): The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of the Genus Pneumovirus. In: D. W. KINGSBURY (Hrsg.) *The Paramyxoviruses*. Plenum Press, New York., S. 103–162
- COLLINS, P. L. (1995): Respiratory syncytial virus. In: R. G. WEBSTER (Hrsg.) *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, San Diego., S. 1479–1487
- COLLINS, P. L., Y. T. HUANG und G. W. WERTZ (1984): Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, Nr. 24, 7683–7687
- COLLINS, P. L., M. G. HILL und P. R. JOHNSON (1990): The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol* **71** ( Pt 12), 3015–3020
- COLLINS, P. L., M. G. HILL, E. CAMARGO, H. GROSFELD, R. M. CHANOCK und B. R. MURPHY (1995): Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame

- of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, Nr. 25, 11563–11567
- COLLINS, P. L., K. McINTOSH und R. M. CHANOCK (2001): Respiratory syncytial virus. In: D. M. KNIPE und P. M. HOWLEY (Hrsg.) *Fields Virology*. 4. Aufl., Lippincott, Philadelphia, S. 1443–1485
- CRIM, R. L., S. A. AUDET, S. A. FELDMAN, H. S. MOSTOWSKI und J. A. BEELER (2007): Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity. *J Virol* **81**, Nr. 1, 261–271
- CROWE, J. E. und J. V. WILLIAMS (2003): Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. *Paediatr Respir Rev* **4**, Nr. 2, 112–119
- DANIELS, R., B. KUROWSKI, A. E. JOHNSON und D. N. HEBERT (2003): N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol Cell* **11**, Nr. 1, 79–90
- DER POEL, W. H. V., A. BRAND, J. A. KRAMPS und J. T. V. OIRSCHOT (1994): Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J Infect* **29**, Nr. 2, 215–228
- DOUGLAS, J. L., M. L. PANIS, E. HO, K.-Y. LIN, S. H. KRAWCZYK, D. M. GRANT, R. CAI, S. SWAMINATHAN und T. CIHLAR (2003): Inhibition of respiratory syncytial virus fusion by the small molecule VP-14637 via specific interactions with F protein. *J Virol* **77**, Nr. 9, 5054–5064
- ECKARDT-MICHEL, J. (2007): *Untersuchungen zur Cytopathogenität des Fusionsproteins des Respiratorischen Syncytialvirus*. Dissertation, Universität Hannover
- ELANGO, N., M. SATAKE, J. E. COLIGAN, E. NORRBY, E. CAMARGO und S. VENKATESAN (1985): Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: nucleotide sequence of mRNA, identification of cleavage activation site and amino acid sequence of N-terminus of F1 subunit. *Nucleic Acids Res* **13**, Nr. 5, 1559–1574
- EVANS, J. E., P. A. CANE und C. R. PRINGLE (1996): Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res* **43**, Nr. 2, 155–161
- FALSEY, A. R., P. A. HENNESSEY, M. A. FORMICA, C. COX und E. E. WALSH (2005): Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* **352**, Nr. 17, 1749–1759

- FEARNS, R. und P. L. COLLINS (1999): Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* **73**, Nr. 7, 5852–5864
- FELDMAN, S. A., S. AUDET und J. A. BEELER (2000): The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol* **74**, Nr. 14, 6442–6447
- FERRI, K. F., E. JACOTOT, M. GEUSKENS und G. KROEMER (2000): Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. *Cell Death Differ* **7**, Nr. 11, 1137–1139
- FOUILLOT-CORIOU, N. und L. ROUX (2000): Structure-function analysis of the Sendai virus F and HN cytoplasmic domain: different role for the two proteins in the production of virus particle. *Virology* **270**, Nr. 2, 464–475
- FUENTES, S., K. C. TRAN, P. LUTHRA, M. N. TENG und B. HE (2007): Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol* **81**, Nr. 15, 8361–8366
- FULGINITI, V. A., J. J. ELLER, O. F. SIEBER, J. W. JOYNER, M. MINAMITANI und G. MEIKLEJOHN (1969): Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol* **89**, Nr. 4, 435–448
- GALINSKI, M. S., M. A. MINK, D. M. LAMBERT, S. L. WECHSLER und M. W. PONS (1987): Molecular cloning and sequence analysis of the human parainfluenza 3 virus gene encoding the matrix protein. *Virology* **157**, Nr. 1, 24–30
- GARCÍA-BARRENO, B., T. DELGADO und J. A. MELERO (1996): Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* **70**, Nr. 2, 801–808
- GARCIA, J., B. GARCIA-BARRENO, A. VIVO und J. A. MELERO (1993): Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology*. **195**, 243–247

