

---

# **Untersuchung der Bindungseigenschaft 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.-Biol. André Paul**

geboren am 29. Januar 1980 in Langenhagen

Hannover 2009

Wissenschaftliche Betreuung: Univ. Prof. Dr. Georg Herrler

Referent: Univ. Prof. Dr. Georg Herrler

Korreferent: Univ. Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Tag der Disputation: 09.07.2009

Diese Arbeit wurde im Rahmen des SFB 587 durch die DFG gefördert.

*Isa und Josie*

*Knowing is not enough,*

*We must apply.*

*Willing is not enough,*

*We must do.*

Lee Jun-Fan

## **Zusammenfassung**

### Untersuchung der Bindungseigenschaft des Fusionsproteins des respiratorischen Synzytialvirus

André Paul

Das respiratorische Synzytialvirus (RSV) ist ein wichtiger Krankheitserreger bei Mensch und Rind. Es stellt die häufigste virale Ursache schwerer Infektionen der unteren Atemwege bei Kleinkindern (HRSV) und Kälbern (BRSV) dar. Das RSV-Fusionsprotein (F) spielt als Oberflächenglykoprotein eine wichtige Rolle in der Anfangsphase der Infektion. Es liegt als Trimer in der Virushülle vor und vermittelt die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran. Diese Eigenschaft macht es auch verantwortlich für die namensgebende Synzytienbildung infizierter Zellen. Neben der eigentlichen Fusionsaktivität verfügt das F-Protein auch über Bindungseigenschaften. Bekannt ist die Interaktion mit Heparin-ähnlichen Strukturen. Ferner gibt es aber auch Hinweise auf eine Bindung an ein definiertes Protein. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des F-Proteins für die Interaktion von RSV mit Wirtszellen untersucht. Um diese spezifische Wechselwirkung isoliert von anderen viralen Anheftungsproteinen (G und evtl. SH) zu betrachten, wurden lösliche Formen des BRSV- bzw. HRSV-F-Proteins konstruiert und in Säugerzellen exprimiert. Nach erfolgter Konzentrierung und Affinitätsreinigung aus dem Zellkulturüberstand wurden die F-Proteine eingesetzt, um verschiedene Bindungstests zu etablieren. In einem geeigneten Experimentaufbau konnten die Bindungseigenschaften der löslichen F-Proteine an Zielzellen *in vitro* untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass die gewählte Methode der Proteinreinigung günstig für den physiologischen Zustand des F-Proteins war, was sich durch die Bildung von Homodimeren bzw. -trimeren zeigte. Das Vorhandensein dieser multimeren Strukturen in hoher Konzentration war Grundvoraussetzung für den Nachweis eines Bindungsereignisses. Neben der weiteren Charakterisierung der Bindungseigenschaften wurde zusätzlich die Wechselwirkung mit Heparin untersucht. Experimente mit heparansulfat-negativen Zellen, sowie immobilisiertem Heparin zeigten, dass auch diese wichtige Bindungsfähigkeit für die löslichen F-Proteine vorhanden war. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass sich lösliche Virushüllproteine für Interaktionsstudien mit Wirtszellen außerhalb eines Infektionsmodells eignen, sofern ihre native Struktur nach der Reinigung erhalten bleibt.

**Schlagnworte:** Respiratorisches Synzytialvirus, Proteinreinigung, Rezeptor, Infektion



## Abstract

### Characterization of the binding activity of the fusion protein of respiratory syncytial virus

André Paul

Respiratory syncytial virus (RSV) is a severe pathogen in man and cattle. It is the major cause of viral infections of the lower respiratory tract in infants (HRSV) and calves (BRSV), respectively. The RSV fusion protein (F) plays an important role in the initial stage of infection. It has a trimeric structure and is located in the viral envelope. Upon binding to the surface of a host cell it facilitates fusion of the viral with the cellular membrane. This feature also results in the formation of syncytia, hence the name syncytial virus. Besides fusion activity, the F protein also has receptor binding abilities, displayed for example by its interaction with heparin-like structures. However, there are strong indications to assume a specific interaction with a yet unidentified cell surface protein. In the present thesis the role of the F protein for the interaction of RSV with target cells has been investigated. In order to study that specific interaction independent from other viral attachment factors (e. g. G and SH proteins), soluble forms of both the HRSV-F and the BRSV-F protein were constructed and expressed in mammalian cells. After concentration and purification from cell culture supernatant the F proteins were subjected to establish various binding assays. In such assays, the binding activities of soluble F proteins to host cells were analyzed *in vitro*. It was found that the purification method applied in this work was suitable to generate soluble proteins which behaved in a way similar to the counterparts on the viral surface. This could be shown by oligomerization studies in which the F proteins formed homodimers and homotrimers in solution. The presence of these multimeric structures in a high concentration was essential for the detection of a binding event. In addition to the characterization of the binding behavior the interaction of the soluble F proteins with heparin was analyzed. In experiments with immobilized heparin, as well as heparan sulfate-negative cells the capability of the anchorless F proteins to bind to that proteoglycan could be demonstrated. Taken together the results of this thesis provide evidence that viral surface proteins in a soluble state are a valuable tool for the analysis of interactions with host cells, given their natural structure after purification is retained.

**Key words:** Respiratory syncytialvirus, protein purification, receptor, infection



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das respiratorische Synzytialvirus . . . . .	1
1.1.1 Historie und Taxonomische Einteilung . . . . .	1
1.1.2 Krankheitsbild . . . . .	2
1.1.3 Immunologie . . . . .	4
1.1.4 Prophylaxe und Therapie . . . . .	5
1.1.5 Virusmorphologie . . . . .	6
1.1.6 Genomorganisation und Proteinexpression . . . . .	7
1.1.7 Replikationszyklus . . . . .	11
1.2 Das Fusionsprotein . . . . .	14
1.2.1 Proteinsynthese und Struktur . . . . .	14
1.2.2 Wirtstropismus . . . . .	15
1.2.3 Bindung an Glykosaminoglykane . . . . .	16
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>3 Material</b>	<b>21</b>

3.1	Zelllinien . . . . .	21
3.2	Viren . . . . .	21
3.3	Bakterien . . . . .	22
3.4	Plasmide und Gene . . . . .	22
3.5	Medien für die Zellkultur . . . . .	23
3.6	Medien für die Bakterienkultur . . . . .	25
3.7	Puffer und Lösungen . . . . .	26
3.8	Enzyme . . . . .	28
3.9	Kits . . . . .	29
3.10	Substrate . . . . .	29
3.11	Transfektionsreagenzien . . . . .	29
3.12	Synthetische Oligonukleotide . . . . .	29
3.13	Antikörper . . . . .	31
3.14	Chemikalien . . . . .	31
3.15	Geräte . . . . .	33
3.16	Software . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
4.1	Zellkulturtechniken . . . . .	39
4.1.1	DAPI-Test . . . . .	40
4.1.2	Umgang mit Gefrierkulturen . . . . .	40
4.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	41
4.2.1	Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR . . . . .	41
4.2.2	Erzeugung von chimären Genen mittels Hybridisierungs-PCR . . . . .	42

4.2.3	Reinigung von DNA-Fragmenten . . . . .	45
4.2.4	Bestimmung der DNA-Konzentration . . . . .	45
4.2.5	Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen . . . . .	45
4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	46
4.2.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	46
4.2.8	Ligation von DNA . . . . .	47
4.2.9	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien . . . . .	47
4.2.10	Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien . . . . .	48
4.2.11	Kolonie-PCR . . . . .	48
4.2.12	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	49
4.2.13	Sequenzierung . . . . .	49
4.3	Virologische Methoden . . . . .	52
4.3.1	Virusanzucht von HRSV und HRSV-GFP . . . . .	52
4.3.2	Virusanzucht von BRSV, BRSV-GFP und BRSV $\Delta$ G-GFP . . . . .	52
4.3.3	Virustitration . . . . .	52
4.3.4	Infektion von Deckglaskulturen . . . . .	54
4.4	Expression von Fremd-DNA in eukaryotischen Zellen . . . . .	55
4.4.1	Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen . . . . .	55
4.5	Anreicherung und Reinigung von löslichen Proteinen . . . . .	55
4.5.1	Transiente Transfektion und Medienwahl . . . . .	55
4.5.2	Ernte und Lagerung von Zellkulturüberstand . . . . .	56
4.5.3	Filtrationskonzentrierung . . . . .	56
4.5.4	Affinitätsreinigung . . . . .	57

4.5.5	Kompetitive Elution . . . . .	57
4.5.6	Filtration zur Trennung der Monomere von den Oligomeren . . . . .	58
4.6	Methoden zum Nachweis von Proteinen . . . . .	58
4.6.1	Immunfluoreszenztest . . . . .	58
4.6.2	Lysatanalyse von Proteinen . . . . .	59
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	60
4.6.4	Western Blot . . . . .	61
4.7	Methoden zum Nachweis gebundener Proteine an Zellen . . . . .	62
4.7.1	Immunfluoreszenz-Bindungstest . . . . .	62
4.7.2	Western Blot-Bindungstest . . . . .	63
4.8	Methoden zum Nachweis der Heparinbindung . . . . .	63
4.8.1	Präzipitation mittels immobilisiertem Heparin . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>65</b>
5.1	Erzeugung löslicher F-Proteine . . . . .	65
5.1.1	Konstruktion . . . . .	65
5.1.2	Expressionsanalysen verschiedener F-Konstrukte . . . . .	65
5.1.3	Reinigung löslicher F-Proteine . . . . .	69
5.2	Bindungsnachweise löslicher F-Proteine . . . . .	72
5.2.1	Bindungsnachweis mittels Immunfluoreszenz . . . . .	74
5.2.2	Bindungsnachweis mittels Western Blot . . . . .	78
5.3	Bindungseigenschaften löslicher F-Proteine . . . . .	81
5.3.1	Bedeutung der Quartärstruktur für die Bindung . . . . .	81
5.3.2	Bindung in Abhängigkeit von der Konzentration . . . . .	83

5.3.3	Bindung in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit . . . . .	84
5.4	Bindung an Glykosaminoglykane . . . . .	88
5.4.1	Bindung an Heparin-Agarose . . . . .	88
5.4.2	BRSV-Infektion auf heparin-negativen Zellen . . . . .	89
5.4.3	Bindung des F-Proteins an heparin-negative Zellen . . . . .	92
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
6.1	Lösliche F-Proteine als Liganden an lebenden Zellen . . . . .	95
6.1.1	Konstruktion und Reinigung . . . . .	95
6.1.2	Untersuchung der Struktur der löslichen F-Proteine . . . . .	97
6.1.3	Nachweis und Charakterisierung der Bindung an Zellen . . . . .	98
6.2	Zelluläre Bindungspartner und Tropismus . . . . .	103
6.2.1	Bindung an Glykosaminoglykane (GAG) . . . . .	103
6.2.2	Rezeptor . . . . .	106
6.2.3	Tropismus . . . . .	109
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>133</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>135</b>
	<b>Nukleotid- und Aminosäuresequenzen</b>	<b>136</b>
	<b>Wissenschaftliche Beiträge</b>	<b>139</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>141</b>



# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACE 2	angiotensin-konvertierendes Enzyms 2
AG	Arbeitsgruppe
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BHK	<i>baby hamster kidney</i> (Babyhamster-Niere)
bF	BRSV-F-Protein
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-, wie in Carboxyterminus eines Proteins
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CPE	<i>cytopathic effect</i> (zytopathischer Effekt)
DABCO	Diazobicyclo(2,2,2)octan
DAPI	4-6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
dpi	<i>days post infection</i> (Tage nach Infektion)
dpt	<i>days post transfection</i> (Tage nach Transfektion)
DSMZ	Deutsche Sammlung v. Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EDulb	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
e. g.	<i>exempli gratia</i> (zum Beispiel)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment</i> (Intermediäres Kompartiment)
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)
F-Protein	Fusionsprotein
F0	ungespaltene Form des F-Proteins
F1	C-terminale Untereinheit des F-Proteins
F2	N-terminale Untereinheit des F-Proteins
FI	formalin-inaktiviert
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G-Protein	Glykoprotein
GAG	Glykosaminoglykane
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün-fluoreszierendes Protein)
ggf.	gegebenenfalls
h	<i>hour</i> (Stunde)
HA-Protein	Hämagglutinin-Protein

HBE	<i>human bronchial epithelial</i> (humanes Bronchialepithel)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
hF	HRSV-F-Protein
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HR	<i>heptad repeat</i>
HR-C	C-terminaler <i>heptad repeat</i>
HR-N	N-terminaler <i>heptad repeat</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Peroxidase aus Meerrettich)
HRSV	humanes respiratorisches Synzytialvirus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IF	Immunfluoreszenz(test)
IP	Immunpräzipitation
K	Kalium
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
L	Lysat
L-Protein	<i>large protein</i> (große Untereinheit der RSV Polymerase)
l	Liter
M	Mol
M-Protein	Matrixprotein
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
MDBK	<i>Madin Darby bovine kidney</i> (Madin Darby bovine Niere)
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MHC II	<i>major histocompatibility complex class II</i>
min	<i>minute</i> (Minute)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)

mRNA	<i>messenger</i> RNA
n. b.	nicht bekannt
N-	Amino-, wie in Aminoterminus eines Proteins
N-Glykosylierung	N-glykosidische Anheftung von Oligosaccharidstrukturen an Proteine im ER, via Asn
N-Protein	Nukleokapsidprotein
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na	Natrium
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NK	Nukleokapsid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NS-Protein	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
O-Glykosylierung	O-glykosidische Anheftung von Oligosaccharidstrukturen an Proteine im Golgi-Apparat, via Ser und Thr
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
P-Protein	Phosphoprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBSM	PBS ohne Calcium- und Magnesiumsalze
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Pep27	27 Aminosäuren langes Peptid; wird bei Spaltung von F0 frei
PFU	<i>plaque forming units</i> (Plaques-bildende Einheiten)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PT	Plaquetest
pmol	Pikomol
PO	Peroxidase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)

RNAdRNAP	<i>RNA dependent RNA polymerase</i> (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RKI	Robert-Koch-Institut
RSV	respiratorisches Synzytialvirus
rRSV	rekombinantes RSV
RT	Raumtemperatur (22 °C)
S-S	Disulfidbrücke
SARS-CoV	SARS-assoziiertes Coronavirus
sec	<i>second</i> (Sekunde)
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SH-Protein	<i>small hydrophobic protein</i> (kleines hydrophobes Protein)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannte/r/s
sol	<i>soluble</i> (löslich)
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
syn	synthetisch
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit)
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ü	Überstand
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
CMV	Zytomegalievirus

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

## Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
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



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Das respiratorische Synzytialvirus

#### 1.1.1 Historie und Taxonomische Einteilung

Das respiratorische Synzytialvirus (RSV) bildet mit dem murinen Pneumovirus das Genus *Pneumovirus* innerhalb der Subfamilie *Pneumovirinae*. Diese gehört mit der Subfamilie *Paramyxovirinae* zur Familie *Paramyxoviridae* (**Tabelle 1.1**) (Collins et al., 2001), die zur Ordnung *Mononegavirales* (Pringle, 1999) gerechnet wird.

1956 wurde RSV erstmals als viraler Erreger aus den oberen Atemwegen eines Laborschimpansen (Morris et al., 1956) isoliert. Der Nachweis eines solchen Virus beim Menschen gelang ein Jahr später. Dieses Virus wurde bei einem Kind mit Pneumonie und einem weiteren mit Krupphusten gefunden und als humanes respiratorisches Synzytialvirus (HRSV) bezeichnet (Chanock et al., 1957). Später fand man bei Rindern das mit HRSV serologisch nah verwandte bovine RSV (BRSV) (Orvell et al., 1987; Paccaud et al., 1970; Walravens et al., 1990). Namensgebend für RSV ist der zytopathische Effekt (CPE), der sich bei infizierten Zellen zeigt. Diese fusionieren mit ihren Nachbarzellen und bilden dabei mehrkernige Riesenzellen, sogenannte Synzytien (Chanock et al., 1957; Collins, 1991).

**Tabelle 1.1:** Taxonomie der Familie *Paramyxoviridae*

Unterfamilie	Genus	Virus
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	Humanes Parainfluenzavirus Typ 1, Typ 3 Bovines Parainfluenzavirus Typ 3 Sendaivirus
	<i>Rubulavirus</i>	Mumpsvirus Humanes Parainfluenzavirus Typ 2, Typ 4 Canines Parainfluenzavirus Typ 2
	<i>Avulavirus</i>	Newcastle-Disease-Virus Vogelparamyxoviren Typ 2-9
	<i>Morbillivirus</i>	Masernvirus Virus der Hundestaube Rinderpestvirus
	<i>Henipavirus</i>	Hendravirus Nipahvirus
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	Humanes RSV Bovines RSV Murines Pneumovirus
	<i>Metapneumovirus</i>	Humanes Metapneumovirus Aviäres Pneumovirus

### 1.1.2 Krankheitsbild

RSV-Epidemien treten hauptsächlich in den Wintermonaten in den gemäßigten Klimazonen und während der Regenzeit in den Tropen auf. Die Krankheitsverläufe variieren je nach Alter des Wirts. Hierbei können milde bis lebensgefährliche oder gar tödliche Verläufe auftreten. RSV ist hochansteckend. Als Übertragungswege dienen die Konjunktiven und Schleimhäute der Atemwege. Über diese dringt das Virus in Form von aerosolisierten Partikeln oder enthalten in Atemwegssekret in den Wirt ein. Bei einer Infektion der oberen Atemwege treten nach einer Inkubationszeit von etwa vier bis fünf Tagen erste Symptome in Form von Entzündungen der Rachen- (Pharyngitis) und Luftröhrenschleimhäute (Tracheitis), sowie der Bronchien auf. Bei einer schweren Verlaufsform entwickelt sich meist eine Lungenentzündung. Die Dauer der Er-

krankung beträgt sieben bis zwölf Tage. Während dieser Zeit und manchmal noch kurz danach wird Virus in großen Mengen ausgeschieden ( $10^4$ - $10^6$  PFU/ml pro nasaler Waschung) (Collins, 1999).

Einer RSV-Infektion folgen häufig bakterielle Infektionen, welche die bestehenden Symptome zusätzlich verschlechtern können. Heute weiß man aus serologischen Untersuchungen, dass HRSV bei Kindern im ersten Lebensjahr weltweit die Hauptursache von Virusinfektionen des unteren Respirationstraktes darstellt und für einen Großteil von Pneumonien bei Säuglingen verantwortlich ist (Clarke et al., 1978; Glezen & Denny, 1973; Martin et al., 1978). Bis zum Ende des zweiten Lebensjahres haben nahezu alle Kinder eine RSV-Infektion durchgemacht. RSV verursacht mehr als 20% der pädiatrischen Krankenhauseinweisungen aufgrund von Erkrankungen der Atemwege. In entwickelten Ländern ist die Sterblichkeitsrate für normal gesunde Kinder sehr gering. In Entwicklungsländern, bei Immundefizienz und bei speziellen Grunderkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), dem Asthma bronchiale, der Mukoviszidose, sowie der bronchopulmonalen Dysplasie und Herzfehlern bei Frühgeborenen, steigt die Rate auf 20-30% (Collins, 1999).