- GARG, H. und R. BLUMENTHAL (2006): HIV gp41-induced apoptosis is mediated by caspase-3-dependent mitochondrial depolarization, which is inhibited by HIV protease inhibitor nelfinavir. *J Leukoc Biol* **79**, Nr. 2, 351–362
- GARG, H., A. JOSHI, E. O. FREED und R. BLUMENTHAL (2007): Site-specific mutations in HIV-1 gp41 reveal a correlation between HIV-1-mediated bystander apoptosis and fusion/hemifusion. *J Biol Chem* **282**, Nr. 23, 16899–16906
- GONZÁLEZ-REYES, L., M. B. RUIZ-ARGÜELLO, B. GARCÍA-BARRENO, L. CALDER, J. A. LÓPEZ, J. P. ALBAR, J. J. SKEHEL, D. C. WILEY und J. A. MELERO (2001): Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, Nr. 17, 9859–9864
- GOWER, T. L., M. E. PEEPLES, P. L. COLLINS und B. S. GRAHAM (2001): RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology* **283**, Nr. 2, 188–196
- GOWER, T. L., M. K. PASTEY, M. E. PEEPLES, P. L. COLLINS, L. H. McCURDY, T. K. HART, A. GUTH, T. R. JOHNSON und B. S. GRAHAM (2005): RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. *J Virol* **79**, Nr. 9, 5326–5336
- GROSKREUTZ, D. J., M. M. MONICK, L. S. POWERS, T. O. YAROVINSKY, D. C. LOOK und G. W. HUNNINGHAKE (2006): Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol* **176**, Nr. 3, 1733–1740
- GRUBER, C. und S. LEVINE (1983): Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins. *J Gen Virol* **64** (Pt 4), 825–832
- HALL, C. B., E. E. WALSH, C. E. LONG und K. C. SCHNABEL (1991): Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **163**, Nr. 4, 693–698
- HALLAK, L. K., S. A. KWILAS und M. E. PEEPLES (2007): Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods Mol Biol* **379**, 15–34
- HARCOURT, J., R. ALVAREZ, L. P. JONES, C. HENDERSON, L. J. ANDERSON und R. A. TRIPP (2006): Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses. *J Immunol* **176**, Nr. 3, 1600–1608

- HARDY, R. W. und G. W. WERTZ (1998): The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* **72**, Nr. 1, 520–526
- HAYNES, L. M., L. P. JONES, A. BARSKEY, L. J. ANDERSON und R. A. TRIPP (2003): Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *J Virol* **77**, Nr. 18, 9831–9844
- HE, B. (2006): Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* **13**, Nr. 3, 393–403
- HELENIUS, A. (2007): Virus Entry and Uncoating. In: D. KNIPE und P. HOWLEY (Hrsg.) *Fields Virology*. Wolters Kluwer: Lippincott Williams & Wilkins, Bd. 1, S. 99–118
- HENDRICKS, D. A., K. McINTOSH und J. L. PATTERSON (1988): Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* **62**, Nr. 7, 2228–2233
- HOMMA, M. und M. OUCHI (1973): Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. 3. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J Virol* **12**, Nr. 6, 1457–1465
- HORSEFALL, F. und R. HAHN (1939): A pneumonia virus of Swiss mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **40**, 684–686
- HSU, M., A. SCHEID und P. W. CHOPPIN (1981): Activation of the Sendai virus fusion protein (F) involves a conformational change with exposure of a new hydrophobic region. *J Biol Chem* **256**, Nr. 7, 3557–3563
- HSU, M. C., A. SCHEID und P. W. CHOPPIN (1987): Protease activation mutants of Sendai virus: sequence analysis of the mRNA of the fusion protein (F) gene and direct identification of the cleavage-activation site. *Virology* **156**, Nr. 1, 84–90
- JIN, H., G. P. LESER, J. ZHANG und R. A. LAMB (1997): Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *EMBO J* **16**, Nr. 6, 1236–1247

- JIN, H., X. CHENG, H. Z. ZHOU, S. LI und A. SEDDIQUI (2000): Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents. *J Virol* **74**, Nr. 1, 74–82
- JOHNSON, P. R., M. K. SPRIGGS, R. A. OLMSTED und P. L. COLLINS (1987): The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, Nr. 16, 5625–5629
- JOHNSTON, S. L., P. K. PATTEMORE, G. SANDERSON, S. SMITH, F. LAMPE, L. JOSEPHS, P. SYMINGTON, S. O'TOOLE, S. H. MYINT und D. A. TYRRELL (1995): Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* **310**, Nr. 6989, 1225–1229
- KAHN, J. S., M. J. SCHNELL, L. BUONOCORE und J. K. ROSE (1999): Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* **254**, Nr. 1, 81–91
- KARRON, R. A., D. A. BUONAGURIO, A. F. GEORGIU, S. S. WHITEHEAD, J. E. ADAMUS, M. L. CLEMENTS-MANN, D. O. HARRIS, V. B. RANDOLPH, S. A. UDEM, B. R. MURPHY und M. S. SIDHU (1997): Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, Nr. 25, 13961–13966
- KAWAOKA, Y. (1991): Structural features influencing hemagglutinin cleavability in a human influenza A virus. *J Virol* **65**, Nr. 3, 1195–1201
- KAWAOKA, Y. und R. G. WEBSTER (1989): Interplay between carbohydrate in the stalk and the length of the connecting peptide determines the cleavability of influenza virus hemagglutinin. *J Virol* **63**, Nr. 8, 3296–3300
- KIMMAN, T. G. und F. WESTENBRINK (1990): Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. *Arch Virol* **112**, Nr. 1-2, 1–25
- KLENK, K. und S. R. ROBERTS (2002): Use of a vesicular stomatitis virus complementation system to analyze respiratory syncytial virus binding. *Virus Res* **90**, Nr. 1-2, 327–335
- KÖNIG, P., K. GIESOW, K. SCHULDT, U. J. BUCHHOLZ und G. M. KEIL (2004): A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV): modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein

- yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. *J Gen Virol* **85**, Nr. Pt 7, 1815–1824
- KOTELKIN, A., E. A. PRIKHOD'KO, J. I. COHEN, P. L. COLLINS und A. BUKREYEV (2003): Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol* **77**, Nr. 17, 9156–9172
- KOTELKIN, A., I. M. BELYAKOV, L. YANG, J. A. BERZOFSKY, P. L. COLLINS und A. BUKREYEV (2006): The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *J Virol* **80**, Nr. 12, 5958–5967
- KRISHNAMURTHY, S. und S. K. SAMAL (1998): Identification of regions of bovine respiratory syncytial virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *J Gen Virol* **79** ( Pt 6), 1399–1403
- KRUSAT, T. und H. J. STRECKERT (1997): Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol* **142**, Nr. 6, 1247–1254
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
- LAMBERT, D. M., S. BARNEY, A. L. LAMBERT, K. GUTHRIE, R. MEDINAS, D. E. DAVIS, T. BUCY, J. ERICKSON, G. MERUTKA und S. R. PETTEWAY (1996): Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, Nr. 5, 2186–2191
- LANGEDIJK, J. P., W. M. SCHAAPER, R. H. MELOEN und J. T. VAN OIRSCHOT (1996): Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **77** ( Pt 6), 1249–1257
- LAWLESS-DELMEDICO, M. K., P. SISTA, R. SEN, N. C. MOORE, J. B. ANTCHAK, J. M. WHITE, R. J. GREENE, K. C. LEANZA, T. J. MATTHEWS und D. M. LAMBERT (2000): Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry* **39**, Nr. 38, 11684–11695
- LEVINE, S., R. KLAIBER-FRANCO und P. R. PARADISO (1987): Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **68** ( Pt 9), 2521–2524

- LIN, Y., A. C. BRIGHT, T. A. ROTHERMEL und B. HE (2003): Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. *J Virol* **77**, Nr. 6, 3371–3383
- LINDEMANS, C. A., P. J. COFFER, I. M. M. SCHELLENS, P. M. A. DE GRAAFF, J. L. L. KIMPEN und L. KOENDERMAN (2006): Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol* **176**, Nr. 9, 5529–5537
- LO, M. S., R. M. BRAZAS und M. J. HOLTZMAN (2005): Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol* **79**, Nr. 14, 9315–9319
- LOREK, M. (2004): *Funktionelle Bedeutung posttranslationaler Modifikationen im F-Protein des bovinen respiratorischen Synzytialvirus*. Diplomarbeit, Universität Hannover
- MALLIPEDDI, S. K. und S. K. SAMAL (1993): Analysis of the ovine respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein gene defines a subgroup of ungulate RSV. *J Gen Virol* **74** ( Pt 12), 2787–2791
- MALLIPEDDI, S. K., B. LUPIANI und S. K. SAMAL (1996): Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system. *J Gen Virol* **77** ( Pt 5), 1019–1023
- MARTÍN, D., L. J. CALDER, B. GARCÍA-BARRENO, J. J. SKEHEL und J. A. MELERO (2006): Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity. *J Gen Virol* **87**, Nr. Pt 6, 1649–1658
- MARTÍNEZ, I. und J. A. MELERO (2000): Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol* **81**, Nr. Pt 11, 2715–2722
- MATTHEWS, J. M., T. F. YOUNG, S. P. TUCKER und J. P. MACKAY (2000): The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J Virol* **74**, Nr. 13, 5911–5920
- MCCURDY, L. H. und B. S. GRAHAM (2003): Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation. *J Virol* **77**, Nr. 3, 1747–1756
- MCINTOSH, K. und R. M. CHANOCK (1985): Respiratory syncytial virus. In: B. N. FIELDS (Hrsg.) *Virology*. Raven Press., New York., S. 1285–1304