Bei Kindern zwischen sechs und 24 Wochen verläuft die Erkrankung in der Regel schwerer, trotz Anwesenheit maternaler Antikörper gegen das Virus (Collins, 1999). Zudem wird eine frühkindliche RSV-Infektion als Risikofaktor für die verstärkte Entwicklung von Hyperreaktionen der Atemwege und Asthma im Kindes- und Jugendlichenalter diskutiert (Sigurs et al., 2000, 2005; Stein et al., 1999). Abgesehen von Kindern und Personen der oben genannten Riskikogruppen können auch ältere Menschen von HRSV-Infektionen betroffen sein (Englund et al., 1988; Falsey et al., 1990).

Die bovine Variante von RSV ruft bei Kälbern ein vergleichbares Krankheitsbild wie HRSV bei Kindern hervor. Die Erkrankung verursacht in der Kälberzucht erhebliche wirtschaftliche Verluste, da die Letalität bis zu 30% betragen kann (Collins et al., 2001; Costa et al., 2000). Werden Tiere wiederholt von BRSV infiziert, kommt es meist zu einem subklinischen Krankheitsverlauf, wohingegen Reinfektionen mit HRSV bei Kindern lediglich ein abgemildertes Krankheitsbild zeigen (Inaba et al., 1970; Kimman & Westerbrink, 1990). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass sowohl HRSV als auch BRSV im infizierten Individuum persistieren kann (Schwarze et al., 2004; Thomas et al., 1980; Valarcher & Taylor, 2007).

Bisher ist nachgewiesen, dass sich Kälber mit aus Menschen isolierten Viren infizieren lassen

(Jacobs & Edington, 1975; Thomas et al., 1984). Über den umgekehrten Fall, also einer Humanpathogenität von BRSV, ist jedoch noch nichts bekannt (Buchholz et al., 1999; Kimman & Westerbrink, 1990).

### 1.1.3 Immunologie

Eine primäre Infektion durch RSV resultiert in keiner anhaltenden protektiven Immunität. Eine Reinfektion mit dem gleichen Serotyp ist sogar innerhalb weniger Monate möglich (Glezen et al., 1986; Henderson et al., 1979). Obwohl Säuglinge in der Regel bereits über maternale Serumantikörper gegen HRSV verfügen, schützen diese nicht vor einer Infektion (Englund, 1994; Lamprecht et al., 1976; Ogilvie et al., 1981). Diese Tatsache reflektiert die Ineffizienz, mit der Serum-IgGs zu der Mukosa der Respirationstrakts geführt werden. Umso mehr gewinnt hierbei eine lokale Immunität zur Bekämpfung von Viren in den oberen Atemwegen an Bedeutung. Dennoch ist bis heute nicht klar, warum RSV so viel besser das Gewebe infizieren kann, als viele andere Viren des Respirationstrakts, die unter denselben Umständen und ähnlichen Grundvoraussetzungen auf dieselbe Oberfläche treffen.

Die zwei Hauptglykoproteine des RSV, das Glykoprotein G und das Fusionsprotein F, bewirken die Bildung neutralisierender Antikörper im Wirt, wobei letzteres das größere immunogene Potenzial besitzt. Der Selektionsdruck der Immunantwort im infizierten Wirt veranlasste offenbar auf Seiten des Virus die Entwicklung von Mechanismen zur Immunsuppression. Schlender et al. (2002) konnten zeigen, dass das F-Protein auf noch ungeklärte Weise eine Inhibierung der T-Zell-Aktivierung induziert. Außerdem wurde eine Inhibition der T-Zell-Aktivierung durch Monozyten beziehungsweise Makrophagen berichtet, wenn diese mit RSV kokultiviert wurden (Braciale, 2005). In Mäusen hat man beobachtet, dass RSV die Expression der Effektor-Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die Entwicklung eines pulmonalen CD8<sup>+</sup> T-Zellgedächtnis inhibiert (Chang & Braciale, 2002). Dendritische Zellen zeigten im Zusammenhang mit einer Infektion eine Beeinträchtigung in der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf Grund einer verminderten Zellproliferation und Zytokinproduktion (de Graaff et al., 2005).

### 1.1.4 Prophylaxe und Therapie

Die Anwesenheit maternaler Antikörper unterdrückt eine Serum- und Mukosaantikörperreaktion und erschwert dadurch die Erzeugung einer wirksamen Vakzine gegen HRSV für Säuglinge und Kleinkinder (Kimman & Westerbrink, 1990). Über der Wirksamkeit steht natürlich die Impfstoffsicherheit für den Patienten. Eine Vakzine aus formalin-inaktivierter, konzentrierter HRS-Viren (FI-RSV) wurde 1966 getestet und bot keinen Schutz bei anschließender natürlicher Infektion. Paradoxerweise führte die Impfung zu einer erhöhten Anzahl und Schwere der RSV-bedingten Erkrankungen, wobei es sogar zu Todesfällen einiger immunisierter Kinder kam (Karpikian et al., 1969). Das Unvermögen des Impfstoffs, vor einer HRSV-Infektion zu schützen, lag nicht, wie lange Zeit vermutet, an der Denaturierung immunogener Epitope, sondern an einer niedrigen Antikörper-Avidität von protektiven Epitopen (Delgado et al., 2008). Außerdem wurde eine zu schwache Toll-like Rezeptor (TLR)-Stimulation beobachtet (Delgado et al., 2008). Der gefährlichere Krankheitsverlauf konnte auf eine stark erhöhte Th2-Antwort des Immunsystems zurückgeführt werden. Das durch FI-RSV verstärkte Krankheitsbild wurde in BALB/c Mäusen charakterisiert. Man fand eine massive pulmonale Einwanderung von T-Lymphozyten, ein erhöhtes Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen, Lungeneosinophilie und einen sehr starken Anstieg an Th2-Zytokinen, darunter folgende Interleukine (IL): IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13 (Graham et al., 1993; Plotnicky-Gilquin et al., 2002; Waris et al., 1996). Lebendimpfstoffe mit attenuierten Viren sind in der Entwicklung, jedoch ist eine befriedigende Balance zwischen Attenuierung und Induktion einer protektiven Immunantwort noch nicht erreicht worden (Wright et al., 2000). Auch Impfstoffe aus rekombinantem RSV (rRSV), die das G- beziehungsweise das F-Protein in der Virusmembran tragen, um so eine Antikörperantwort im Patienten zu bewirken, werden erforscht (Martinez-Sobrido et al., 2006; Takimoto et al., 2005). Bis heute ist keine Vakzine zugelassen. Allerdings könnte die Integration von TLR-Agonist in die Impfstoffformulierung, zusammen mit erhöhten Bindungsaffinität der Antikörper der Weg zu einer sicheren und wirksamen Vakzine für Kleinkinder sein (Delgado et al., 2008).

Am erfolgreichsten ist die passive Immunisierung, die allerdings monatlich wiederholt werden muss. Hierbei kommt ein 1997 hergestellter monoklonaler, humanisierter Antikörper, mit der Bezeichnung Synagis (Palivizumab) zum Einsatz und wird gefährdeten Kindern und Personen der beschriebenen Risikogruppen in den Wintermonaten präventiv verabreicht (Johnson et al., 1997; Cardenas et al., 2005). Aufgrund der hohen Kosten des Präparates erfolgt die Verabrei-

chung nur nach strenger Indikationsstellung. Eine ähnliche Strategie wird mit der Verabreichung von RespiGam verfolgt, welches aus einer gesammelten Antikörperpräparation aus humanem Serum mit hohem HRSV-neutralisierendem Potenzial besteht (Collins, 1999).

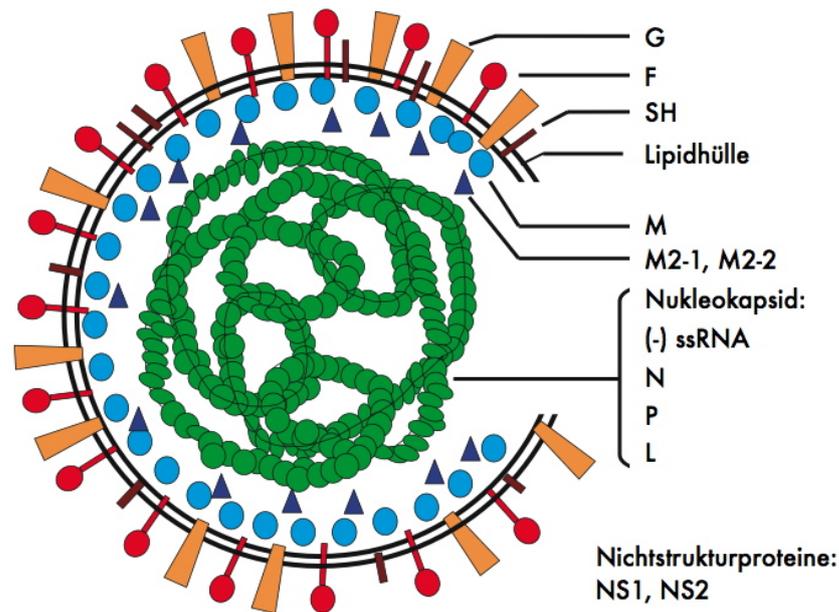
Gleichermaßen wirkt eine passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern gegen das F-Protein von BRSV bei Kälbern protektiv (Thomas et al., 1998). Obwohl auch im Rind die Impfung mit einem Totimpfstoff aus FI-BRSV zu einer verstärkten Pathogenese führte (Schreiber et al., 2000) sind Totvakzine, neben Lebendvakzinen, im Handel erhältlich. Wirkung und Nutzen sind umstritten (Ellis et al., 1995; Kimman et al., 1989; Woolums et al., 1999).

Eine gezielte Therapie für eine akute HRSV-induzierte Erkrankung existiert bis heute nicht. Die Behandlung erfolgt symptomatisch. So wird beispielsweise Sauerstoff verabreicht, um einer Zyanose entgegenzuwirken. Die virustatische Therapie mit inhalativ zu verabreichendem Ribavirin, einem Nukleosidanalogen, bleibt besonders schweren Fällen auf pädiatrischen Intensivstationen vorbehalten.

Die Umweltresistenz des Virus, besonders in Bezug auf medizinische Einrichtungen, ist gut untersucht. So bleibt RSV in Atemwegssekreten auf nicht desinfizierten oder ungewaschenen Händen 20 Minuten lang infektiös. Befinden sich die Sekrete auf Papiertaschentüchern und Baumwollkitteln 45 Minuten und auf Einmalhandschuhen und Stethoskopen bis zu 5 bzw. 6 Stunden. Respiratorische Sekrete auf Kunststoffoberflächen können bis zu 7 Stunden lang infektiöse RSV-Partikel enthalten. Gegenüber Desinfektionsmitteln und Detergenzien ist der Erreger aber sehr empfindlich (RKI-Merkblatt für Ärzte, 2004).

### 1.1.5 Virusmorphologie

In **Abbildung 1.2** ist das RSV-Virion mit seinen Strukturproteinen schematisch dargestellt. RSV ist pleomorph in seiner Form. Virionen können sphärisch sein, mit einem Durchmesser von 80-350 nm, oder filamentös, mit einem Durchmesser von 60-100 nm und bis zu 10 µm Länge (Collins, 1999). Virionen enthalten ein helikales Nukleokapsid, das von einer Hüllmembran umgeben ist, die bei der Knospung von der Wirtszelle stammt. In die Membran inseriert sind die drei viralen Hüllproteine: Glykoprotein (G-Protein), Fusionsprotein (F-Protein) und *small hydrophobic* Protein (kleines hydrophobes, SH-Protein).



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung von BRSV. Modifiziert nach Valarcher & Taylor (2007).

### 1.1.6 Genomorganisation und Proteinexpression

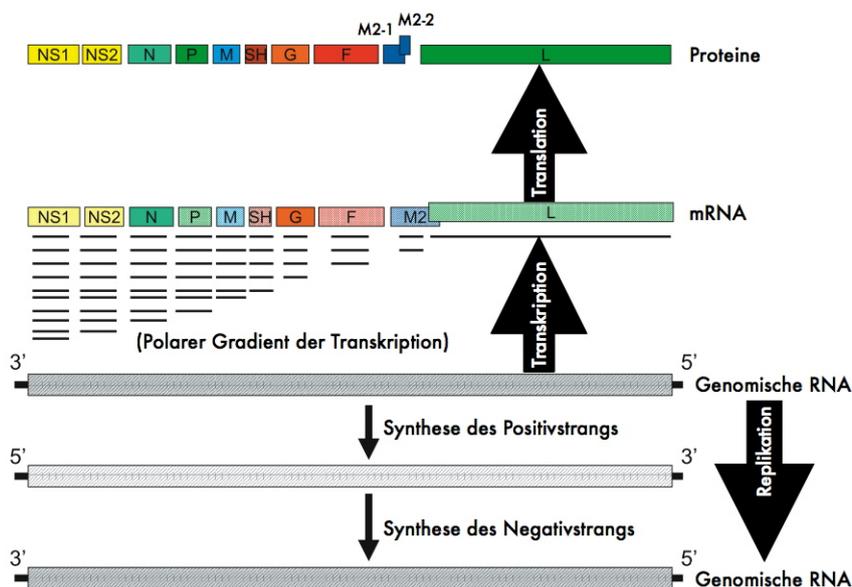
RSV besitzt ein nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Polarität. Es umfasst 15,2 kb und kodiert für zehn Gene und elf offene Leserahmen (**Abbildung 1.2**). Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine 44 Basen lange *leader*-Sequenz, am 5'-Ende eine 155 Basen lange *trailer*-Sequenz. Die einzelnen Gene sind durch intergenische Bereiche voneinander abgegrenzt. Die 3'- und 5'-Enden der Gene werden von konservierten Start- und Stopp-Transkriptionssequenzen flankiert (Collins et al., 2001).

Innerhalb des M2-Gens liegen zwei offene Leserahmen für die Proteine M2-1 und M2-2 vor (Collins et al., 2001). Das M2-1-Protein ist ein Antiterminationsfaktor, der die transkriptionelle Elongation erhöht und dadurch das Überlesen von Gengrenzen der Virus-RNA vervielfacht (Hardy & Wertz, 1998). Das M2-2-Protein dient als regulatorischer Schalter von Transkription zu RNA-Replikation (Bermingham & Collins, 1999).

Von den elf Proteinen, die im Laufe eines RSV-Replikationszyklus von der infizierten Zelle synthetisiert werden (siehe **Tabelle 1.2**), sind drei für die Verpackung der viralen genom-

schen RNA, die Bildung des Nukleokapsids, verantwortlich: Nukleokapsidprotein (N-Protein), Phosphoprotein (P-Protein) und die (Hauptuntereinheit der) RNA-abhängige RNA-Polymerase (L-Protein, *large*). Das N-Protein liegt in großen Mengen vor, was durch den polaren Transkriptionsgradienten bedingt ist (**Abbildung 1.2**). Es ist positiv geladen und bindet stark an die virale RNA, wodurch es diese auch vor dem Abbau durch RNAsen schützt (Samal et al., 1991). Darüber hinaus spielt es eine Rolle bei der Umschaltung von der Transkription zur Replikation viraler RNA (Mallipeddi et al., 1996). Das L-Protein ist ebenfalls mit der RNA assoziiert. Freies L- und N-Protein wird vom P-Protein gebunden und so in Lösung gehalten. Dieses Chaperon dient zudem als Kofaktor bei der RNA-Synthese. N-, P-, L-Protein und der Elongationsfaktor M2-1 sind nötig und ausreichend, um die RNA-Replikation zu steuern (Erzeugung von Antigenom and Genom).

Zwischen dem Nukleokapsid und der Virushüllmembran befindet sich das unglykosylierte Matrixprotein (M-Protein) (Galinski et al., 1987; Spriggs et al., 1987). Es übernimmt eine zentrale Rolle bei der Virusbildung (Samal et al., 1991). Dabei interagiert es mit der Plasmamembran der Wirtszelle und zieht gleichzeitig die Virusbestandteile für die Knospung an. Aufgrund dieser Beobachtung wird ihm eine Wechselwirkung mit den viralen Glykoproteinen und dem Nukleo-



**Abbildung 1.2:** Genomorganisation, Transkription, Translation und Replikation von BRSV. Modifiziert nach Valarcher & Taylor (2007).

kapsid zugesprochen (Bowen & Lyles, 1982).

Das Virus verfügt über drei Transmembranproteine, das F-, G- und SH-Protein, welche separat zu Homooligomeren zusammengesetzt werden.

Das F-Protein ist beteiligt an der Bindung des Virus an die Zelle und vermittelt Fusion. Somit ist es essenziell für die Penetration und die namensgebende Eigenschaft der Synzytienbildung (Bratt & Gallagher, 1969; Choppin & Compans, 1975; Techaarpornkul et al., 2001; Walsh & Hruska, 1983). Aufgrund einer N-terminalen Signalsequenz wird das F-Protein bei seiner Synthese ins Endoplasmatische Retikulum (ER) eingebracht. Die Signalsequenz wird von einer Signalpeptidase abgespalten und das daraus resultierende Typ-1-Membranprotein wird durch einen stark hydrophoben Bereich am Carboxy-Terminus (C-Terminus) in der Membran verankert. Dieses Vorläuferprotein F0 wird durch eine furin-artige zelluläre Protease in seine beiden Untereinheiten, F1 und F2, gespalten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden bleiben und so als gereiftes Fusionsprotein in RSV-Partikel eingebaut werden (Collins, 1999).

Das G-Protein ist das Hauptanheftungsprotein in der Virushülle. Es ist ein Typ-2-Membranprotein, dessen C-Terminus nach außen zeigt und mit Strukturen auf der Wirtszelle interagieren kann. Es ist stark N-glykosyliert. Hämagglutinierende Eigenschaften sind nicht beschrieben, wohl aber ein Bindungsvermögen an Heparin (Krusat & Streckert, 1997; Bourgeois et al., 1998; Feldman et al., 2000). Die Sequenzvariation unter den G-Proteinen innerhalb von RSV führte zur Einteilung in die Serotypen A und B (Johnson et al., 1987). Rekombinante Viren ohne das G-Protein können in Zellkultur vermehrt werden, was vermuten lässt, dass das G-Protein keine für die Infektion relevante Rezeptorbindungsaktivität besitzt (Karron et al., 1997; Teng et al., 2001; Techaarpornkul et al., 2001). Darüber hinaus werden noch weitere Eigenschaften des G-Proteins diskutiert, wie zum Beispiel die Fähigkeit, an den CX3C-Chemokinrezeptor CX3CR1 zu binden (Tripp et al., 2001), wodurch die antivirale T-Zellantwort gegen RSV reduziert werden kann (Harcourt et al., 2006). Es vermag auch mit L-Selectin (CD62L), Annexin II (Malhotra et al., 2003) und Surfactantproteinen (Ghildyal et al., 1999; Hickling et al., 1999) zu interagieren.