- MEBATION, T., S. FINKE, F. WEILAND und K. K. CONZELMANN (1997): A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells. *Cell* **90**, Nr. 5, 841–847
- MOORE, M. L. und R. S. PEEBLES (2006): Respiratory syncytial virus disease mechanisms implicated by human, animal model, and in vitro data facilitate vaccine strategies and new therapeutics. *Pharmacol Ther* **112**, Nr. 2, 405–424
- MORRIS, J. A., R. E. BLOUNT und R. E. SAVAGE (1956): Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 544–549
- MORRISON, T. G. (1988): Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* **10**, Nr. 2-3, 113–135
- OLMSTED, R. A. und P. L. COLLINS (1989): The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J Virol* **63**, Nr. 5, 2019–2029
- OLMSTED, R. A., N. ELANGO, G. A. PRINCE, B. R. MURPHY, P. R. JOHNSON, B. MOSS, R. M. CHANOCK und P. L. COLLINS (1986): Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, Nr. 19, 7462–7466
- OOMENS, A. G. P., K. P. BEVIS und G. W. WERTZ (2006): The cytoplasmic tail of the human respiratory syncytial virus F protein plays critical roles in cellular localization of the F protein and infectious progeny production. *J Virol* **80**, Nr. 21, 10465–10477
- OVERBY, A. K., V. L. POPOV, R. F. PETERSSON und E. P. A. NEVE (2007): The cytoplasmic tails of Uukuniemi Virus (Bunyaviridae) G(N) and G(C) glycoproteins are important for intracellular targeting and the budding of virus-like particles. *J Virol* **81**, Nr. 20, 11381–11391
- PACCAUD, M. F. und C. JACQUIER (1970): A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch Gesamte Virusforsch* **30**, Nr. 4, 327–342
- PANAYOTOVA, D. (2005): *Characterization of the heparin-binding activity of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein*. Dissertation, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

- PASTEY, M. K., J. E. CROWE und B. S. GRAHAM (1999): RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol* **73**, Nr. 9, 7262–7270
- PASTEY, M. K., T. L. GOWER, P. W. SPEARMAN, J. E. CROWE und B. S. GRAHAM (2000): A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat Med* **6**, Nr. 1, 35–40
- PEMBERTON, R. M., M. J. CANNON, P. J. OPENSHAW, L. A. BALL, G. W. WERTZ und B. A. ASKONAS (1987): Cytotoxic T cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: fusion protein is an important target antigen. *J Gen Virol* **68** ( Pt 8), 2177–2182
- PERFETTINI, J.-L., T. ROUMIER, M. CASTEDO, N. LAROCLETTE, P. BOYA, B. RAYNAL, V. LAZAR, F. CICCOSANTI, R. NARDACCI, J. PENNINGER, M. PIACENTINI und G. KROEMER (2004): NF-kappaB and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* **199**, Nr. 5, 629–640
- PERFETTINI, J.-L., M. CASTEDO, T. ROUMIER, K. ANDREAU, R. NARDACCI, M. PIACENTINI und G. KROEMER (2005): Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**, 916–923
- POIGNARD, P., E. O. SAPHIRE, P. W. PARREN und D. R. BURTON (2001): gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* **19**, 253–274
- ROBERTS, P. C., W. GARTEN und H. D. KLENK (1993): Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J Virol* **67**, Nr. 6, 3048–3060
- ROBERTS, S. R., R. W. COMPANS und G. W. WERTZ (1995): Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* **69**, Nr. 4, 2667–2673
- RUIZ-ARGÜELLO, M. B., L. GONZÁLEZ-REYES, L. J. CALDER, C. PALOMO, D. MARTÍN, M. J. SÁIZ, B. GARCÍA-BARRENO, J. J. SKEHEL und J. A. MELERO (2002): Effect of proteolytic processing at two distinct sites on shape and aggregation of an anchorless fusion protein of human respiratory syncytial virus and fate of the intervening segment. *Virology* **298**, Nr. 2, 317–326
- SAIKI, R. K., S. SCHARF, F. FALOONA, K. B. MULLIS, G. T. HORN, H. A. ERLICH und N. ARNHEIM (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, Nr. 4732, 1350–1354

- SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS und H. A. ERLICH (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, Nr. 4839, 487–491
- SATAKE, M. und S. VENKATESAN (1984): Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* **50**, Nr. 1, 92–99
- SATAKE, M., N. ELANGO und S. VENKATESAN (1984): Sequence analysis of the respiratory syncytial virus phosphoprotein gene. *J Virol* **52**, Nr. 3, 991–994
- SCHEID, A. und P. W. CHOPPIN (1974a): The hemagglutinating and neuraminidase protein of a paramyxovirus: interaction with neuraminic acid in affinity chromatography. *Virology* **62**, Nr. 1, 125–133
- SCHEID, A. und P. W. CHOPPIN (1974b): Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* **57**, Nr. 2, 475–490
- SCHLENDER, J., B. BOSSERT, U. BUCHHOLZ und K. K. CONZELMANN (2000): Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* **74**, Nr. 18, 8234–8242
- SCHLENDER, J., G. WALLISER, J. FRICKE und K.-K. CONZELMANN (2002): Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *J Virol* **76**, Nr. 3, 1163–1170
- SCHLENDER, J., G. ZIMMER, G. HERRLER und K.-K. CONZELMANN (2003): Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* **77**, Nr. 8, 4609–4616
- SCHWARZE, J., D. R. O'DONNELL, A. ROHWEDDER und P. J. M. OPENSHAW (2004): Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* **169**, Nr. 7, 801–805
- SEGAWA, H., T. YAMASHITA, M. KAWAKITA und H. TAIRA (2000): Functional analysis of the individual oligosaccharide chains of sendai virus fusion protein. *J Biochem (Tokyo)* **128**, Nr. 1, 65–72

- SIGURS, N., R. BJARNASON, F. SIGURBERGSSON, B. KJELLMAN und B. BJÖRKSTÉN (1995): Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* **95**, Nr. 4, 500–505
- SIGURS, N., P. M. GUSTAFSSON, R. BJARNASON, F. LUNDBERG, S. SCHMIDT, F. SIGURBERGSSON und B. KJELLMAN (2005): Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, Nr. 2, 137–141
- SMITH, M. H., M. L. FREY und R. E. DIERKS (1975): Isolation, characterization, and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. *Arch Virol* **47**, Nr. 3, 237–247
- SODROSKI, J., W. C. GOH, C. ROSEN, K. CAMPBELL und W. A. HASELTINE (1986): Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* **322**, Nr. 6078, 470–474
- SPIELHOFER, P., T. BÄCHI, T. FEHR, G. CHRISTIANSEN, R. CATTANEO, K. KÄELIN, M. A. BILLETER und H. Y. NAIM (1998): Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J Virol* **72**, Nr. 3, 2150–2159
- SPRIGGS, M. K., P. R. JOHNSON und P. L. COLLINS (1987): Sequence analysis of the matrix protein gene of human parainfluenza virus type 3: extensive sequence homology among paramyxoviruses. *J Gen Virol* **68** ( Pt 5), 1491–1497
- STEC, D. S., M. G. HILL und P. L. COLLINS (1991): Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* **183**, Nr. 1, 273–287
- TAKIMOTO, T., T. BOUSSE, E. C. CORONEL, R. A. SCROGGS und A. PORTNER (1998): Cytoplasmic domain of Sendai virus HN protein contains a specific sequence required for its incorporation into virions. *J Virol* **72**, Nr. 12, 9747–9754
- TAKIMOTO, T., K. G. MURTI, T. BOUSSE, R. A. SCROGGS und A. PORTNER (2001): Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. *J Virol* **75**, Nr. 23, 11384–11391
- TASHIRO, M., Y. YOKOGOSHI, K. TOBITA, J. T. SETO, R. ROTT und H. KIDO (1992): Trypsin Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol* **66**, Nr. 12, 7211–7216