Die Funktion des SH-Proteins ist weitestgehend unklar. rRSV mit einer SH-Deletion ist voll lebensfähig in Zellkultur und in Schimpansen, erreicht aber geringere Titer im Vergleich zum Wildtyp (Bukreyev et al., 1997; Collins, 1999; Techaarpornkul et al., 2001). Das Protein enthält in der Mitte einen Membrananker, sodass der C-Terminus zu einem Drittel extrazellulär loka-

**Tabelle 1.2:** Übersicht der RSV-Proteine

Protein	Länge in AS	Molekulargewicht in kDa Modifikationen	Eigenschaften und Funktion
F0	574	70 N-glykosyliert, acyliert	-Vorläufer-Membranprotein, Reifespaltung durch Furin in der Zelle in F1- und F2-Untereinheit, Rezeptorbindung (Karger et al., 2001), Membranfusion (Heminway et al., 1994), Zelltropismus (Schlender et al., 2003)
F1	438	48 N-glykosyliert, acyliert	-Typ-I-Membranprotein, C-terminale Region von F0, Fusionspeptid am N-Terminus, fusogen, Induzierung neutralisierender Antikörper, über Disulfidbrücken mit F2 zu einem Heterodimer verbunden
F2	109	20 N-glykosyliert	-N-terminale Region von F0, Tropismusdeterminante
G	298	90 O-/N-glykosyliert	Typ-II-Membranprotein, Anheftungsprotein, mucinähnlich, Bindung an Glykosaminoglykane (Teng et al., 2001), nicht essenziell für Infektion <i>in vitro</i> (Karron et al., 1997)
SH	64	13	Membranprotein, inhibiert TNF (Fuentes et al., 2007), nicht essenziell für Infektion <i>in vitro</i> (Bukreyev et al., 1997; Karron et al., 1997)
M	256	25	Matrixprotein, steuert Virusmorphogenese und Knospung von der Wirtszelle
M2-1	194	22, phosphoryliert	Elongationsfaktor (Fearn & Collins, 1999)
M2-2	90	11	vermittelt Umschaltung von Transkription auf Replikation (Birmingham & Collins, 1999)
N	391	45	Nukleokapsidprotein, Bestandteil des Polymerasekomplexes
P	241	33, phosphoryliert	Komponente des Polymerasekomplexes
L	2165	250	Teil des Nukleokapsids, virale RNA-abhängige RNA-Polymerase
NS1	139	14	Interferon-Antagonist (Schlender et al., 2000)
NS2	124	15	Interferon-Antagonist (Schlender et al., 2000)

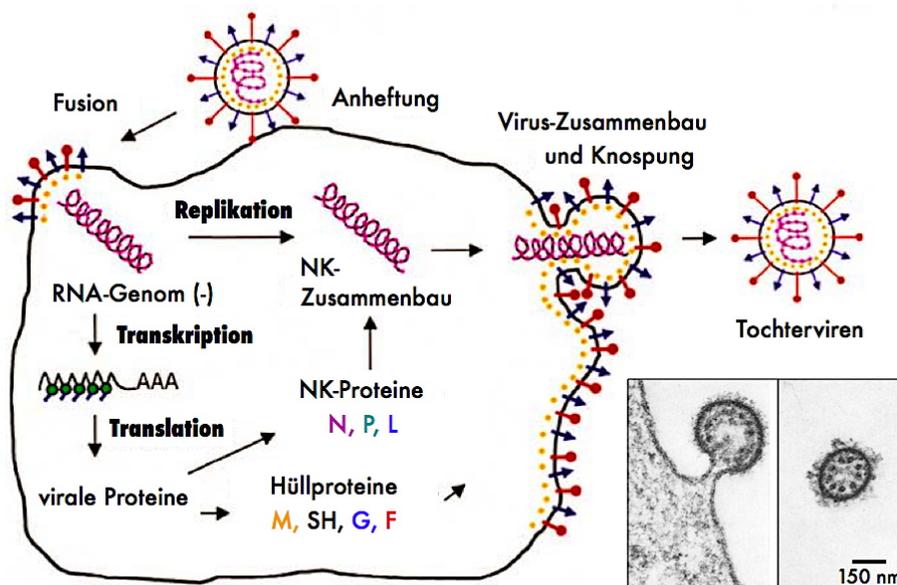
lisiert ist. Bei HRSV findet man unterschiedlich glykosylierte Isoformen, deren Relevanz aber noch unbekannt sind (Olmsted & Collins, 1989), die aber alle über eine Bindungsaffinität zu Heparinstrukturen verfügen (Feldman et al., 2000). Fuentes et al. (2007) stellten Untersuchungen an, die auf eine anti-apoptotische Wirkung des SH-Proteins hinweisen.

Als Besonderheit unter den *Paramyxoviridae* werden während des Replikationszyklus der *Pneumovirinae* zwei Nichtstrukturproteine (NS1 und NS2) synthetisiert (Pastey & Samal, 1995). Die entsprechenden Gene werden von allen RSV-Genen am stärksten in infizierten Zellen transkribiert (**Abbildung 1.2**), jedoch können sie in gereinigten Virionen nur in Spuren nachgewiesen werden. Die NS1- und NS2-Proteine wirken hauptsächlich als Interferon  $\alpha/\beta$ -Antagonisten (Schlender et al., 2000). Zusätzlich ist das NS1-Protein ein negativer Regulator der viralen Transkription und Replikation (Atreya et al., 1998). rRSV mit einer NS2-Deletion ist vermehrungsfähig in Zellkultur, repliziert aber signifikant schlechter als der Wildtyp (Buchholz et al., 1995; Teng & Collins, 1999).

### 1.1.7 Replikationszyklus

Bei Infektionsexperimenten mit HeLa-Zellen wurde schon früh gezeigt, dass nach 30 Minuten 60%, nach zwei Stunden 80% aller vorhandenen Viren an die Zellen adsorbieren (Levin & Hamilton, 1969). Die Anheftung an die Wirtszelle erfolgt über das G- und das F-Protein in der Virusmembran. Bei diesem Vorgang spielt ersteres die Hauptrolle, da es eine starke Bindung des Virions an Glykosaminoglykane vermittelt (Teng & Collins, 1999; Teng et al., 2001). Da die entsprechenden Proteoglykane auf beinahe jeder Zelloberfläche in großen Mengen vorzufinden sind, stellt man sich die Interaktion als Wirt-unspezifisch vor. Zunächst ist es für das Virus essenziell überhaupt einen engen Kontakt zur Zelle herzustellen, da es beim Hauptübertragungsweg über Aerosole meist über die Lunge in den Wirt eindringt. Der ständige Luftstrom während der Atmung und zusätzliches Abhusten erschweren die Anheftungsbedingungen für respiratorische Erreger. Diese Hypothese wird gestützt von Berichten nach denen das G-Protein in Infektionsstudien in der Zellkultur nicht essenziell ist (Karron et al., 1997; Techaarpornkul et al., 2001). Überdies ist auch das F-Protein zu einem gewissen Maße in der Lage, an Glykosaminoglykane, insbesondere Heparin, zu binden und die Anheftung an die Zelle zu vermitteln (Feldman et al., 2000; Techaarpornkul et al., 2002; Teng & Collins, 2002). Ist der Zellkontakt aber hergestellt, kann nun das F-Protein seine postulierte Funktion der Rezep-

torbindung ausführen und an eine bisher unbekannte Struktur der Wirtszelle spezifisch binden. Hierfür sprechen Studien mit Sendaivirus-Pseudotypen, die nur das RSV F-Protein enthielten, und trotz Abwesenheit der anderen viralen Glykoproteine eine Infektion vermitteln konnten (Zimmer et al., 2005). Durch die Bindung des F-Proteins an seinen Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung, die das sogenannte Fusionspeptid auf der F1-Untereinheit freilegt. Dieser hydrophobe Bereich inseriert in die Plasmamembran der Zielzelle wodurch es im weiteren Verlauf zu einer Fusion der Zell- und Virusmembran kommt, und das virale Nukleokapsid ins Zytosol der Zelle gelangt (Baker et al., 1999). Dieser Vorgang ist pH-unabhängig.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des Replikationszyklus von RSV. Abkürzung NK steht für Nukleokapsid. Verändert nach Takimoto et al. (2004). Rechts daneben: elektronenmikroskopische Aufnahmen von RSV bei der Knospung von der Wirtsmembran beziehungsweise als freies Virion. Modifiziert nach Kalica et al. (1973).

In der Zelle setzt nun unverzüglich die Transkription der viralen RNA durch das L-Protein ein und neugebildete virale RNA ist fünf Stunden nach Infektion im Zytoplasma nachweisbar (Levine & Hamilton, 1969). Die RNA-Polymerase bindet an die 3'-terminale *leader*-Region der genomischen RNA, die als Promotor fungiert. Die Synthese der subgenomischen mRNAs erfolgt über einen Start-Stop-Mechanismus, der durch intergenische Sequenzen gesteuert wird. Dabei entstehen mRNAs unterschiedlicher Mengen, entsprechend ihrer genomischen Lokalisation (siehe **Abbildung 1.2**). Gene, welche sich näher am 3'-Ende und somit auch näher am Pro-

motor der genomischen RNA befinden werden häufiger transkribiert (Collins & Wertz, 1983; Krempl et al., 2002; Kuo et al., 1996). Die mRNAs werden in virale Proteine umgeschrieben, die entweder für die Bildung neuer Virionen und/oder zur Beeinflussung der Wirtszelle dienen. Es ist nicht geklärt, wie im weiteren Verlauf der Infektion die virale Polymerase umgeschaltet wird von Transkription auf Replikation. Man vermutet jedoch, dass das M2-2-Protein dabei eine Rolle spielt (Bermingham & Collins, 1999). Die ersten Virusantigene können ungefähr neun bis zehn Stunden nach Eintritt des Virus in die Zelle detektiert werden (Bennett & Hamre, 1962; Jordan, 1962; Levine & Hamilton, 1969). Während der Replikation werden negativ-polare genomische RNAs in Nukleokapside verpackt und zur Plasmamembran transportiert. Dort assoziieren sie mit den viralen Glykoproteinen, die über den sekretorischen Weg via ER und Golgi-Apparat prozessiert und in die Zellmembran inseriert werden. Das M-Protein gelangt auf noch unbekannte Weise ebenfalls an die Plasmamembran, wo es, wie die F- und G-Proteine in Membrandomänen, den *lipid rafts* nachgewiesen werden kann (Fleming et al., 2006; Henderson et al., 2002; McDonald et al., 2004). Sobald die viralen Komponenten die Plasmamembran erreicht haben, erfolgt die Bildung und das Abschnüren der neuen Viruspartikel. Mit dem letzten Schritt ist der Replikationszyklus des Virus vollendet, zwölf bis 14 Stunden nach Infektion (Bennett & Hamre, 1962; Jordan, 1962; Levine & Hamilton, 1969).

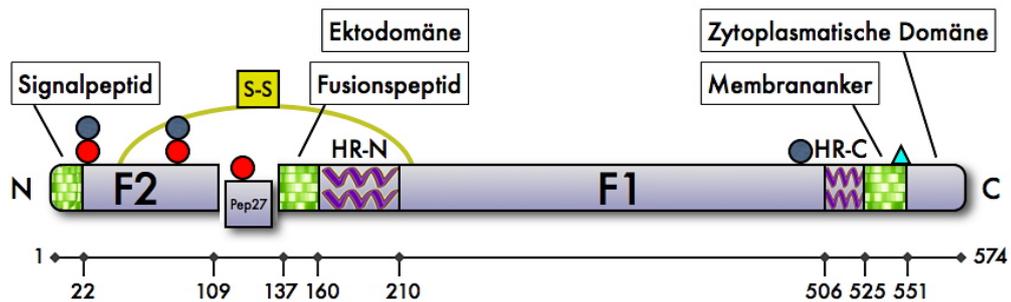
## 1.2 Das Fusionsprotein

### 1.2.1 Proteinsynthese und Struktur

Das F-Protein wird bei seiner Synthese, bedingt durch ein N-terminales Signalpeptid, in das Lumen des ER transloziert. Auf dem sekretorischen Weg über ER und Golgi-Apparat erfährt es zahlreiche Modifikationen (**Abbildung 1.4**). Es findet eine Acylierung an Cys550 statt (Arumugham et al., 1989), ferner wird es im ER und Golgi-Apparat N-glykosyliert. Das humane RSV-F-Protein ist an drei Asparaginen (Zimmer et al., 2001b) N-glykosyliert. Dasselbe wird für das bovine RSV-F-Protein vermutet (Pastey & Samal, 1997).

Die Spaltung des F-Proteins durch die zelluläre Protease Furin im Trans-Golgi-Netzwerk bewirkt die Reifung zum fusionsaktiven Hüllprotein (Gruber & Levine, 1983; Klenk & Garten, 1994; Zimmer et al., 2002). Durch den Spaltungsvorgang wird das hydrophobe Fusionspeptid am N-Terminus der F1-Untereinheit freigelegt und somit für den Fusionsvorgang verfügbar. Die Spaltung erfolgt an zwei multibasischen Spaltstellen RARR109 und KKRKRR136, wodurch ein 27 Aminosäuren langes Peptid (Pep27) freigesetzt wird (Gonzalez-Reyes et al., 2001; Zimmer et al., 2001a), während die F2- und F1-Untereinheiten über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. Das Vorhandensein von zwei Spaltstellen ist einzigartig unter den Paramyxoviren, die sonst nur über eine Spaltstelle verfügen, die beim RSV-F-Protein der Stelle an Position 136 entspricht (Lamb & Kolakofsky, 2001). Das so modifizierte F-Protein wird an der Plasmamembran in Virionen verpackt. Auf deren Oberfläche stellt es sich als Homotrimer dar, welches über die in **Abbildung 1.4** dargestellten *heptad repeats* (HR-N und HR-C) auf der F1-Untereinheit zusammengehalten wird. Über diese Strukturen wird ein sog. sechs-teiliger *coiled coil*-Komplex ausgebildet (Lawless-Delmedico et al., 2000; Matthews et al., 2000; Yin et al., 2006). Ein weiteres HR ist zusätzlich vorhanden, dient aber nicht der Trimerisierung (Baker et al., 1999; Collins & Mottet, 1991; Morton et al., 2003).

Sequenzanalysen zeigen starke Homologien der F-Proteine von HRSV und BRSV auf, ca. 83%. Der N-Terminus von Aminosäure (AS) 1-26, in dem das Signalpeptid liegt, sowie der Bereich von AS 66-132, um das Pep27, ist verschieden. Übereinstimmung herrscht bei AS 27-65, AS 133-200 (um das Fusionspeptid) und ab AS 220-574, dem Ende des Proteins. In diesem letzten Abschnitt befinden sich die sogenannten *Heptad Repeats*, die für die Trimerisierung



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins und der posttranslationalen Modifizierungen. F2-Untereinheit: AS 1-109. Signalpeptid: AS 1-22. Pep27: AS 110-136. F1-Untereinheit: AS 137-574. Fusionspeptid: AS 137-160. HR-N: ca. AS 161-210. HR-C: ca. AS 506-523. Membrananker: AS 525-551. Zytoplasmatischer Abschnitt: ca. AS 552-574. Hydrophobe Breiche sind grün-weiß kariert. HR sind als lila Schlangenlinien dargestellt. Die Disulfidbrücke zwischen F2 und F1 ist mit S-S abgekürzt. Die Acylierung ist als türkis-farbenes Dreieck dargestellt. N-Glykosylierungsstellen des HRSV-F-Proteins sind als blaue Kugeln, die des BRSV-F-Proteins als rote Kugeln gezeichnet. Unter dem Protein ist die Länge in Aminosäuren abgebildet.

des F-Proteins verantwortlich sind und bei allen Paramyxovirus-F-Proteinen stark konserviert sind (Calder et al., 2000). Diese letzte große Region der Homologie wird nur von 20 nicht-identischen AS unterbrochen (AS 201-219). Hier befinden sich zahlreiche Cysteine und ein Teilbereich des HR-N.

### 1.2.2 Wirtstropismus

Der zelluläre Rezeptor für HRSV beziehungsweise BRSV ist unbekannt. Da das Virus über den Respirationstrakt in den Wirt eindringt, sollte eine solche Struktur auf den Zellen dieses Gewebes zu finden sein. HRSV infiziert Epithelzellen der Lunge (Zhang et al., 2002). Für BRSV wird dies ebenfalls diskutiert (Goris et al., 2009). Arbeiten mit rRSV, dem das G- und SH-Protein fehlt, zeigen, dass das F-Protein als einziges Hüllprotein eine Infektion einleiten kann und daher wahrscheinlich auch den Tropismus von RSV bedingt (Techaarpornkul et al., 2001). Außerdem führt die Einzelexpression des F-Proteins zu Synzytienbildung in Zellkultur (Gonzales-Reyes et al., 2001), welche wiederum mittels F-spezifischen Antikörpern gehemmt werden kann (Techaarpornkul et al., 2001). In Untersuchungen mit rRSV, welches entweder nur das F-, SH- und F-, F- und G- oder SH- und F- und G-Protein in der Virushülle trug, wurde

die unterstützende Funktion des G-Proteins bei der Infektion deutlich. Die Anwesenheit dieses Glykoproteins in der Virusmembran bewirkte eine hundertfach höhere Virusproduktion der von rRSV-F-G infizierten Zellen, im Vergleich zu rRSV-F bzw. rRSV-SH-F infizierten Zellen und eine zehnfach höhere Virusproduktion im Vergleich zu rRSV-SH-F-G (Techaarpornkul et al., 2001). In dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die gesteigerte Virusvermehrung ausschließlich an der verbesserten Anheftung durch das G-Protein lag. Alle drei rRS-Viren waren gleichermaßen infektiös und drangen ähnlich schnell in die Wirtszellen ein, unabhängig von der Anwesenheit des G-Proteins. Eine weitere Untersuchung zeigte anhand des überattenuierten Stamm cp-52, dessen HRSV-Viren weder SH-, noch G-Proteine besaßen, dass das F-Protein allein in der Hülle von HRSV genügt, um Zellen zu infizieren (Karron et al., 1997). Man kann also davon ausgehen, dass auf viraler Seite nur das F-Protein für eine spezifische Erkennung eines Wirtszellrezeptors verantwortlich sein kann.

Trotz der großen biochemischen Ähnlichkeit der F-Proteine von HRSV und BRSV ist noch nicht abschließend geklärt, welcher Bereich auf dem F-Protein oder welcher andere Umstand den unterschiedlichen Wirtstropismus bestimmt, der in der taxonomischen Unterscheidung der beiden Viren resultiert. Eine wichtige Arbeit zu dieser Frage stellten Schlender und Kollegen vor (Schlender et al., 2003). Aus ihren Untersuchungen wurde abgeleitet, dass die F2-Untereinheit des F-Proteins über den Spezies-spezifischen Eintritt in hämatopoetische Zellen entschied. Sie erzeugten rRSV mit chimären F-Proteinen. Diese F-Proteine setzten sich entweder aus der F1-Untereinheit des HRSV-F-Proteins und der F2-Untereinheit des BRSV-F-Proteins oder umgekehrt zusammen. Infektionsversuche mit primären humanen und bovinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) ergaben, dass nur jene rRS-Viren die humanen PBMC infizieren konnten, die über die F2-Untereinheit des HRSV-F-Proteins verfügten. Umgekehrt gelang die Infektion von bovinen PBMC nur mit der korrespondierenden F2-Untereinheit des BRSV-F-Proteins. Weiterhin bleibt unklar, welche Aminosäuren in der F2-Untereinheit wichtig für die Spezies-spezifische Infektion sind.

### **1.2.3 Bindung an Glykosaminoglykane**

Glykosaminoglykane (GAG) sind ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix tierischer Zellen. Es sind langkettige Polysaccharide mit Disaccharideinheiten aus Aminozuckern und Uronsäuren. Alle GAG sind kovalent an Proteine gebunden und bilden so Proteoglykane

(Löffler, 2003).

Man fand heraus, dass das G-Protein sehr stark an GAG bindet, was seine Rolle als Hauptanheftungsprotein unterstreicht (Feldman et al., 1999; Martinez & Melero, 2000). Interessanterweise jedoch waren RS-Viren, denen nur das G-Protein fehlte, ebenfalls sensitiv gegenüber GAG, was sich an einer partiellen Infektionsinhibition durch lösliches Heparin zeigte (Feldman et al., 2000; Techaarpornkul et al., 2002; Teng & Collins, 2002). Ferner zeigten Untersuchungen mit immobilisiertem Heparin Bindung von F-Proteinen aller HRSV-Serogruppen an dieses Substrat (Feldman et al., 2000). Diese Ergebnisse lassen der Schluss zu, dass das F-Protein als Anheftungsprotein an GAG fungieren kann (Feldman et al., 2000; Techaarpornkul et al., 2002; Teng & Collins, 2002), besonders an heparin-ähnliche Strukturen (Karger et al., 2001; Krusat & Streckert, 1997). Mittels löslicher Peptide, die aus Bruchstücken des F-Protein von HRSV bestanden, konnten mögliche Heparin-Binde-Domänen auf dem Protein identifiziert werden, da entsprechende Peptide die Infektion hemmten (Crim et al., 2007).



# Kapitel 2

## Zielsetzung

Das F-Protein ist zentraler viraler Faktor bei der Infektion durch BRSV bzw. HRSV. Es vermittelt die Rezeptorbindung und die Fusion mit der Wirtszelle. Zwar ist man sich über seine Funktion auf Virusseite sicher, jedoch besteht auf Seiten des Wirts bis heute Ungewissheit über die zellulären Strukturen, die die Virusinfektion vermitteln. Um die Interaktion mit zellulären Oberflächenstrukturen zu untersuchen, bedient man sich häufig rekombinanter Viren, deren Hüllproteine genetisch verändert sind. Die Synthese dieser Viren ist zeitaufwändig und mitunter sehr schwierig. Ziel dieser Arbeit war es, eine alternative Methode zur Untersuchung der Wechselwirkungen viraler Glykoproteine mit Wirtszellen zu entwickeln. Zu diesem Zweck sollten lösliche Formen des F-Proteins von BRSV und HRSV generiert werden, die sich nach Konzentrierung und Reinigung wie virus-assoziierte F-Proteine in der Natur verhalten. Die strukturellen und biologischen Funktionen sollten untersucht und im Verlauf dessen die Bindung an Wirtszellen charakterisiert werden. Es galt in dieser Arbeit entsprechende Methoden für Interaktionsanalysen zu entwickeln, die in der Lage waren, F-abhängige Bindung an Zellen bzw. deren Oberflächenstrukturen darzustellen. Auf diese Weise sollte die Brauchbarkeit dieses Systems der löslichen F-Proteine für Rezeptorstudien validiert werden. Ein wichtiges Hilfsmittel bei diesen Experimenten waren verschiedene rekombinante RS-Viren, mit denen die Empfänglichkeit von diversen Zelllinien ermittelt werden konnte.



# Kapitel 3

## Material

### 3.1 Zelllinien

In der Arbeit wurde mit permanenten, adhären-wachsenden Zelllinien gearbeitet (**Tabelle 3.1**).

**Tabelle 3.1:** Ursprung und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Ursprung	Eigenschaften	Quelle
BHK-21	Syrischer Goldhamster	Nierenepithel	fibroblastoid	DSMZ
HBE	Mensch	Bronchialepithel	epithelial	DSMZ
MDBK	Rind	Nierenepithel	epithelial	Inst. Virologie
Vero	Grüne Meerkatze	Nierenepithel	epithelial	ATCC
L-Zellen	Maus	Bindegewebe	fibroblastoid	FLI
sog9	Maus	Bindegewebe	fibroblastoid	FLI

### 3.2 Viren

**Bovines respiratorisches Synzytialvirus Stamm ATue51908 (BRSV)** wurde von Karl-Klaus Conzelmann, Max-von-Pettenkofer-Institut, München, zur Verfügung gestellt.

**Humanes respiratorisches Synzytialvirus Stamm Long (HRSV-Long)** wurde von H.- Jürgen Streckert, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Zur Konstruktion des GFP-exprimierenden rekombinanten BRSV-GFP, sowie BRSV $\Delta$ G-GFP wurde eine *cloning cassette*, welche den offenen Leserahmen für GFP enthielt, mittels PCR generiert. Die GFP Kasette wurde in eine *NotI* Restriktionsstelle in das BRSV Antigenom inseriert, oberhalb des NS1-Gens am 5-Ende. Diese Arbeit wurde im Vorfeld von Wiebke Köhl durchgeführt.

### 3.3 Bakterien

#### *Escherichia coli*

*E. coli* MRF' XL-1 Blue-Bakterien (Stratagene) wurden zunächst chemisch kompetent gemacht (4.2.9) und wurden dann zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Die Aufnahme der DNA erfolgte per Hitzeschock (4.2.10).

### 3.4 Plasmide und Gene

#### pCG1

Dieses Plasmid wurde von R. Cattaneo, Mayo Clinic, Rochester, USA, zur Verfügung gestellt (Cathomen et al., 1995). Die Gene der damit exprimierten Proteine stehen unter der Kontrolle des Promotors des Zytomegalievirus (CMV). Ferner befindet sich zwischen dem CMV-Promotor und der *multiple cloning site* (MCS) ein Intron des  $\beta$ -Globin-Gens des Kaninchens. Zur Selektion in Bakterien verfügt das Plasmid über eine Ampicillin-Resistenz. Das Plasmid pCG1 ermöglicht die Expression von RSV-F-Konstrukten über den Zellkern von Säugetierzellen.

#### cDNAs

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Kodon-optimierten Genen von BRSV- und HRSV-F-Proteinen (bF und hF) gearbeitet, die eine verbesserte Expression in BHK-21-Zellen aufwie-

sen. Die synthetisch erzeugten cDNAs (*complementary DNA*) wurden beim bF von Günther Keil, Friedrich-Löffler-Institut, Insel Riems, und beim hF von Klaus Überla, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Virusproteine sind im **Anhang** angegeben.

### 3.5 Medien für die Zellkultur

Wenn nicht anders angegeben wurde mit Antibiotikum-freien Medium gearbeitet. Bei Antibiotika-haltigem Medium wurde pro Liter 0,06 g Penicillin G (Sigma) und 0,05 g Streptomycin-Sulfat (Sigma) zugesetzt. Ferner wurden zu dem Medium nicht-essentielle Aminosäuren (PAA Laboratories) hinzugefügt. Das DMEM/EMEM-Fertigpulver wurde von der Firma Gibco BRL erworben. Der pH-Wert wurde durch CO<sub>2</sub>-Begasung (5%) eingestellt.

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden bei 4 °C gelagert, wenn nicht anders angegeben.

#### Medien

##### **DMEM (*Dulbecco's minimal essential medium*), pH 6,9**

DMEM-Fertigpulver	15,53 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g
Aqua bidest. steril	ad 1 l

##### **EMEM (*Eagle's minimal essential medium*), pH 7,0**

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

## MEM + Glutamax Medium

Fertig gelöst, Invitrogen, Carlsbad, USA.

## HAMs F12 Medium

Fertig gelöst, Biochrom, Hamburg.

## Serum

Fötale Kälberserum (FKS), mykoplasmen-frei von Biochrom, Hamburg.

## Einfriermedium

DMEM/EMEM	10 ml
FKS	10%
DMSO	10%

## Trypsin 0,125%, pH 7,0

Trypsin	1,25 g
EDTA (Versen TitriplexIII)	1,25 g
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HP <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	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,13 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Streptomycin	0,05 g
Penicillin	0,06 g
Aqua bidest. steril	ad 1 l

## 3.6 Medien für die Bakterienkultur

### LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
Reinstwasser	ad 1 l
pH 7,5, autoklaviert	

Zur Herstellung von LB-Platten wurde Agar-Agar dem LB-Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt (20 g/l). Zum Gießen in Petrischalen wurde das Medium vorher in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen auf unter 50 °C wurde Ampicillin hinzugegeben (50 mg/l).

### 3.7 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I pH 9,0 (mit HCl)	1M Tris	300 ml
	Ethanol	200 ml
	Reinstwasser	ad 1 l
Anodenpuffer II pH 7,4 (mit HCl)	1M Tris	25 ml
	Ethanol	200 ml
	Reinstwasser	ad 1 l
Ethidiumbromid- Färbebad	Ethidiumbromid	1 g
	TAE-Puffer	ad 100 ml
DAPI-Färbelösung	DAPI	10 µg
	Ethanol	ad 10 ml
Kathodenpuffer pH 9,4 (mit HCl)	1M Tris	25 ml
	Aminocaprinsäure	5,25 g
	Ethanol	200 ml
	Reinstwasser	ad 1 l
Mowiol	Mowiol	2,5 g
	Glycerol	6 g
	Reinstwasser	6 ml
	DABCO	2,5%
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 <i>Complete</i>	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	NaCl	8 g
pH 7,5	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 20	2 ml
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 (angegeben für 10x)	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
	Glycin	10 ml
	2% Bromphenolblau	1 ml
	Reinstwasser	ad 50 ml
10x TAE-Puffer pH 8,0 (angegeben für 1x)	Tris	40 mM
	Natriumacetat	20 mM
	EDTA	2 mM
10x TBE-Puffer pH 8,0 (angegeben für 1x)	Tris	10 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA	2 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 (8%) für Polyacrylamidgele	H <sub>2</sub> O	2,3 ml
	Acrylamidlösung 30%	1,3 ml
	1M Tris/HCl, pH 8,8	1,3 ml
	10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
	10% APS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
	TEMED	8 µl

## 3.8 Enzyme

### Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	Fermentas
<i>Sac</i> II	Fermentas
<i>Sal</i> I	Fermentas
<i>Xba</i> I	Fermentas

### Weitere Enzyme

T4 DNA Ligase (5 U/µl)	Fermentas
FastAP (Alkaline Phosphatase) (1 U/µl)	Fermentas
<i>Pfu</i> DNA Polymerase rekombinant (2,5 U/µl)	Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	Fermentas
Go <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	Promega

### 3.9 Kits

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin-Mini-Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid MIDI und MAXI Kit	Qiagen
Silver Stain Plus	Bio-Rad
GelCode Blue Stain Reagent	Thermo

### 3.10 Substrate

Super Signal West Femto	Thermo
-------------------------	--------

### 3.11 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
----------------------------	------------

### 3.12 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG und Invitrogen synthetisiert und mit einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l in der PCR benutzt (**Tab. 3.2**).

**Tabelle 3.2:** Verwendete Primer (Sequenzen in 5'→3'-Richtung)

1	bFsyn-s (BamHI)	AAAGGATCCATGGCCACGACCACG
2	sol-bFsyn-(GFP)-as	CGCCCTTGCTCACCATGTTGGTCGTGCTCTT GCCGACGTCGACGC
3	(sol-bFsyn)-GFP-s (Sall)	CAAGAGCACGACCAACATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGCTGTTCAC
4	GFP-as (Sall)	TAATTGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTCC
5	hFsyn-sol (XbaI) as	ATGAATTCTAGATTAGTTGGTGGTGCTTGC
6	bFsyn-sol-as FLAG (BamHI)	TACTGTGGATCCTTACTTGTGCATCATCATCCTTA TAATCGTTGGTCGTGCTCTTGCCGACGTCGACG
7	bFsyn-as (BamHI)	CATCGGGATCCCTACTTGCTGAAGC
8	hFsyn (BamHI) s	ACATTAGGATCCATGGAGCTGCCTATCC
9	hFsyn (XbaI) as	CCTAATCTAGACTCGAGTTATCAG TTGGAGAAGG
10	hFsyn-sol FLAG (XbaI) as	TACTGTTCTAGATTACTTGTTCGTGTCGTGTCCTTG TAGTCGTTGGTGGTGCTCTTGC
11	hFsyn 1290 (SacII) s	AAGAACCGCGGCATCATCAAGACCTTC
12	bFsyn-sol-as 6His (BamHI)	ATAGTGGATCCCTAATGATGATGATGATGATGG TTGGTCGTGC TCTTGCCGACGTCGACG
13	pCG1-s	CCTCTGCTAACCATGTTTCAT
14	pCG1-as	CCAACACACTATTGCAATG
15	bFsyn-Seq1 (bindet bei 499-519 bp)	ATCAAGAATGCATTGCTGAGC
16	bFsyn-Seq2 (bindet bei 974-993 bp)	ACAACAAGGAGGGCAGCAAC
17	hFsyn(588)-s (bindet bei 588-607) bp	GAACTACATCGACAAGCAGC
18	hFsyn(1186)-s (bindet bei 1186-1204 bp)	ATGACCAGCAAGACCGACG

### 3.13 Antikörper

In der Arbeit wurden Antikörper zum Nachweis des BRSV-/HRSV-F-Proteins, sowie des FLAG-M2-Peptids (Brizzard et al., 1994) und anderer Markierungen verwendet. Hauptanwendungen waren der Immunfluoreszenztest (IF), der Western Blot (WB) und der Plaquetest (PT) (**Tab. 3.3**).

**Tabelle 3.3:** Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung	Einsatz
Anti-RSV-F	RSV-F	mAK Maus	Serotec (MCA490)	1:200/1:500	IF/WB
Anti-RSV-F	RSV-F	mAK Maus	HyTest (3ReS21)	1:100	WB
Anti-RSV-F2	RSV-F2	pAK Kan.	G. Keil, FLI Riems	1:200	WB
Anti-RSV-FITC	RSV-F	mAK Ziege	Acris (BP1054F)	1:300	IF
Anti-RSV-M	RSV-M	mAK Maus	Inst. Virologie (18G6)	1:25	PT
Anti-GFP	GFP	mAK Maus	Clontech (8362-1)	1:500	WB
Anti-GFP	GFP	pAK Maus	Roche	1:500	WB
Anti-His	6xHis	mAK Maus	Roche	1:500	IF/WB
Anti-FLAG	FLAG-M2	mAK Maus	Sigma (F3165)	1:400/1:200	IF/WB
Anti-Maus-FITC	Maus-IgG	pAK Ziege	Sigma	1:200	IF
Anti-Maus-HRP	Maus-IgG	pAK Kan.	Dako (P0260)	1:1000	WB
Anti-Kan.-HRP	Maus-IgG	pAK Schw.	Dako (P0217)	1:1000	WB
Anti-FLAG-PO	FLAG-M2	mAK Maus	Sigma (A-8592)	1:1000	WB

### 3.14 Chemikalien

1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth
2-Mercaptoethanol	Fluka
Acrylamidlösung 30% (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym

---

Aminocaprinsäure	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Anti-FLAG-M2-Affinitätsgel, EZview Red (F2426)	Sigma
Blocking-Reagenz	Roche
Borsäure	Roth
Calciumchlorid	Roth
DABCO	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DNA-Marker (Gene Ruler 100 bp Ladder Plus)	Fermentas
DNA-Marker (Gene Ruler 1 kb Ladder Plus)	Fermentas
dNTP	Fermentas
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
FLAG-Peptide (F3290)	Sigma
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Heparin-Agarose (H-3025)	Sigma
HEPES	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Methylzellulose	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
Probenpuffer 6x für DNA-Gele	Fermentas
Probenpuffer 4x (LDS) für Protein-Gele	Invitrogen
Proteaseinhibitorgemisch (Complete)	Roche
Protein-A-Sepharose	Sigma
Proteinmarker (PageRuler prestained)	Fermentas
Proteinmarker (PageRuler Plus prestained)	Fermentas
Salzsäure	Roth
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Roth
Tween 20	Roth
Wasser für die Molekularbiologie	Roth

## 3.15 Geräte

### Agarosegelelektrophorese

Bildverarbeitungssystem	INTAS,
Gelträger, Kammer, Kamm	Keutz, Reiskirchen
Mikrowellengerät MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
UV-Transluminator	UVP, Upland (USA)
Spannungsquelle	Bio-Rad, München

## 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, Osterode

Photometer Ultraspec 2000

Amersham, Freiburg

## Filter

FP 30/0,2  $\mu\text{m}$  CA-S (Sterilfilter)

Schleicher & Schuell, Dassel

FP 30/0,45  $\mu\text{m}$  CA-S

Schleicher & Schuell, Dassel

## Konzentrierungsfilter

U-Tube Concentrator 15H-30, 30 kDa

Novagen, Billerica, USA

Ultra Free-MC, 100 kDa

Millipore, Madison, USA

## Magnetrührer

Magnetrührer, RCT basic

IKA Labortechnik, Staufen

## Mikroskope

Axiovert 25 inverses Mikroskop

Zeiss, Jena

Axioplan 2

Zeiss, Jena

TCS-SP2 + DM-IRBE konfokales Mikroskop

Leica, Wetzlar

## PCR

GeneAmp PCR System 2499	Perkin Elmer, Boston (USA)
Primus 25/96 Thermocycler	MWG Biotech, Ebersberg
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hess. Oldendorf

## pH-Meter

pH-Meter	Jürgens, Hannover
----------	-------------------

## Pipetten

10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml Glaspipetten	Jürgens, Hannover

## Pipettierhilfen

Accu Jet Pipettierhilfe	Brand, Wertheim/Main
-------------------------	----------------------

## Reaktiongefäße

1,5 ml Reaktiongefäß	Eppendorf, Hamburg
2 ml Reaktiongefäß	Eppendorf, Hamburg

## SDS-PAGE und Semi-dry Western Blot

Slab-Gel-Kammer	Keutz, Reiskirchen
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrozellulose-Transfer-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Transferkammer	Keutz, Reiskirchen
ChemiDoc EQ	Bio-Rad, München
Quantity One V 4.4.0 (Software)	Bio-Rad, München

## Sicherheitswerkbänke

NUAIRETM Klasse 2	Nuaire, Plymouth (USA)
Hera Safe	Heraeus, Hanau

## Vortex

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

## Waagen

Elektronische Analysenwaage, Typ 1712 MP 8	Sartorius, Göttingen
Sartorius Portable Waage Lauda A100	Sartorius, Göttingen

## Wasserbäder

Wasserbad	GFL, Burgwedel
-----------	----------------

## Zellkultur

Gewebekulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
6-Napf-Platten	Greiner, Nürtingen
24-Napf-Platten	Greiner, Nürtingen
96-Napf-Platten	Costar, Bodenheim
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Schwenktisch	Keuz, Reiskirchen

## Zentrifugen

Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5417C/R	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1,0R	Heraeus, Hamburg
J221 Zentrifuge mit JS 13 Rotor	Beckman, München
Vakuumpumpe SpeedVac Savant	Savant Instr., Holbrook (USA)

## 3.16 Software

Quantity One V 4.4.0 (ChemiDoc)	Bio-Rad, München
GelCaptureEntry (DNA-Gel)	Intas, Göttingen
KamCon (Immunfluoreszenzmikroskopie)	Intas, Göttingen
iPhoto 06 (Bildbearbeitung, Datenbank)	Apple, Cupertino, USA
BioX 1.0 (Sequenzanalyse)	Erik Lagercrantz, USA
Keynote 2 (Grafikdesign)	Apple, Cupertino, USA
TeXShop 2.18 (Textverarbeitung)	Richard Koch, Eugene, USA



# Kapitel 4

## Methoden

### 4.1 Zellkulturtechniken

Alle Zellen 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, je nach Wachstumsrate. Dazu wurden die Zellen mit PBSM gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Danach wurden sie unter Zugabe von 9 ml des entsprechenden Mediums sofort resuspendiert und verdünnt in 20 ml frischem Medium mit 5-10% FKS umgesetzt. Die Art des Mediums und der FKS-Anteil variierte in Abhängigkeit von der Zelllinie, wie in **Tabelle 4.1** aufgeführt.