- TECHAARPORNKUL, S., N. BARRETTO und M. E. PEEPLES (2001): Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol* **75**, Nr. 15, 6825–6834
- TECHAARPORNKUL, S., P. L. COLLINS und M. E. PEEPLES (2002): Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* **294**, Nr. 2, 296–304
- TENG, M. N. und P. L. COLLINS (1998): Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol* **72**, Nr. 7, 5707–5716
- TENG, M. N., S. S. WHITEHEAD und P. L. COLLINS (2001): Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology* **289**, Nr. 2, 283–296
- TERNETTE, N., D. STEFANO, S. KUATE, K. UBERLA und T. GRUNWALD (2007): Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps. *Virol J* **4**, 51
- THOMPSON, W. W., D. K. SHAY, E. WEINTRAUB, L. BRAMMER, N. COX, L. J. ANDERSON und K. FUKUDA (2003): Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* **289**, Nr. 2, 179–186
- TRIPP, R. A. (2004): The brume surrounding respiratory syncytial virus persistence. *Am J Respir Crit Care Med* **169**, Nr. 7, 778–779
- TRIPP, R. A., L. P. JONES, L. M. HAYNES, H. ZHENG, P. M. MURPHY und L. J. ANDERSON (2001): CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* **2**, Nr. 8, 732–738
- TRUDEL, M., F. NADON, C. SIMARD, F. BÉLANGER, R. ALAIN, C. SÉGUIN und G. LUSSIER (1989): Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch Virol* **107**, Nr. 1-2, 141–149
- WALRAVENS, K., R. KETTMANN, A. COLLARD, P. COPPE und A. BURNY (1990): Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol* **71** (Pt 12), 3009–3014

- WALSH, E. E. und J. HRUSKA (1983): Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol* **47**, Nr. 1, 171–177
- WANG, E., X. SUN, Y. QIAN, L. ZHAO, P. TIEN und G. F. GAO (2003): Both heptad repeats of human respiratory syncytial virus fusion protein are potent inhibitors of viral fusion. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, Nr. 3, 469–475
- WERTZ, G. W., E. J. STOTT, K. K. YOUNG, K. ANDERSON und L. A. BALL (1987): Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors and protection of vaccinated mice. *J Virol* **61**, Nr. 2, 293–301
- WHITEHEAD, S. S., A. BUKREYEV, M. N. TENG, C. Y. FIRESTONE, M. S. CLAIRE, W. R. ELKINS, P. L. COLLINS und B. R. MURPHY (1999): Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J Virol* **73**, Nr. 4, 3438–3442
- WRIGHT, P. F., R. A. KARRON, S. A. MADHI, J. J. TREANOR, J. C. KING, A. O'SHEA, M. R. IKIZLER, Y. ZHU, P. L. COLLINS, C. CUTLAND, V. B. RANDOLPH, A. M. DEATLY, J. G. HACKELL, W. C. GRUBER und B. R. MURPHY (2006): The interferon antagonist NS2 protein of respiratory syncytial virus is an important virulence determinant for humans. *J Infect Dis* **193**, Nr. 4, 573–581
- YOSHIMA, H., M. NAKANISHI, Y. OKADA und A. KOBATA (1981): Carbohydrate structures of HVJ (Sendai virus) glycoproteins. *J Biol Chem* **256**, Nr. 11, 5355–5361
- YUNUS, A. S., P. L. COLLINS und S. K. SAMAL (1998): Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J Gen Virol* **79** ( Pt 9), 2231–2238
- ZHANG, J., G. P. LESER, A. PEKOSZ und R. A. LAMB (2000): The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging. *Virology* **269**, Nr. 2, 325–334
- ZHAO, X., M. SINGH, V. N. MALASHKEVICH und P. S. KIM (2000): Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, Nr. 26, 14172–14177
- ZHIVOTOVSKY, B. und G. KROEMER (2004): Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, Nr. 9, 752–762

- ZHOU, Y., M. KÖNIG, G. HOBOM und E. NEUMEIER (1998): Membrane-anchored incorporation of a foreign protein in recombinant influenza virions. *Virology* **246**, Nr. 1, 83–94
- ZIMMER, G., F. LOTTSPEICH, A. MAISNER, H. D. KLENK und G. HERRLER (1997): Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I). *Biochem J* **326** ( Pt 1), 99–108
- ZIMMER, G., L. BUDZ und G. HERRLER (2001a): Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* **276**, Nr. 34, 31642–31650
- ZIMMER, G., I. TROTZ und G. HERRLER (2001b): N-glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. *J Virol* **75**, Nr. 10, 4744–4751
- ZIMMER, G., K.-K. CONZELMANN und G. HERRLER (2002): Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *J Virol* **76**, Nr. 18, 9218–9224
- ZIMMER, G., M. ROHN, G. P. MCGREGOR, M. SCHEMANN, K.-K. CONZELMANN und G. HERRLER (2003): Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Biol Chem* **278**, Nr. 47, 46854–46861
- ZIMMER, G., S. BOSSOW, L. KOLESNIKOVA, M. HINZ, W. J. NEUBERT und G. HERRLER (2005): A chimeric respiratory syncytial virus fusion protein functionally replaces the F and HN glycoproteins in recombinant Sendai virus. *J Virol* **79**, Nr. 16, 10467–10477





# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des respiratorischen Synzytialvirus . . . . .	4
1.2	Schematische Darstellung des Virusgenoms von RSV . . . . .	4
1.3	Proteolytische Prozessierung des RSV-Fusionsproteins . . . . .	10
4.1	Schematische Darstellung der Erzeugung einer K→N-Mutation . . . . .	40
5.1	Immunpräzipitation der F-Proteine induzierter stabiler Zelllinien . . . . .	57
5.2	Immunpräzipitation des löslichen F-Proteins . . . . .	58
5.3	Durch RSV-F-Proteine induzierte Synzytienbildung nach 24 Stunden. . . . .	59
5.4	Beispiele der heterologen Zellfusion . . . . .	62
5.5	Translokation von p65 . . . . .	65
5.6	Schema der basischen Domäne der F <sub>2</sub> -Untereinheit . . . . .	69
5.7	Chimäre HRSV/SeV-F Konstrukte . . . . .	71
5.8	Schema der Generierung von Pseudotypen . . . . .	72
5.9	Infektiösität der Pseudotypen mit chimären F-Proteinen . . . . .	72
5.10	Infektiösität der hF <sub>T</sub> -Pseudotypen . . . . .	73
5.11	Oberflächenexpression der hF <sub>T</sub> -Mutanten im Western-Blot . . . . .	74
5.12	Trypsinbehandlung der Chimäre hF <sub>T</sub> . . . . .	76

---

5.13 Trypsinbehandlung der Chimäre hF <sub>T</sub> und ihrer Mutanten . . . . .	76
5.14 Synzytien der chimären HRSV/SeV-F-Mutanten . . . . .	77
5.15 Analyse der pelletierten hF <sub>T</sub> -Pseudotypen . . . . .	79
5.16 Lokalisation des F-Proteins und des Caveolin-1 . . . . .	81

# Tabellenverzeichnis

1.1	Paramyxoviridae . . . . .	2
1.2	RSV-Proteine . . . . .	6
4.2	Standard-Ansatz für die <i>Pfu</i> -PCR . . . . .	38
4.3	Bedingungen der <i>Pfu</i> -PCR . . . . .	39
4.4	Standard-Ligations-Ansatz . . . . .	43
4.5	Standard-Ansatz für eine Kolonie-PCR . . . . .	44
4.6	Bedingungen der Kolonie-PCR . . . . .	45
4.7	Klonierungsschema für die basische Domäne der F <sub>2</sub> -Untereinheit . . . . .	48
5.1	RSV-F-GFP-Konstrukte zur Generierung transgener Zelllinien . . . . .	54
5.2	Kinetik der Synzytienbildung in transgenen Zelllinien . . . . .	60
5.3	Kinetik des Lipidtransfers-Assays in transgenen Zelllinien . . . . .	63
5.4	Caspase-3/7-Aktivitäten . . . . .	67



# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaar
BRSV	bovines respiratorisches Synzytialvirus
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EDulb	<i>Dulbecc's Minimal Essential Medium</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
F	Fusionsprotein
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
ffu	<i>fluorescence forming units</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Glykoprotein
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HRSV	humanes respiratorisches Synzytialvirus
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
L	<i>large</i> -Prote
in M	Matrix-Protein
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Nukleokapsidprotein
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NS	Nichtstrukturprotein
OD	Optische Dichte
P	Phosphoprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBSM	PBS ohne Calcium- und Magnesiumsalze
pfu	<i>plaque forming units</i> (Plaque-bildende Einheiten)

---

Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pmol	Pikomol
PO/POD	Peroxidase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RSV	respiratorisches Synzytialvirus
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SeV	Sendaivirus
SH	<i>small hydrphobic protein</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethyl-Ethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

**Aminosäuren**

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin



# Anhang

## Proteinsequenzen

### Sequenz des bFhpsynStrep

Dieser Teil des Vektor pPCR-Script-bFhpsynStrep wurde zur Klonierung der Mutante bF<sub>Strep-hpep</sub> benutzt (siehe 4.4.0.1).