**Tabelle 4.1:** Zellkulturbedingungen der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Medium	FKS
Vero	DMEM	5%
BHK-21	MEM	5%
L-Zellen	MEM	10%
sog9	MEM	10%
HBE	DMEM/Ham's	5%
MDBK	DMEM	5%

### 4.1.1 DAPI-Test

Um eine Kontamination der Zellen durch Mykoplasmen auszuschließen, wurde, neben der Verwendung von UV-bestrahltem FKS und einem regelmäßig durchgeführten ELISA, eine DAPI-Färbung vorgenommen. Das Fluorochrom 4-6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) bindet an DNA. Bei Mykoplasmenbefall einer Zelle erscheinen die Bakterien bzw. deren DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop als kleine blau leuchtende Punkte, die außerhalb des Kerns entlang der Zellmembran lokalisiert sind. Ferner diente der DAPI-Test nach der Antikörperinkubation zur Sichtbarmachung von Zellkernen während des Immunfluoreszenztests. Dabei wurde das schnelle Auffinden der korrekten Betrachtungsebene für den Zellrasen und das Betrachten von Synzytien vereinfacht.

Für den DAPI-Test wurden Zellen auf Deckgläschen in 24-Napf-Platten ausgesät. Nach 5 h wurde mit PBS gewaschen und 250 µl DAPI zu jedem Ansatz hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C folgten zwei Waschschriffe mit PBS. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

### 4.1.2 Umgang mit Gefrierkulturen

Gefrierkulturen von Zelllinien wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Kryokonservierung wurde eine zu 80% konfluent bewachsene 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wie oben beschrieben trypsiniert und in 9 ml Medium und 10% FKS suspendiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 3 ml Einfriermedium, bestehend aus dem entsprechenden Medium, 10% FKS und steril-filtrierte 10% DMSO, resuspendiert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Aliquots zu 1 ml bei -80 °C in einem Isopropanolbad, um sicherzustellen, dass die Zellen langsam heruntergekühlt wurden (ca. 1 °C/min). Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen mit Medium und in der ersten Passage nach dem Auftauen mit 10% FKS versetzt. Abhängig von der Zelllinie wurden die Zellen entweder zu Anfang in einem Well einer 6-Napf-Platte oder sofort in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät. Sobald der Zellrasen konfluent gewachsen war, wurden die Zellen gemäß der obigen Anleitung kultiviert.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR

Die PCR-Technik wurde in dieser Arbeit zum Klonieren der verschiedenen F-Konstrukte genutzt. Die betreffenden Konstrukte mit ihren spezifischen Primern sind in **Tabelle 4.9** aufgeführt. Die Sequenzen der Primer sind in **Tabelle 3.2** vermerkt, so dass hier nur die allgemeine Vorgehensweise beschrieben wird.

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine *in vitro*-Technik (Saiki et al., 1985; 1988), mit der DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, mit Hilfe von DNA-Polymerasen vervielfältigt werden können. 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 die Wahl der Primer können ortsspezifisch Veränderungen 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. Diese Reparatur-Eigenschaft verringert die Wahrscheinlichkeit, dass unerwünschte Mutationen entstehen.

Soweit dies nicht anders beschrieben ist, wurden alle PCRs nach dem Pipettierschema der **Tabelle 4.2** und unter den in **Tabelle 4.3** angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Elongationszeit "X" bei 72 °C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Abschnittes. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Synthese von je 500 Nukleotiden durch die *Pfu*-Polymerase 1 min berechnet. Wurde stattdessen die *Taq* bzw. *GoTaq*-Polymerase (**4.2.11**) eingesetzt, so ging man davon aus, dass diese 2000 Nukleotide in der Minute synthetisierte.

Es wurde zunächst nur der Ansatz ohne Polymerase in das PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und für ca. 20 sec bei 75 °C im *thermocycler* inkubiert. Dann erst wurde die *Pfu*-Polymerase hinzugegeben und die *Pfu*-PCR gestartet. Diese sogenannte *Hot Start PCR* verhindert, dass die Polymerase während der Aufwärmphase unspezifische DNA-Stränge synthetisiert.

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

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

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

	75 °C	bis zum Abbruch
	95 °C	2 min
10 Zyklen	95 °C	30 sec
	56 °C (-0,2 °C)	30 sec
	72 °C	X min
15 Zyklen	95 °C	30 sec
	54 °C	30 sec
	72 °C	X min (+10 sec)
	72 °C	7 min
	4 °C	bis zum Abbruch

### 4.2.2 Erzeugung von chimären Genen mittels Hybridisierungs-PCR

Neben der Standard-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Hybridisierungs-PCR angewandt. Diese ermöglichte es, Punktmutationen an eine beliebige Position in einem Gen zu erzeugen oder aber ein Fusionsprotein zu erstellen.

**Abbildung 4.1** zeigt den Einsatz der Hybridisierungs-PCR am Beispiel der Erzeugung des Gens für bFsyn-sol-GFP. Hier wurde das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (*enhanced GFP*) am 3'-Ende angefügt.

Zunächst wurden zwei getrennte PCRs vorgenommen, eine mit dem Primerpaar 1 und 2 und die andere mit den Primern 3 und 4, die jeweils das gewünschte Einzelgenfragment erzeugten. Einzige Besonderheit dabei waren die Primer, die sich an dem Übergang zum Fremdgen anlagerten. Diese Primer (**Abb. 4.1**, Primer 2 und 3) besaßen einen überhängenden Teil (ca. 12-16 nt), der nicht an die erste Matrizen-DNA band, sondern an die Fremd-DNA des anzufügenden Gens. Auf diese Weise wurden im ersten PCR-Ansatz Fragmente erzeugt, die einen zum Partnergen komplementären Bereich besaßen. Die entstandenen Fragmente wurden aus einem Agrosegel gereinigt und die DNA-Konzentrationen bestimmt. Anschließend wurden sie in einem äquimolaren Verhältnis miteinander gemischt (**Tab. 4.4**) und wie in **Tabelle 4.5** dargestellt, im *thermocycler* hybridisiert. Bei diesem Schritt, ohne die Mutationsprimer (im Beispiel Primer 2 und 3), wurden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen voneinander getrennt und dann wieder miteinander hybridisiert. Dabei entstanden zu einem gewissen Anteil Chimäre aus den beiden Genen, die über die zuvor hinzugefügten komplementären Überhängen miteinander hybridisierten. Die im Reaktionsansatz enthaltene *Pfu*-Polymerase füllte entsprechende Überhänge auf. Anschließend wurden dem Ansatz die flankierenden Primer (im Beispiel Primer 1 und 4) zur Vervielfältigung des gesamten Konstrukts zugegeben und die *Pfu*-PCR gestartet.

Für die Fälle, in denen es möglich war, die fremde DNA-Sequenz in einen entsprechenden Primer einzubauen, wurde so verfahren (z.B. 6xHis-Tag oder 1xFLAG-Tag). Dadurch war es möglich mit einem *Pfu*-PCR-Lauf das chimäre Gen zu erzeugen, ohne Gebrauch von der obigen Hybridisierungs-PCR machen zu müssen.

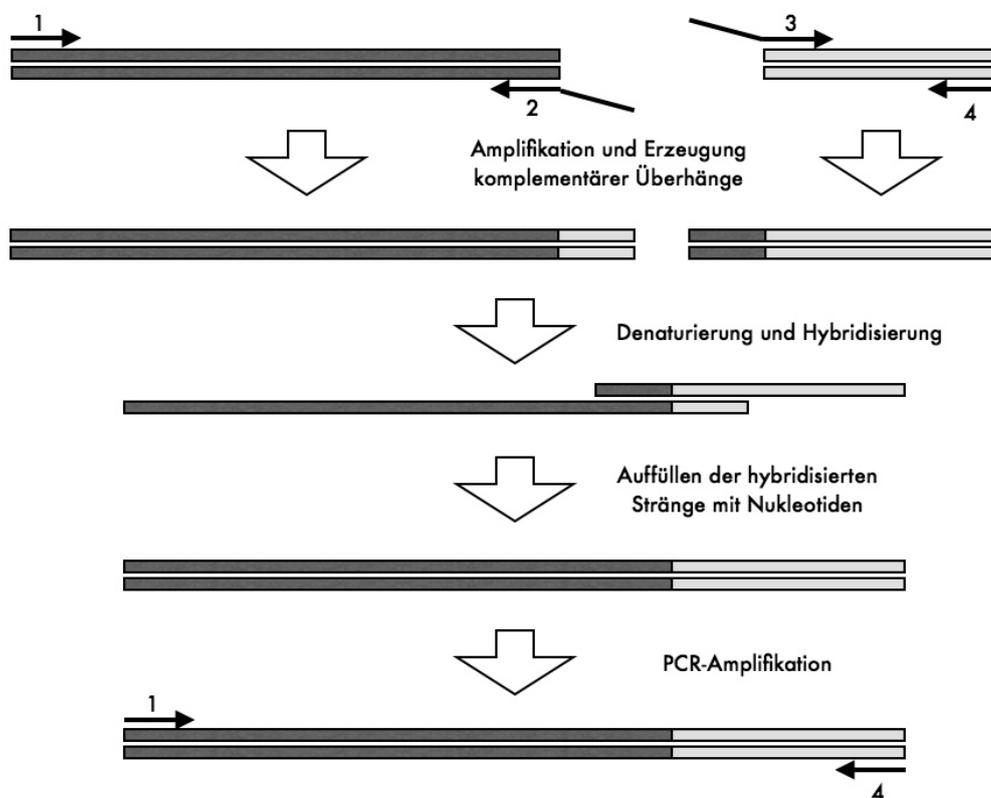
Um die spätere Klonierung der Amplifikate zu ermöglichen, enthielten die äußeren Primer jeweils eine Schnittstelle für ein Restriktionssenzym.

**Tabelle 4.4:** Standard-Ansatz für die Hybridisierung

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 45 µl
10x <i>Pfu</i> -Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> )	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
DNA-Fragment 1	X µl (50-100 ng)
DNA-Fragment 2	X µl (äquimolar zu 1)
<i>Pfu</i> -Polymerase	5 µl

**Tabelle 4.5:** Bedingungen der Hybridisierung der PCR-Fragmente

	95 °C	1 min
2 Zyklen	95 °C	2 min
	60 °C	2 min
	72 °C	X min
	72 °C	7 min
	4 °C	bis zum Abbruch



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Erzeugung eines Fusionsproteins mittels Hybridisierungs-PCR am Beispiel des bFsyn-sol-GFP-Konstrukts. Die DNA-Abschnitte sind in Form von hell- und dunkelgrauen Balken und die entsprechenden Primer als nummerierte Pfeile dargestellt.

### 4.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten der Klonierung wurden die PCR-Produkte und Vektoren gereinigt, um Enzyme und Salze von der DNA zu entfernen. Nach Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen bzw. vor der Hybridisierung wurde die im Gel aufgetrennte DNA mit dem *Gel Extraction Kit* aus dem Gel isoliert und gereinigt. Für alle anderen Reinigungen wurde das *PCR-Purification Kit* verwendet. Die Anwendungen erfolgten entsprechend dem Herstellerprotokoll. Sollte die gereinigte DNA anschließend in einen Restriktionsverdau eingesetzt werden, so wurde sie bei der Reinigung zuvor mit Wasser anstatt mit Eluierungs-Puffer eluiert.

### 4.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Durch Bestimmung des Absorptionswertes einer DNA-Lösung bei 260 nm wurde ihre Konzentration errechnet. Für die Messung wurde das *GeneQuant II UV Spectrophotometer* und eine 10fache Verdünnung (abhängig von der Konzentration und entsprechenden Absorption der jeweiligen DNA) der DNA in H<sub>2</sub>O verwendet. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

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

Für doppelsträngige DNA galt der Koeffizient 50.

### 4.2.5 Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind, eine bestimmte Abfolge von vier bis acht Basenpaaren in einem DNA-Strang zu erkennen und diesen dann daraufhin zu spalten (Luria, 1953). Diese Enzyme unterscheiden sich in ihrer Spezifität und der Art, wie und wo sie die DNA spalten. Sie werden in drei Kategorien unterteilt. Für die vorliegende Arbeit waren nur Typ II Restriktionsendonukleasen interessant. Diese führen an bestimmten, meist palindromischen Erkennungssequenzen oder in deren Nähe Doppelstrangbrüche in die DNA ein, wobei entweder stumpfe oder überhängende Enden entstehen (Roberts & Macelis, 1996).

In dieser Arbeit wurden Restriktionsschnitte entweder zu analytischen Zwecken oder im Vorfeld einer Ligation eingesetzt. Für die Spaltung von 1 µg Plasmid-DNA wurden 2 U des entsprechenden Enzyms eingesetzt. Sollten die Enden eines PCR-Produkts geschnitten werden, so wurden 20 U pro Reaktionsansatz verwendet. Die Spaltungen erfolgten entsprechend den Herstellerangaben. Plasmide wurden 1 bis 2 h im Restriktionsansatz bei 37 °C inkubiert, PCR-Produkte über Nacht.

#### **4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen. Dies kann sowohl zu analytischen (unter Verwendung von TBE-Puffer) als auch zu präparativen Zwecken (unter Verwendung von TAE-Puffer) genutzt werden. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente lag die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 2,5%. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht, welches zwischen die Basen der DNA interkaliert 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 5 min gefärbt, für 10 min gewässert und unter UV-Strahlung (254 nm) betrachtet.

#### **4.2.7 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 bis 6 wurde das restliche Probenmaterial gegeben. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 80 Volt für ca. 1 h 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 dem

UV-Licht wurden die gesuchten DNA-Banden mit Hilfe von kleinen Skalpelleinschnitten im Gel markiert. Diese Markierungen wurden auf den nicht gefärbten Teil des Gels übertragen, und so konnten die Proben aus diesem isoliert werden. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des *Gel Extraction Kit* nach Anleitung des Herstellers.

#### 4.2.8 Ligation von DNA

Für die Ligation eines PCR-Produktes mit einem Vektor wurden beide im Vorfeld mit Restriktionsendonukleasen behandelt, 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 (**Tab. 4.6**) wurde über Nacht bei 14 °C oder 1 bis 2 h bei RT durchgeführt. Insert- und Vektor-DNA standen in einem molaren Verhältnis von 6:1.

**Tabelle 4.6:** Standard-Ligations-Ansatz

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl
Vektor-DNA (50-100 ng)	X µl
Insert-DNA	X µl
10x Ligase-Puffer	2 µl
Ligase	(5 U/µl) 2 µl

Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz mit dem entsprechenden Volumen Wasser anstelle der Insert-DNA.

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

5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie *E. coli* XL1-Blue 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 h unter gleichen Bedingungen bis zu einer  $OD_{595nm} = 0,5$  inkubiert. Dann wurden die Bakterien pelletiert, in 75 ml TFB I resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert.

**Tabelle 4.7:** Standard-Ansatz für eine Kolonie-PCR

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 15 µl
10x Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
dNTP (10 mM)	0,3 µl
Primer sense (10 µM)	0,45 µl
Primer antisense (10 µM)	0,45 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1 µl

Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 10 ml TFB II resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

#### 4.2.10 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

10% des Ligationsansatzes wurden zu 100 µl chemisch kompetenten Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde für 30 sec in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt und sofort danach für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,25 ml LB-Medium folgte eine einstündige Inkubation auf einem Schüttler bei 37 °C und 180 U/min. Die Bakterien wurden auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen und für 12-18 h bei 37 °C inkubiert, bis gut sichtbare Kolonien zu erkennen waren.

#### 4.2.11 Kolonie-PCR

Da nicht alle gewachsenen Kolonien auch das Plasmid mit dem gewünschten Insert trugen, wurde dieses mit einer PCR überprüft. Dazu wurde eine Bakterienkolonie in ein PCR-Röhrchen mit dem entsprechenden Reaktionsansatz (**Tab. 4.7**) gegeben und die gleiche Kolonie in ein Eppendorf-Röhrchen mit 0,25 ml LB-Medium + Ampicillin überführt. Konnte das Insert mit spezifischen Primern amplifiziert werden, so standen Bakterien dieses Klons im Eppendorf-Röhrchen mit LB-Medium für eine weitere Vermehrung zur Verfügung.

Die Durchführung erfolgte, indem zunächst die Reaktionsgefäße mit den PCR-Ansätzen und dem Medium vorbereitet wurden. Mit einer 10 µl-Pipette mit aufgesetzter steriler Pipettenspitze

ze wurde dann eine Kolonie von der Agarplatte abgenommen und fünfmal im PCR-Röhrchen resuspendiert. Anschließend ging man mit der gleichen Pipettenspitze in das Eppendorf-Röhrchen und resuspendierte die Kolonie fünfmal im LB-Medium. Auf diese Weise stand der Bakterienklon gleichzeitig für die PCR und für eine eventuelle spätere Bakterienvermehrung zur Verfügung. Die PCR wurde in einem *thermocycler* unter den in **Tabelle 4.7** angegebenen Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 4.8:** Bedingungen der Kolonie-PCR

	95 °C	1 min
25 Zyklen	95 °C	15 sec
	50 °C	30 sec
	72 °C	X min
	75 °C	5 min
	4 °C	bis zum Abbruch

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 für maximal sieben Tage aufbewahrt.

#### 4.2.12 Präparation von Plasmid-DNA

Als Ausgangsmaterial wurden 30 bzw. 100 ml einer LB-Übernachtskultur verwendet, die mit Ampicillin (50 mg/l Medium) und 30 bzw. 100 µl LB-Bakterien-Gemisch aus der Kolonie-PCR beimpft wurde. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit* nach den Angaben des Herstellers.

#### 4.2.13 Sequenzierung

Die Plasmide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Martinsried) mit dem Programm *Value Read* sequenziert.

Zur Überprüfung der Sequenzen wurde das Internet-Programm *BLAST*<sup>1</sup> (NCBI) benutzt. Das

<sup>1</sup>[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)

Umschreiben der Komplementärsequenzen und das Translatieren in die Aminosäuresequenzen erfolgten mit der Software *BioX 1.0* (Erik Lagercrantz, Uppsala, Schweden) oder dem Internetbrowser-Programm *Translate Tool*<sup>2</sup> (ExPASy).

## Klonierungen

Entsprechend dieses Ablaufes wurden in der vorliegenden Arbeit die cDNAs für lösliche BRSV- und HRSV-F-Protein-cDNAs in Expressionsvektoren kloniert. Die für die verschiedenen Konstrukte verwendeten Primer (**Tab. 3.2**) und Matrizen-DNA sind der **Tabelle 4.9** zu entnehmen.