Aminosäuresequenz von bFhpsynStrep:

GRKLMATTTM RMIISIIIIIF IYVQHITLCQ NITEEFYQST CSAVSRGYLS ALRTGWYTSV  
VTIELSKIQK NVCNSTDSNV KLIKQELERY NNAVVELQSL MQNEPASSSR AKRASWSHPQ  
FEKGGGSGGG SGGGSWSHPQ FEKGAELPRF MNYTLNNTKK TNVTLSKKRK RRFLGFLLLGI  
GSAIASG

Aminosäuresequenz von bFhpsynStrep:

ggccggaagc ttatggccac caccaccatg aggatgatca tcagcatcat catcatcttt  
atctacgtgc agcacatcac cctgtgccag aacatcaccg aggagttcta ccagagcacc  
tgtagcgccg tgtccagagg ctacctgagc gccctgagaa ccggctggta caccagcgtg  
gtgaccatcg agctgtccaa gatccagaag aatgtgtgta acagcaccga cagcaacgtg  
aagctgatca agcaggagct ggagcggtag aacaatgccg tgggtggagct gcagagcctg  
atgcagaatg agcctgccag cagcagcaga gccaaagagag ccagctggag ccaccctcag  
ttcgagaagg gcggaggatc tggcggcgga agcggcggag gaagctggtc ccacccccag  
tttgagaaag gagccgagct gccccggttc atgaactaca ccctgaacaa caccaagaaa  
accaacgtga ccctgagcaa gaagcggaag cggagattcc tgggcttct gctgggcatc  
ggcagcgca tcgagcgg c

## Gegenüberstellung der Sequenzen der hF<sub>T</sub>- und hF<sub>MT</sub>-Proteine

Aminosäuresequenz des hF<sub>T</sub>-Proteins:

```
MELPILKANA ITTILAAVTF CFASSQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
LSNIKENKCN GTDAKVKLMK QELDKYKNAV TELQLLMQST PAANNRARRR LPRFMNYTLN
NTKKTNTVLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCRISNIETV IEFQQKNRL LEITREFSVN
VGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
LIAVGLLLYC KARLKRSMML GNPDDRIPRD TYTLEPKIRH MYTNGGFDM AEKR!
```

Aminosäuresequenz des hF<sub>MT</sub>-Proteins:

```
MELPILKANA ITTILAAVTF CFASSQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
LSNIKENKCN GTDAKVKLMK QELDKYKNAV TELQLLMQST PAANNRARRR LPRFMNYTLN
NTKKTNTVLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCRISNIETV IEFQQKNRL LEITREFSVN
VGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNTVITII VMMVILVVI
IVIVIVLYRL KRSMMLGNPD DRIPRDYTL EPKIRHMYTN GGFDMAAEKR !
```

Die rot markierten Sequenzen stammen vom SeV-F-Protein.

# Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, 15.-18. März 2006

Poster: A transgenic cell line for characterization of the respiratory syncytial virus F protein

**Markus Lorek, Julia Eckardt, Nicola Ternette, Gert Zimmer**

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, 15.-18. März 2006

Poster: Bovine Respiratory Syncytial Virus F Protein induces a transdifferentiation process in epithelial cells

**Julia Eckardt, Markus Lorek, Gert Zimmer**

Third European Congress of Virology, Nürnberg, 1.-5. September 2007

Vortrag: The fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) activates transcription factor p53 leading to apoptosis and shedding of epithelial cells

**Julia Eckardt, Markus Lorek, Diane Baxmann, Gert Zimmer**

Third European Congress of Virology, Nürnberg, 1.-5. September 2007

Poster: Generation of a Sendai virus pseudotype system for characterization of F protein mutants of the respiratory syncytial virus

**Markus Lorek, Diane Baxmann, Sascha Bossow, Wolfgang J. Neubert, Gert Zimmer**

Eingereicht beim Journal of Experimental Medicine

The fusion protein of respiratory syncytial virus activates transcription factor p53 leading to apoptosis and shedding of epithelial cells

**Julia Eckardt-Michel, Markus Lorek, Diane Baxmann, Thomas Grunwald, Günther Keil, Gert Zimmer**

# Lebenslauf

## Markus Kai Lorek

7. April 1978

geboren in Hannover

### Schulbildung

1984 - 1990

Grundschule Pattensen

1990 - 1992

Ludwig-Windthorst-Schule Hannover

1992 - 1997

St. Ursula-Schule Hannover

abgeschlossen mit der Allgemeinen Hochschulreife

1997 - 1998

Ableistung des Wehrdienstes

### Hochschulausbildung

10/1998 - 9/2004

Studium der Biochemie an der Universität Hannover

9/2004

Diplom (Titel: "Funktionelle Bedeutung posttranslationaler Modifikationen im F-Protein des bovinen respiratorischen Synzytialvirus")

10/2004 - 12/2007

Anfertigung der Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover



## **Danksagung**

Mein Dank gilt besonders Herrn PD Dr. Gert Zimmer für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Bernd Otto danke ich für die Übernahme der Betreuung der Doktorarbeit.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Virologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft bei praktischen Problemen bedanken.

Meiner Eltern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben. Ihnen und meinen Geschwistern gilt weiterhin mein Dank für ihre moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.