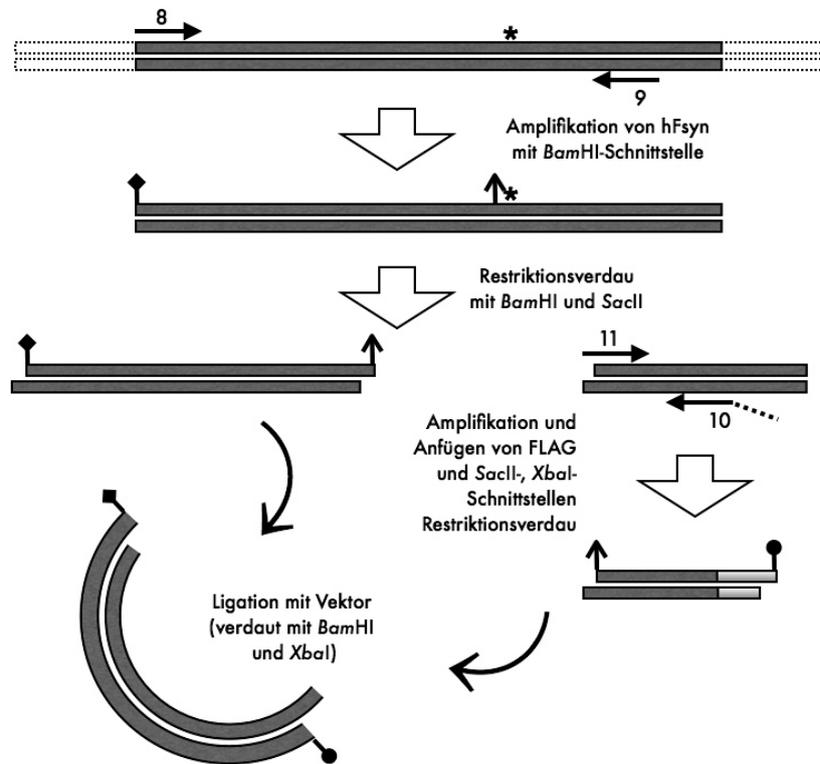
**Tabelle 4.9:** Klonierte F-Proteinkonstrukte und dafür verwendete Primer

Konstrukt	Primer	Matrizen-DNA
pCG1-bFsyn	1, 7	bFsyn (G. Keil)
pCG1-bFsyn-sol-GFP	1, 2, 3, 4	pCG1-bFsyn, eGFP
pCG1-bFsyn-sol-6His	1, 12	pCG1-bFsyn
pCG1-bFsyn-sol-FLAG	1, 2	pCG1-bFsyn
pCG1-hFsyn-sol	8,19	hFsyn (K. Überla)
pCG1-hFsyn-sol-FLAG	8, 9, 10, 11	pCG1-hFsyn

Die Klonierung des pCG1-hFsyn-sol-FLAG gestaltete sich schwieriger als erwartet, da der *antisense*-Primer 10 nicht nur am 3'-Ende, sondern auch mitten im Gen binden konnte. Da sehr nah an dieser Stelle auch eine singuläre *SacII*-Schnittstelle vorhanden war, wurde zunächst das Fragment hFsyn mit den Primern 8 und 9 in der PCR synthetisiert. Dieses Produkt wurde anschließend mit dem Enzym *SacII* verdaut. Dieser Verdau produzierte zwei DNA-Stücke: Ein Fragment, das die Basenpaare 1-1289 umfasste, und ein weiteres, das den Basenpaaren 1290-1575 entsprach. Nach einer Gelreinigung diente letzteres als Matrize für die darauffolgende PCR-Reaktion mit den Primern 11 und 10. Das Produkt bestand aus dem kleineren Fragment mit einem angefügten Abschnitt für die FLAG-Aminosäuren, flankiert von den Restriktionsstellen *SacII* und *XbaI*. Es wurde über Nacht mit den beiden Enzymen verdaut und über ein Agrosegel gereinigt. Nachdem die Konzentrationen der zwei DNA-Abschnitte bestimmt wurden, konnten sie im äquimolaren Verhältnis und dann in sechsfachem Überschuss mit der offenen,

<sup>2</sup>[www.expasy.ch/cgi-bin/dna-aa](http://www.expasy.ch/cgi-bin/dna-aa)

phosphorylierten pCG1-Vektor-DNA (*Bam*HI, *Xba*I) ligiert werden.



**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung der Klonierung von pCG1-hFsyn-sol-FLAG. Die DNA-Abschnitte sind in Form Balken und die entsprechenden Primer als nummerierte Pfeile dargestellt. Dunkelgraue Balken bezeichnen die DNA des F-Gens, hellgraue Balken die der FLAG-Markierung und gestrichelte Balken stellen flankierende Bereiche des Ursprungsvektors dar, die für die beschriebene Klonierung unbedeutend waren. Senkrechte Symbollinien auf der DNA bedeuten verschiedene Restriktionsschnittstellen (siehe Text). Der Stern zeigt auf die Stelle auf dem hFsyn Gen, an dem der Primer 10 bindet.

## 4.3 Virologische Methoden

### 4.3.1 Virusanzucht von HRSV und HRSV-GFP

Die Vermehrung von HRSV und HRSV-GFP erfolgte auf HBE-Zellen. Dafür wurden  $4 \cdot 10^6$  Zellen in eine  $25 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche ausgesät und zeitgleich mit einer MOI von 1 PFU/Zelle infiziert. Die infizierten Zellen wurden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Medium und 5% FKS. Virus und Zellen wurden für weitere 2 Tage inkubiert. Zur Virusernte wurde der virushaltige Zellkulturüberstand mit 0,1 M  $\text{MgSO}_4$  und 0,05 M HEPES pH 7,4 (Endkonzentrationen) versetzt, abgenommen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $1559 \times g$  entfernt. Das Virus wurde in 1 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.3.2 Virusanzucht von BRSV, BRSV-GFP und BRSV $\Delta$ G-GFP

Für die Virusanzucht von BRSV, BRSV-GFP und BRSV $\Delta$ G-GFP wurden MDBK-Zellen verwendet. Am Vortag wurden die Zellen in eine  $75 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche so ausgesät, dass am Tag der Infektion ein zu 60% konfluenter Monolayer vorlag. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1. Die infizierten Zellen wurden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre im Brutschrank für 3 h auf einem Schwenker inkubiert. Danach wurde das Inoculum abgenommen und frisches Medium mit 3% FKS auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 3-6 Tagen. Sobald ein zytopathischer Effekt erkennbar war, wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zelltrümmer bei  $1500 \times g$  für 15 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde schließlich in 1 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.3.3 Virustitration

Um den Titer der infektiösen Viruspartikel aus einer Virusernte zu bestimmen, wurde ein sogenannter Plaquetest durchgeführt. Dafür wurden jeweils  $2 \cdot 10^2$  Vero-Zellen in den Vertiefungen einer 24-Napf-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine Verdünnungsreihe (im Doppelansatz) der Virussuspension in 10er-Schritten in EDulb erstellt. Die Zellen in der Platte wurden mit Medium gewaschen und dann mit jeweils 0,2 ml der

einzelnen Verdünnungsstufen versehen. Nach einer Inkubation von 3 h auf einem Schwenker wurde jede Vertiefung mit 1 ml Methylzellulose überschichtet. Anschließend wurden die Zellen für 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Methylzellulose wurde abgenommen und nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, wurden diese mit 3%-igem Paraformaldehyd fixiert (20 min bei RT). Die fixierten Zellen wurden zweimal mit 0,1 M Glycin-Lösung gewaschen, um das Paraformaldehyd wieder zu entfernen. Waren die Zellen mit einem der GFP-Viren infiziert, so konnte nun mit dem Auszählen der Plaques am Fluoreszenzmikroskop begonnen werden. Andernfalls wurde mit der Permeabilisierung der Zellen durch die Zugabe von 0,2% Triton-X-100 fortgefahren, um eine nachfolgende Färbung zu ermöglichen. Der erste Antikörper (mAK 18G6) war gegen das RSV Matrix-Protein gerichtet und wurde vor der Verwendung 1:25 in PBS verdünnt. Pro Vertiefung wurde ein Volumen von 200 µl der Antikörperverdünnung aufgetragen. Es erfolgte eine Inkubation von 1 h bei RT und anschließend dreimaliges Waschen mit PBS wurden. Der peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-HRP) wurde 1:500 in PBS verdünnt und anschließend für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Wieder wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend fand die Zugabe des Substrats in Form von 300 µl AEC pro Vertiefung statt. Die darauf folgende Inkubationszeit betrug 10 bis 15 min, bis das Substrat abgenommen und die Platte zweimal mit Leitungswasser gewaschen wurde. Schließlich wurden die gefärbten Plaques am Mikroskop ausgezählt und der Virustiter in *plaque forming units* (plaque-bildende Einheiten) pro ml (PFU/ml) angegeben.

### **Infizierbarkeit von L- und sog9-Zellen mit BRSVΔG-GFP**

Bei diesem Experiment handelte es sich um eine spezielle Form der Virustritration. Um die BRSVΔG-GFP-Infektion von Zielzellen nach einer bestimmten Adsorptionszeit zu untersuchen, wurden  $2,5 * 10^4$  Zellen in 96-Napf-Platten mit 10% FKS ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Medium gewaschen. Dann erfolgte die Infektion mit 400 plaque-bildenden Einheiten einer Virussuspension in einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Vertiefung. Es folgte eine Inkubation für 0 und 180 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre auf einem Schwenker. Es folgten zwei Waschschrte mit Medium, wodurch ungebundene Viren abgespült wurden. Anschließend wurden die Zellen mit Methylzellulose überschichtet und für 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit 3%-igem Paraformaldehyd fixiert (20 min bei RT) und die grün-fluoreszierenden Plaques am Fluoreszenz-

mikroskop ausgezählt. Die eingesetzte Virusmenge wurde im Vorfeld empirisch bestimmt und stellte die Konzentration dar, die nach 3 h Inkubation eine sehr hohe, aber gleichzeitig abzählbare Anzahl an Plaques hervorbrachte. Diese Konzentration ist unterschiedlich von Zelllinie zu Zelllinie und Virus zu Virus. Im vorliegenden Experiment wurden L- und sog9-Zellen mit BRSVΔG-GFP infiziert. Zur Erlangung des 0 min Wertes wurde das Virus auf die Zellen gegeben und sofort wieder abgenommen. Diese Kontrolle diente als Waschkontrolle und sollte die Menge an Inoculum-Virus darstellen, dass trotz beendeter Adsorptionszeit und zweimaligem Waschen immernoch auf den Zellen verblieb und entsprechend zusätzliche Plaques bilden konnte.

#### 4.3.4 Infektion von Deckglaskulturen

Für Infektionsexperimente mit RSV wurden zunächst sterile Deckgläschen in die Vertiefungen von 24-Napf-Platten eingesetzt. Darauf wurden Vero-Zellen mit einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$  Zellen und 10% FKS ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Am Folgetag wurden die Deckgläschen mit EDulb gewaschen und die Infektion mit HRSV bzw. BRSV mit einer MOI von 0,1 durchgeführt, indem die entsprechende Menge Virus in einem Gesamtvolumen von 200 µl resuspendiert und auf die Zellen pipettiert wurde. Nach 3 h Inkubation auf dem Schwenker im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium und 3% FKS ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 37 °C wurden die Zellen auf den Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 3%-igem Paraformaldehyd fixiert (20 min bei RT). Danach wurden die Zellen zweimal mit 0,1 M Glycin-Lösung gewaschen, um das Paraformaldehyd wieder zu entfernen. Die Deckgläschen wurden dann für den Immunfluoreszenztest (4.6.1) vorbereitet oder, bei GFP-Viren, mit Mowiol eingebettet und die GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop detektiert.

## 4.4 Expression von Fremd-DNA in eukaryotischen Zellen

### 4.4.1 Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen

Unter 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, also nur transient exprimiert wird, spricht man von einer transienten Transfektion.

Für die Transfektion wurden in 6-Napf-Platten am Vortag 3 ml BHK-21-Zellen mit einer Konzentration von  $1,8 \cdot 10^5$  Zellen pro ml in EMEM mit 10% FKS ausgesät. Für Platten mit 24 Vertiefungen wurde 1 ml BHK-21-Zellen derselben Konzentration in ebenfalls EMEM mit 10% FKS ausgesät.

Die Zellen waren am Tag der Transfektion 80-100% konfluent.

Die Transfektion erfolgte mittels *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls, sowie einer Veröffentlichung von Dalby *et al.* (Dalby *et al.*, 2004). Dabei wurden die Zellen in den 6-Napf-Platten mit jeweils 3 µg DNA pro Vertiefung und die Zellen in den 24-Napf-Platten mit 1 µg DNA pro Vertiefung transfiziert.

Nach der Transfektion wurden die Zellen weiterhin bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## 4.5 Anreicherung und Reinigung von löslichen Proteinen

### 4.5.1 Transiente Transfektion und Medienwahl

Um eine ausreichende Menge gereinigten F-Proteins zu erhalten, dessen Präparation in einem überschaubaren Maßstab ablaufen sollte, wurde in der vorliegenden Arbeit pro gewünschtem Proteinkonstrukt BHK-21-Zellen in 2 Gewebekulturflaschen der Größe 175 cm<sup>2</sup> in EMEM und 10% FKS inkubiert, bis sie eine Konfluenz von zu 90% erreicht hatten. Die Mengen für eine Transfektionsreaktion mit *Lipofectamine 2000 Reagent* wurde entsprechend den Herstellerangaben hochgerechnet. Pro Reaktion wurden 48,5 µg DNA und 130 µl Lipofectamine mit jeweils 4 ml Medium (ohne Antibiotika) vorbereitet. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz

auf die Zellen gegeben, welche zuvor mit 20 ml Medium und 3% FKS vorbereitet worden waren. Das Medium für die Zellen bestand zu 50% aus normalem EMEM und zu 50% aus MEM + Glutamax Medium. Letzteres enthielt eine stabile Form des Glutamins, welches für die verwendeten BHK-21-Zellen offenbar schwer zu verstoffwechseln war. Dieser Umstand resultierte in einem verlangsamten Wachstum und zeigte sich günstig, da so die Zellen hoher Konfluenz während der Transfektion noch viele Tage auf dem Flaschenboden haften blieben, anstatt sich bei zu engem Zell-Zell-Kontakt abzulösen. Auf die Weise konnte pro erfolgter Transfektion über einen langen Zeitraum Zellkulturüberstand geerntet und F-Protein daraus gereinigt werden.

#### **4.5.2 Ernte und Lagerung von Zellkulturüberstand**

Am Tag nach der Transfektion wurde der gesamte Überstand der Flasche abgenommen und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Der Zellrasen in der Flasche wurde mit 20 ml Medium (50% EMEM und 50% MEM + Glutamax) versehen und wieder bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde bei 2800 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der zelltrümmer-freie Überstand wurde bei 4 °C bis zur Proteinanreicherung gelagert. Da die Qualität des F-Proteins in der Lösung mit der Zeit abnahm, wurde nur an den ersten 3 Tagen, also jeweils 24, 48 und 72 h nach Transfektion, der Zellkulturüberstand geerntet und durch neues Mediumgemisch (siehe oben) bis zum darauffolgenden Tag ersetzt. In der Regel betrug das Gesamtvolumen aus Zellkulturüberständen ca. 170 ml.

#### **4.5.3 Filtrationskonzentrierung**

Am Tag 3 nach Transfektion wurden die gesammelten Zellkulturüberstände durch einen 0,45 µm-Filter vorfiltriert. Anschließend wurde die Lösung durch einen Zentrifugationsfilter (*U-Tube Concentrator* 15H-30, 30 kDa) filtriert. Hierbei wurden der Lösung alle Proteine unter 30 kDa Molekulargewicht entzogen. Nachdem das Gesamtvolumen um den Faktor 10 auf ca. 17 ml verringert wurde, wurde mit der Reinigung fortgefahren.

#### 4.5.4 Affinitätsreinigung

Zur Reinigung von Proteinen mit einem FLAG-Epitop wurde ein Anti-FLAG-M2-Affinitätsgel (Sigma) verwendet. Nachdem das Gel 1:6 mit PBS verdünnt worden war, erhielt man eine Vorratslösung, die so eingesetzt wurde, dass sie alle vorhandenen FLAG-markierten F-Proteine aus den ankonzentrierten Zellkulturüberständen fällen konnte. Diese Konzentration wurde bestimmt, indem nach der Immunpräzipitation und anschließender Zentrifugation der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen wurde und im Western Blot auf Anwesenheit von FLAG mittels Anti-FLAG-PO-Antikörper getestet wurde (Daten nicht gezeigt). In der Arbeit lag die einzusetzende Konzentration der obigen Vorratslösung bei ca. 24 µl pro ml Konzentrat. Um sicherzustellen, dass alle FLAG-markierten Proteine in der Lösung gefällt wurden, wurden 400 µl des Anti-FLAG-M2-Gels pro Präparation verwendet. Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht in einem 15 ml-Röhrchen bei 4 °C in einem Überkopfschüttler.

#### 4.5.5 Kompetitive Elution

Am nächsten Tag wurden die Röhrchen mit dem Anti-FLAG-M2-Affinitätsgel und dem Zellkulturkonzentrat bei 2800 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und diente später als Kontrolle bei der Immunpräzipitation. Das Gel-Pellet wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml PBS gemischt und bei 20000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Um die FLAG-markierten F-Proteine aus dem Affinitätsgel zu lösen, wurden gereinigte FLAG-Peptide verwendet. Diese wurden gemäß den Herstellerangaben wie folgt eingesetzt: Die FLAG-Peptid-Vorratslösung mit der Konzentration von 5 mg/ml in PBS wurden 10%ig zu dem Volumen des verwendeten Affinitätsgels zu dem Pellet gegeben. Zusätzlich wurde 1 ml PBS zu dem Ansatz hinzupipettiert und für mindestens 2 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut bei 20000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand (ca. 1 ml) mit den gelösten F-FLAG-Proteinen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

### 4.5.6 Filtration zur Trennung der Monomere von den Oligomeren

Die gereinigte Fraktion von FLAG-markierten F-Proteinen wurde über eine Filtersäule (Ultra Free-MC) von den Proteinen und Proteinkomplexen gereinigt, deren Molekulargewicht weniger als 100 kDa betrug. Die Lösung wurde bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Zentrifugation dauerte nur wenige Minuten an und wurde so gewählt, dass 10% vom Gesamtvolumen im Retentat verblieben (in der Regel 100 µl). Auf diese Weise wurden monomere F-Proteine (ca. 65 kDa) von oligomeren F-Proteinen (ca. 130 kDa und ca. 200 kDa) getrennt und die Lösung weiter ankonzentriert.

Schließlich erhielt man eine aufgereinigte Protein-Lösung, worin FLAG-markierte Proteine um den Faktor 1400 - 1700 (je nach Präparationsablauf) spezifisch angereichert wurden. Die Proben wurden in 10 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert. Um die Präparation auf den Gehalt einer entsprechenden Menge löslichen F-Proteins hin zu testen, wurde 1 µl davon auf ein SDS-Gel geladen und per Western Blot und Anti-FLAG-PO-Antikörper nachgewiesen. Als Referenz diente, neben dem Molekulargewicht, eine F-Protein-lösung einer früheren erfolgreichen Präparation. Außerdem wurden 2-5 µl der Proteinpräparation einem Immunfluoreszenz-Bindungstest unterzogen, wodurch die Funktionalität der Proteine überprüft wurde.

## 4.6 Methoden zum Nachweis von Proteinen

### 4.6.1 Immunfluoreszenztest

Mit Hilfe von spezifischen Erst-Antikörpern, gerichtet gegen das gewünschte Protein, sowie fluoreszierenden Zweit-Antikörpern ist es möglich, die Expression des Proteins nachzuweisen. Außerdem kann das Lokalisationsverhalten des Proteins auf der Zelloberfläche oder innerhalb der Zelle bestimmt werden und zum Teil einzelnen Organellen zugeordnet werden.

Die Zellen, gewachsen auf Deckgläschen in 24-Napf-Platten, standen nach der Transfektion für den Immunfluoreszenztest zur Verfügung. Sie wurden mit 3%igem Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Es folgten ein Waschschriff und eine Inkubation von 5 min mit 0,1 M PBS-Glycin. Zum Nachweis von Proteinen, die nicht an der Oberfläche, sondern intrazellulär lokalisiert waren, wurden die Zellen mit 0,2% Triton X-100 für 5 min bei RT inkubiert. Das

Detergenz permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht es somit Antikörpern, in die Zelle einzudringen. Standardmäßig wurde dieser Schritt mit jeder Immunfluoreszenz-Probe unternommen, um die Grundexpression des zu detektierenden Proteins abzuschätzen.

Zur Detektion des F-Proteins wurde als Erst-Antikörper Maus-Anti-RSV-F (Serotec) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS + 1% BSA verwendet. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite auf einen 20 µl-Tropfen dieser Antikörperverdünnung gelegt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT. Nach der Inkubation folgten 3 Waschschrte mit PBSM innerhalb der Vertiefungen der 24-Napf-Platte.

Zum Nachweis des Erst-Antikörpers wurde der Ziege-Anti-Maus-FITC-Antikörper in der Verdünnung 1:200 in PBS + 1% BSA eingesetzt. Erneut wurden die Deckgläschen mit der Zellseite auf einen 20 µl-Tropfen der zuvor zentrifugierten Antikörperverdünnung gelegt und im Dunkeln 1h lang bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBSM. Anschließend wurde noch einmal mit Wasser gewaschen, um Salzreste zu entfernen.

Die Deckgläser wurden mit 37 °C warmem Mowiol auf einem Objektträger eingebettet. Für die lichtmikroskopische Betrachtung, sowie für die Immunfluoreszenz wurde ein Zeiss *Axioplan 2* Mikroskop genutzt.

Die grafische Bearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen hinsichtlich Intensität und Kontrast wurde unter gleichen Bedingungen mit iPhoto 6 (Apple) durchgeführt.

Die verwendeten Antikörper, sowie deren Verdünnungen sind **Tabelle 3.3** zu entnehmen.

## 4.6.2 Lysatanalyse von Proteinen

Durch die Lysatanalyse war es möglich, die Gesamtmenge eines bestimmten Proteins in der Zelle abzuschätzen. Die Sichtbarmachung erfolgte im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das gewünschte Protein.

Es wurden Zellen in 6-Napf-Platten ausgesät und am Tag darauf transfiziert. An Tag 3 wurde der Nachweis von Proteinen im Zelllysat vorgenommen. Dazu wurden die Zellen stets bei 4 °C gehalten und ausschließlich eiskalte Reagenzien verwendet. Auf diese Weise wurde versucht, die Proteine vor jeglichen Degradationsprozessen zu schützen.

Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und letztlich mit 1 ml PBS pro Vertiefung versehen. Mit einem Zellschaber wurden dann die Zellen von der Unterlage gelöst und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde bei 3700 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. In einigen Fällen wurde dieses Volumen auf bis zu 20 µl reduziert, um auch geringere Proteinmengen zu detektieren. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zelltrümmer bei 20000 x g und bei 4 °C für 30 min abzentrifugiert und der Überstand in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für die SDS-PAGE/Western Blot wurde ein entsprechendes Volumen 4xSDS-Probenpuffer zu den Proben gegeben und der Ansatz 10 min bei 96 °C erhitzt. Abweichend davon wurden in einigen Experimenten die Proben nicht bei 96 °C inkubiert. In diesen Fällen waren noch multimere F-Proteine im Western Blot nachweisbar. Jeweils 20 µl davon wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen und darauf nachgewiesen.

### **4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

In dieser Arbeit wurden Proteine mit Hilfe der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Trenngele hatten die Abmessungen 50 \* 80 \* 0,75 mm und eine Acrylamidkonzentration von 8%. Die Auftrennung erfolgte in der Regel unter nicht-reduzierenden Bedingungen, und die Proben wurden vorher nicht aufgekocht. Wurde eine reduzierende SDS-PAGE durchgeführt, so wurde dem Ansatz DTT mit einer Endkonzentration von 100 mM zugegeben und dann 10 min bei 96 °C erhitzt. Beim Auftragen der Proben auf das Gel wurde darauf geachtet, eine Spur zwischen DTT-behandelten Proben und dem Protein-Marker frei zulassen, damit letzterer korrekt im Gel aufgetrennt werden konnte und nicht durch hinüberdiffundiertes DTT beeinträchtigt wurde.

Die Elektrophorese erfolgte bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel bei 80 V, anschließend bei 140 V. Zur Sichtbarmachung des F-Proteins wurde die Gelelektrophorese nach Herauslaufen der Farbstoff-Front des Probenpuffers aus dem Gel für weitere 15 min fortgesetzt. Ansonsten wurde das Experiment beendet, sobald sich der Farbstoff bis auf 2 cm dem Gel-Ende genähert hatte.

Die verwendeten Marker (Fermentas) bestanden aus vorgefärbten Proteinen mit Molekularge-

wichten zwischen 11 und 170 bzw. 11 und 250 kDa und wurden mit SDS-Probenpuffer verdünnt aufgetragen.

#### 4.6.4 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel auf eine mit Wasser getränkte Nitrozellulosemembran (6 cm x 8 cm) mit Hilfe der Halb-Trocken-Blot-Technik (*semi-dry-blot*) transferiert (Towbin et al., 1979; Kyhse-Anderson et al., 1984). Auf die Graphitplatte (Anode) der Blotkammer 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>. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit Blocking Reagenz (0,5% in PBSM) über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei RT abgesättigt. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurde die Nitrozellulose dreimal 10 min mit PBSM-0,1% Tween auf einem Schwenker bei RT gewaschen. Zur Detektion des Antigens wurden 500 µl der Antikörperlösung auf die Membran gegeben und unter Parafilm für 1 h bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine dreimalige zehnmündige Inkubation mit 10 ml PBSM-0,1% Tween auf einem Schwenker. Folgte eine weitere Antikörperinkubation, z.B. mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, so wurde wie oben verfahren. Am Schluss wurde erneut dreimal gewaschen und dann einmalig mit PBSM. Die verwendeten Antikörper, sowie deren Verdünnungen sind **Tabelle 3.3** zu entnehmen.

Die Membran wurde fünf Minuten mit 1 ml *Super Signal Femto* bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenz des umgesetzten Substrats durch den gebundenen Peroxidasekomplex wurde im *ChemiDoc* sichtbar gemacht und fotografiert. Darüberhinaus gestattete die dazugehörige Software eine Quantifizierung der Bandenintensität. Diese Funktion war hilfreich, um den zeitlichen Verlauf der F-Proteinexpression bzw. -sekretion in den Zellkulturüberstand zu ermitteln.

## 4.7 Methoden zum Nachweis gebundener Proteine an Zellen

### 4.7.1 Immunfluoreszenz-Bindungstest

Diese Nachweismethode für an lebende Zellen gebundene lösliche F-Proteine wurde ähnlich einem Fluoreszenztest durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation mit dem löslichen Protein auf intakten Zellen ist es möglich dieses mit geeigneten Antikörpern nachzuweisen.

Zellen wurden in einer 24-Napf-Platte auf Deckgläsern so ausgesät, dass sie am Folgetag einen konfluenten Zellrasen bildeten. Um die Oberflächenstrukturen auf den Zellen nicht zu beschädigen, wurde keine Fixierung durchgeführt. Nach einmaligem Waschen mit PBS standen die Zellen zum Bindungstest zur Verfügung.

Dazu wurde das gereinigte Protein (bF-/hF-syn-sol-FLAG) in PBS verdünnt. Abhängig vom Ausgang der Proteinreinigung und des angeschlossenen Kontroll-Western Blots wurden entsprechend 2-5 µl pro Deckglas eingesetzt und mit PBS auf 20 µl aufgefüllt. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite auf einen Tropfen dieser Proteinverdünnung gelegt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 90 min bei RT. Nach der Inkubation folgten 3 Waschschriffe mit PBS innerhalb der Vertiefungen der 24-Napf-Platte.

Zum Nachweis des gebundenen F-Proteins wurde der Anti-RSV-FITC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 in PBS + 1% BSA eingesetzt. Erneut wurden die Deckgläschen mit der Zellseite auf einen 20 µl-Tropfen der zuvor zentrifugierten Antikörperverdünnung gelegt und im Dunkeln 1 h lang bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschschriffe mit PBS. Anschließend wurde zweimal mit Wasser gewaschen, um Salzreste zu entfernen.

Zur Färbung der Zellkerne wurden die Deckgläser mit 37 °C warmem Mowiol, welches DAPI enthielt (4 ng/ml Mowiol), auf einem Objektträger eingebettet und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Betrachtung der Immunfluoreszenz erfolgte an einem *Axioplan 2* Mikroskop und einem 63er Ölimmersionsoobjektiv.

Die grafische Bearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen hinsichtlich Intensität und Kontrast wurde unter gleichen Bedingungen mit *iPhoto 6* durchgeführt.

### 4.7.2 Western Blot-Bindungstest

Für diesen Bindungsnachweis wurden  $3 \times 10^5$  Vero-Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei  $150 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert und zusätzlich mit 5  $\mu\text{l}$  gereinigtem löslichem F-Protein versehen. Anschließend wurde der Ansatz für 90 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Suspension bei  $150 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt nicht gebundene F-Proteine und wurde zur späteren Verwendung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  verwahrt. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  kaltem PBS resuspendiert und erneut 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt, um nicht gebundene F-Proteine von den Zellen zu waschen.

Das Zellpellet wurde, wie in 4.6.2 beschrieben, in 20  $\mu\text{l}$  NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren lysiert, ggf. für 10 min bei  $96 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und am Ende das gesamte Volumen auf ein SDS-Gel aufgetragen und geblottet. Zum Nachweis von FLAG-markierten F-Proteinen wurde die Membran mit den Anti-FLAG-PO-Antikörper (1:1000 in PBSM verdünnt) 1 h bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und im Dunkeln inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde, nach Inkubation mit dem Substrat *SuperSignal Femto*, mit dem *ChemiDoc* detektiert.

## 4.8 Methoden zum Nachweis der Heparinbindung

### 4.8.1 Präzipitation mittels immobilisiertem Heparin

Heparin ist chemisch dem Heparansulfat, wie es in der extrazellulären Matrix tierischer Zellen vorkommt, sehr ähnlich und wurde in der Literatur zur Untersuchung von Heparansulfat verwendet (Krusat & Streckert, 1997; Feldman et al., 2000).

Gereinigtes b/hFsyn-sol-FLAG (etwa 4  $\mu\text{l}$ ) wurden über Nacht mit 50-100  $\mu\text{l}$  Heparin-Agarose bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Probe bei  $20000 \times g$  und bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert und der Überstand mit nicht gebundenen F-Proteinen abgenommen und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Das Sediment wurde dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen und schließlich in 20  $\mu\text{l}$  2xProbenpuffer 10 min bei  $96 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Dieser, sowie der vorherige Überstand wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Im Western Blot wurde mittels Anti-FLAG-PO-Antikörper F-Protein nachgewiesen.



# Kapitel 5

## Ergebnisse

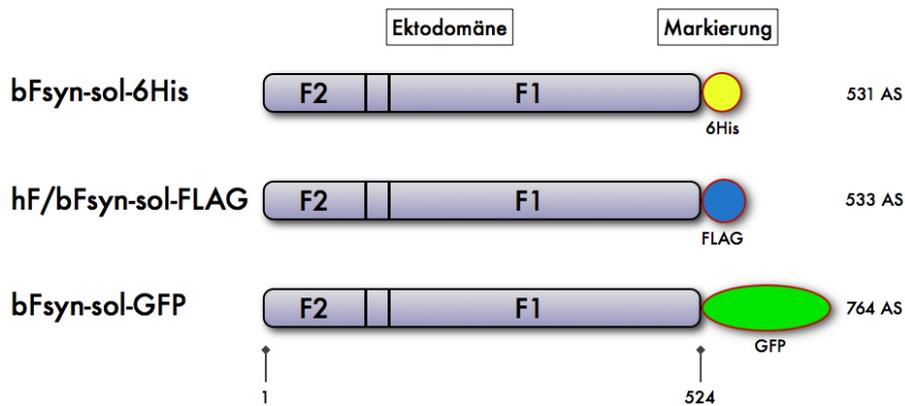
### 5.1 Erzeugung löslicher F-Proteine

#### 5.1.1 Konstruktion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, lösliche Formen (ohne Membrananker und zytoplasmatische Domäne) der F-Proteine von HRSV bzw. BRSV zu erzeugen, welche in der Lage waren, an Zielzellen von HRSV bzw. BRSV zu binden. Da zu Beginn die Nachweismethode noch nicht festgelegt war, wurden verschiedene Strategien ins Auge gefasst (u.a. Immunfluoreszenz-Mikroskopie, Western Blot, ELISA etc.). Zu diesem Zweck wurden die in **Abbildung 5.1** dargestellten löslichen F-Protein-Konstrukte erzeugt und entsprechend dem Klonierungsablauf (**4.2**) in den Expressionsvektor pCG1 integriert. Im Folgenden werden BRSV-F-Proteine mit bF und HRSV-F-Proteine mit hF abgekürzt. Die Zusätze syn und sol beschreiben die Natur des Proteins, wobei syn für synthetisch und sol für löslich (*soluble*) steht.

#### 5.1.2 Expressionsanalysen verschiedener F-Konstrukte

In der Arbeit wurde mit cDNAs von synthetischen bF- bzw. hF-Proteinen gearbeitet, da diese wesentlich stärker exprimiert wurden als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Zu Beginn wurden die in **Abbildung 5.1** dargestellten Protein-Markierungen (6xHis, FLAG, GFP) nur für das bF kloniert und untersucht. Mit der günstigsten Variante wurde dann weitergearbeitet und diese

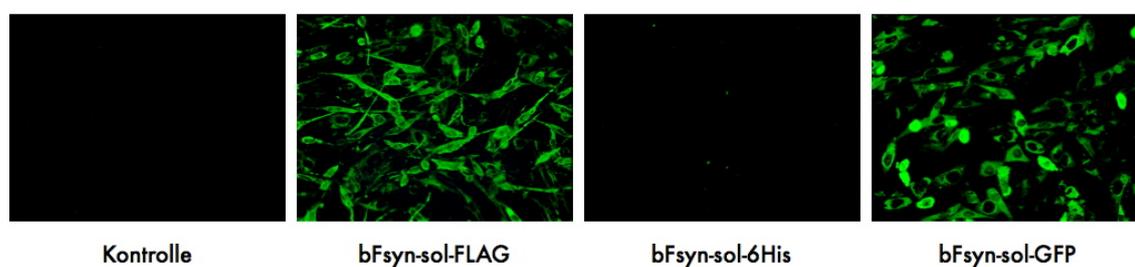


**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung von bFsyn-sol-6His, hF/bFsyn-sol-FLAG, bFsyn-sol-GFP, die zur Expression in den Vektor pCG1 kloniert wurden. Die Proteine umfassten die Ektodomäne von hF und bF, ohne Membrananker und zytoplasmatischen Abschnitt. Die jeweilige Markierung ist als runder Anhang rechts an die Proteine gezeichnet. Ganz rechts sind die Gesamtlängen in AS aufgeführt. Details zur Klonierung sind **Tabelle 4.9** zu entnehmen. Die Proteindarstellung ist nicht maßstabsgetreu.

ebenfalls an das hF angehängt. **Abbildung 5.2** zeigt BHK-21-Zellen, die transient mit den entsprechenden bF-Konstrukten transfiziert worden waren und anschließend mit dem Maus-Anti-FLAG-M2- bzw. Maus-Anti-His- und dann dem Ziege-Anti-Maus-FITC-Antikörper gefärbt wurden. Der eingesetzte Vektor pCG1 wurde bei jedem Experiment als Negativ-Kontrolle ohne Fremdgen mitgeführt und mit F-spezifischen Antikörpern gefärbt. Wie **Abbildung 5.2** (ganz links) und **Abbildung 5.3** (rechter Western Blot) belegen, waren in der Negativ-Kontrolle keine unspezifischen Signal zu sehen. Wie die Fluoreszenzbilder (**Abb. 5.2**) zeigen, war die Expression der bF-Konstrukte in transient transfizierten BHK-21-Zellen beim bFsyn-sol-FLAG und bFsyn-sol-GFP sehr deutlich zu sehen, bei bFsyn-sol-6His jedoch nur sehr schwach.

Da in der Arbeit geplant war, die löslichen Proteine, die in den Zellkulturüberstand abgegeben wurden, für weitere Experimente zu verwenden, wurde folgendes, in **Abbildung 5.3** dargestellte Experiment durchgeführt. Hier wurden nicht-konzentrierte Zellkulturüberstände von transient transfizierten BHK-21-Zellen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach erfolgtem Western Blot wurde die Membran zerschnitten und die verschiedenen F-Protein-Konstrukte mit den entsprechenden Antikörpern, gerichtet gegen das jeweilige Epitop, nachgewiesen. Der Zweitantikörper war an Peroxidase gekoppelt, so dass nach Substratumsetzung ein Chemielumineszenz-Signal im *ChemiDoc* detektiert werden konnte.

Die Menge an detektiertem bFsyn-sol-FLAG-Protein (**Abb. 5.3**, Bande bei ca. 65 kDa) im Über-



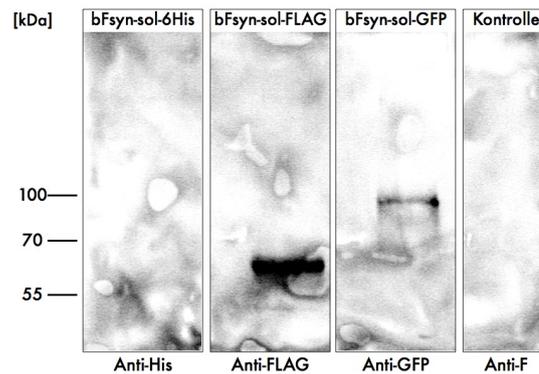
**Abbildung 5.2:** Analyse der Expression in Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellen waren mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert worden, die Kontrolle mit dem leeren Vektor (pCG1). Bei diesen, wie bei allen anderen IF-Aufnahmen, wurde ein repräsentativer Bereich des Deckglases ausgewählt. Dieser war im Phasenkontrast (nicht gezeigt) stets gleichmäßig konfluent mit Zellen bewachsen. Die Zellen wurden vor der Antikörperinkubation (Maus-Anti-FLAG bzw. Maus-Anti-His und Ziege-Anti-Maus-FITC) mit 0,2%igem Triton X-100 permeabilisiert und zeigen die Gesamtexpression von F. Das Deckglas mit dem GFP-Konstrukt wurde nicht mit Antikörpern inkubiert. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

stand war, verglichen mit den anderen Konstrukten, am höchsten. Das GFP-markierte F-Protein (bFsyn-sol-GFP) war schwach nachweisbar (**Abb. 5.3**, Bande bei ca. 95 kDa). Das Konstrukt bFsyn-sol-6His konnte nicht im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Der geblottete Zellkulturüberstand schein-transfizierter Zellen wurde mit einem Maus-Anti-F-Antikörper inkubiert (**Abb. 5.3**). Hier wurde kein Signal detektiert.

Auf Grund der Expressionsergebnisse des Immunfluoreszenztests und der Western Blots von Zellkulturüberständen wurde die FLAG-Markierung als die beste Methode zur Expression und zum Nachweis löslicher F-Proteine bewertet.

Deshalb wurde, entschieden die folgenden Arbeiten mit F-FLAG-Proteinen durchzuführen. Um die F-Proteine von BRSV und HRSV untersuchen zu können, wurde auch eine lösliche, FLAG-markierte Form des HRSV-F-Proteins in den pCG1-Expressionsvektor kloniert (**Abbildung 5.1**). In **Abbildung 5.4** sind die Oberflächenexpressionen der löslichen, FLAG-markierten F-Protein-Konstrukte beider Virusvarianten durch Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die Negativ-Kontrolle zeigte keine F-spezifischen Signale. Zur deutlicheren Darstellung der Zellen waren in diesem Experiment die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Um sicher zustellen, dass das F-Protein durch die Verkürzung und Markierung nicht in seiner natürlichen Struktur gestört war, wurde seine Reifespaltung mittels verschiedener Antikörper

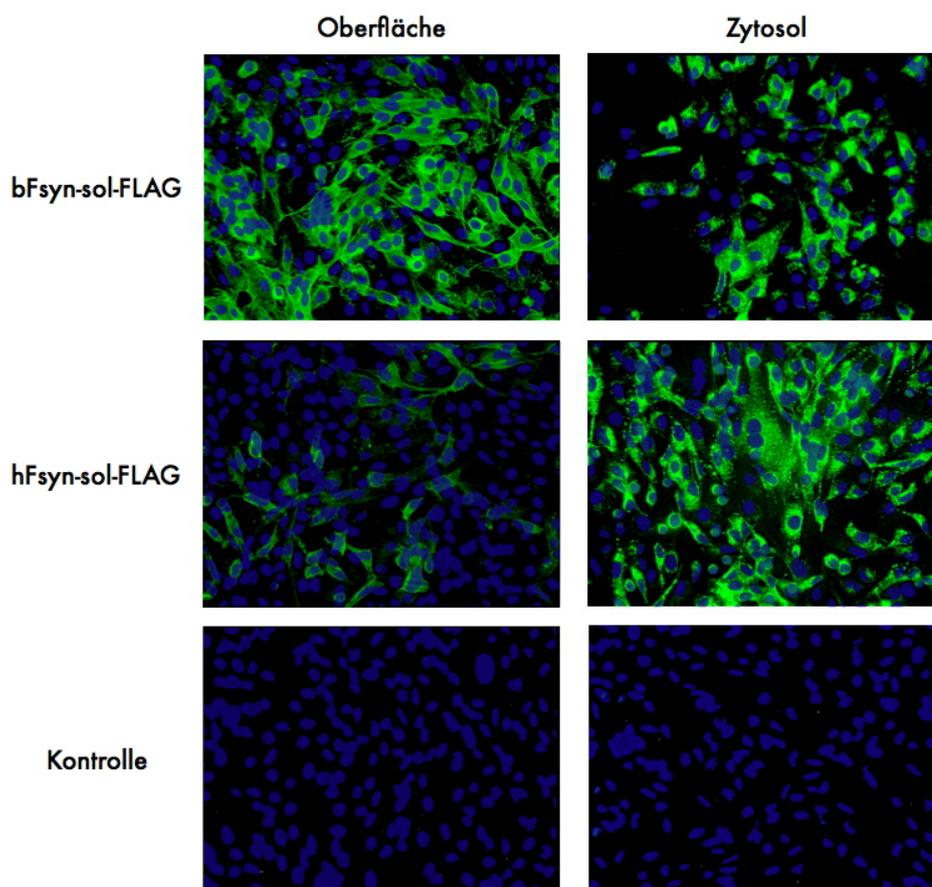


**Abbildung 5.3:** Western Blot der bF-Konstrukte in Zellkulturüberständen von transient transfizierten BHK-21-Zellen. Zellen wurden in einer 24-Napf-Platte ausgesät und in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Überstände abgenommen und davon jeweils 35  $\mu$ l pro bF-Konstrukt einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde geblottet und die Membran zerschnitten, damit mit verschiedenen Antikörpern, dem Epitop des jeweiligen bF-Proteins entsprechend, gefärbt werden konnte. Der Membranstreifen mit Zellkulturüberstand von Zellen, die mit pCG1 transfiziert worden waren, wurde mit dem Maus-Anti-F-Antikörper inkubiert. Das Molekulargewicht des löslichen F-Proteins betrug etwa 65 kDa.

und unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot geprüft (**Abb. 5.5**).

Die F2-Untereinheit befindet sich vor der Reifespaltung am N-terminalen Ende des F-Proteins. Das FLAG-Epitop wurde an das C-terminale Ende angefügt, so dass es nach der Spaltung des F-Proteins mit der F1-Untereinheit verbunden ist. Durch die Verwendung eines F2-spezifischen Antikörpers und eines Anti-FLAG-Antikörpers können die beiden Untereinheiten unterschieden werden, vorausgesetzt die Disulfidbrücken, die die F1- und F2-Untereinheiten verbinden, werden durch reduzierende Agenzien wie DTT gespalten.

Das Molekulargewicht des löslichen F-Proteins betrug ca. 65 kDa. Die F-Proteinfraktion, die nicht mit DTT behandelt wurde (**Abb. 5.5**, jeweils rechter Kasten), zeigte im 8%igen SDS-Gel ein Laufverhalten, das dem eines Proteins von ca. 65 kDa entsprach. Wie erwartet konnten beide Antikörper das Protein erkennen. Nach DTT-Behandlung detektierte der gegen die F2-Untereinheit gerichtete Anti-F2-Antikörper eine Proteinbande von ca. 20 kDa Größe, was der F2-Untereinheit entspricht (**Abb. 5.5, A**, linker Kasten). Inkubierte man diese Proteinfraktion auf einer separaten Membran mit dem Anti-FLAG-Antikörper, so wurde eine Bande bei ca. 50 kDa gefärbt. Dieses Molekulargewicht entspricht der F1-Untereinheit, die nach DTT-Behandlung von der F2-Untereinheit getrennt wurde. Die Sensitivität des löslichen F-Proteins gegenüber DTT bedeutet also, dass das lösliche F-Protein posttranslational in zwei Unterein-

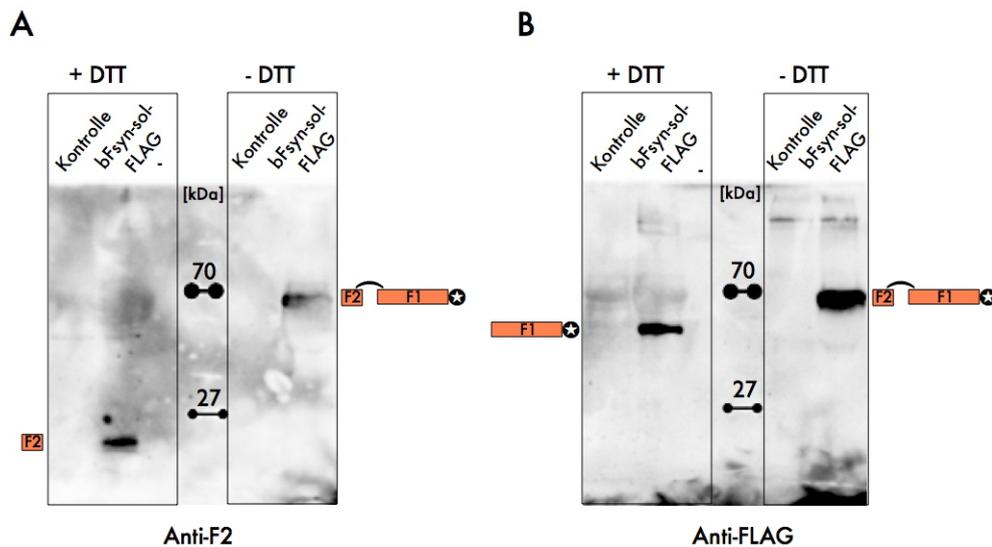


**Abbildung 5.4:** Oberflächenexpression und intrazelluläre Expression von bFsyn-sol-FLAG- und hFsyn-sol-FLAG-Protein in Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Die Zellen wurden mit Maus-Anti-F und Ziege-Anti-Maus-FITC gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt, welches bei Anregung blau leuchtet. Blaue und grüne Fluoreszenzaufnahmen wurden überlagert. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

heiten gespalten wurde, wie es für das Wildtyp-F-Protein beschrieben ist (Gruber & Levine, 1983).

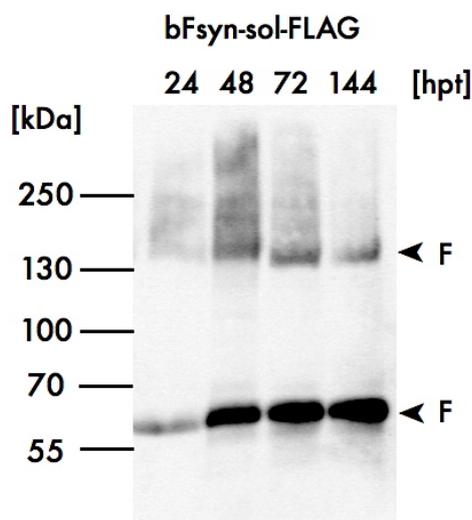
### 5.1.3 Reinigung löslicher F-Proteine

Um den günstigsten Zeitpunkt zur Ernte löslicher F-Proteine aus dem Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurde der Verlauf der Proteinsekretion am Beispiel des bFsyn-sol-FLAG-Proteins untersucht (**Abb. 5.6**). Zu diesem Zweck wurde 24, 48, 72 und 144 Stunden nach Transfektion von BHK-21-Zellen das gesamte Zellkulturmedium abgenommen und sofort 10fach konzentriert. Die Überstände wurden bei 4 °C gelagert und ein 50 µl-Aliquot von jeder Ernte bei -20



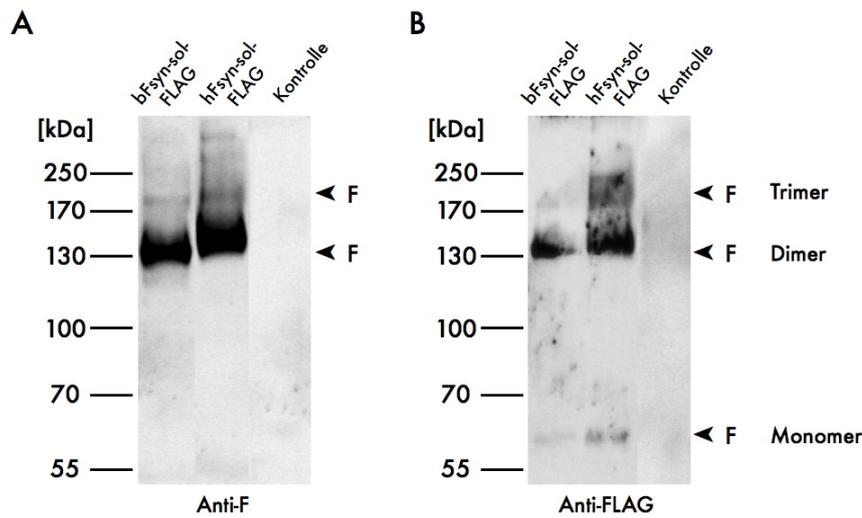
**Abbildung 5.5:** Western Blot zum Nachweis der Spaltung in F2 und F1. Zellkulturüberstände von BHK-21-Zellen, die transient mit pCG1 oder bFsyn-sol-FLAG transfiziert worden waren, wurden 10fach konzentriert und entweder nach (+ DTT) oder ohne DTT-Behandlung (- DTT) auf zwei SDS-PAGE-Gele aufgetragen und geblottet. A: Die Membran wurde mit einem Kaninchen-Anti-F2-Antikörper und dem Schwein-Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper inkubiert. B: Diese Membran wurde mit einem Maus-Anti-FLAG- und danach mit einem Kaninchen-Anti-Maus-HRP-Antikörper inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde neben jeder F-Protein-Spur Überstand pCG1-transfizierter Zellen aufgetragen. Neben die Blots sind auf Höhe der Banden Schemazeichnungen der F-Protein-Untereinheiten abgebildet. Der Proteinstandard wurde jeweils mittig aufgetragen.

°C eingefroren. Die Zellen erhielten bis zur nächsten Ernte frisches Medium und wurden weiter im Brutschrank inkubiert. Am Ende wurden alle Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper gefärbt. Zwei F-Protein-Banden wurden sichtbar, eine bei 65 kDa und die andere bei 130 kDa (eine weitere sehr diffuse Bande war sichtbar bei ca. 200 kDa). Bei diesen handelte es sich um eine monomere bzw. multimeren Form des F-Proteins. Obwohl die Expression des bFsyn-sol-FLAG-Proteins ab Tag 2 relativ konstant war, fiel auf, dass die 130 kDa Bande 72 Stunden nach Transfektion am stärksten war. Wie sich im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, war das Vorhandensein dieser multimeren Form des F-Proteins entscheidend für die erfolgreiche Durchführung eines Bindungstests (**Abb. 5.14**). Daher wurden nur die Überstände der ersten drei Tage nach Transfektion zur Reinigung verwendet, damit der gesamte Ansatz von bereits geernteten Überständen nicht zu lange bei 4 °C gelagert werden musste. Uneingefroren verlor das F-Protein innerhalb von einer Woche an Qualität und zerfiel in seine monomere Form (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.6:** Kinetik der Sekretion des bFsyn-sol-FLAG-Proteins in den Zellkulturüberstand transient transfizierter BHK-21-Zellen, 24, 48, 72 und 144 Stunden nach Transfektion (hpt). Jeweils 20  $\mu$ l der 10fach konzentrierten Überstände eines jeden Erntezeitpunktes wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend geblottet. Die Membran wurde mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper gefärbt. F-Protein-Banden sind mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde lösliches bF- und hF-Protein mit FLAG-Markierung transient in BHK-21-Zellen exprimiert und der Zellkulturüberstand von drei Tagen gesammelt, was üblicherweise ein Gesamtvolumen von 170 ml pro Konstrukt ergab. Nach ca. 1700facher Konzentrierung und Affinitätsreinigung mittels Anti-FLAG-M2-Gel erhielt man F-Proteine, die sich für Bindungsanalysen eigneten und in einem Endvolumen von ca. 100  $\mu$ l bei  $-80^{\circ}\text{C}$  maximal sechs Wochen lang gelagert wurden. In **Abbildung 5.7** wurden gereinigte bF- bzw. hF-Proteine aus zwei unterschiedlichen Präparationen im Western Blot nachgewiesen. Die gezeigten Western Blots stellen repräsentative Kontrollblots dar, wie sie in der Arbeit standardmäßig nach jeder F-Protein-Präparation durchgeführt wurden. Drei F-Protein-Banden wurden sichtbar, eine bei 65 kDa, eine bei 130 kDa und eine weitere bei 200 kDa (**Abb. 5.7**, Pfeilköpfe). Bei den letztgenannten handelte es sich um multimeren Formen des F-Proteins. Ein wesentlicher Unterschied zu 10fach konzentriertem, aber nicht gereinigtem F-Protein (**Abb. 5.6**) war der fast vollkommene Erhalt der multimeren Form der F-Proteine beider Varianten (Banden bei 130 und 200 kDa). Zusammen mit der starken Anreicherung der F-Proteine mittels Affinitätsreinigung war die molekulare Struktur der Proteine entscheidend für den Erfolg der Bindungstests (**Abb. 5.14**).

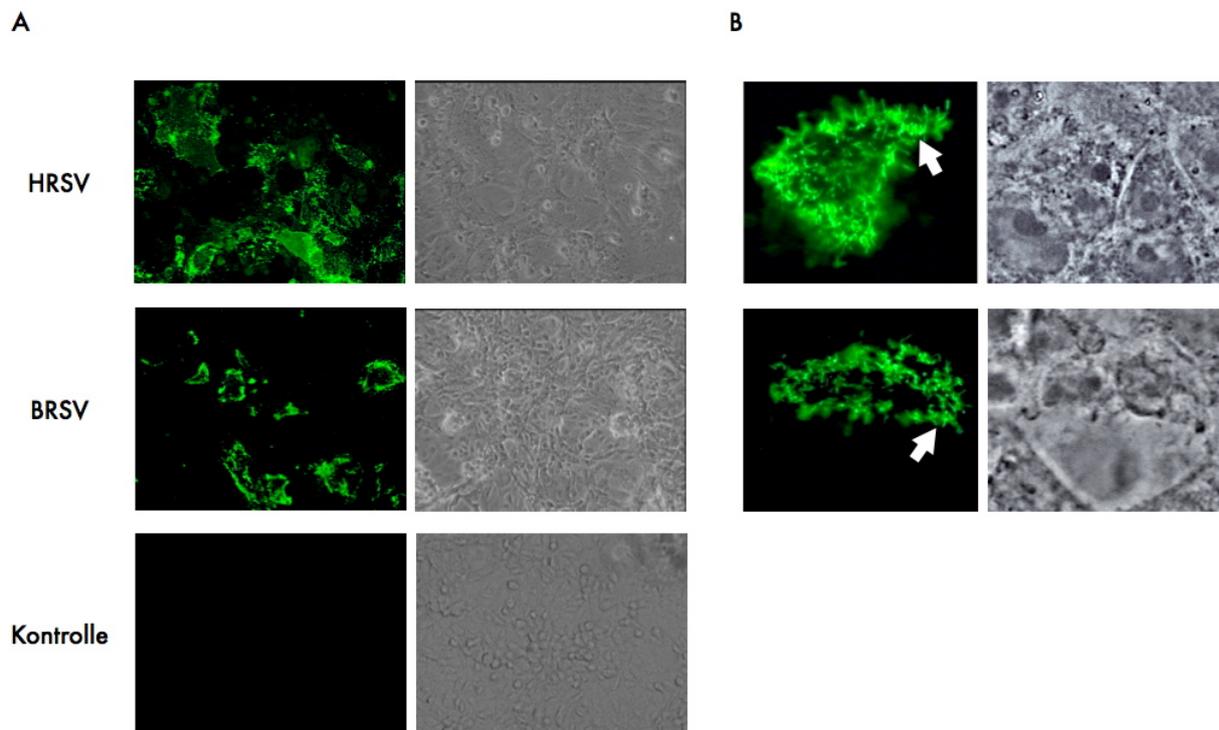


**Abbildung 5.7:** Western Blot gereinigter bF/hFsyn-sol-FLAG-Proteine. Zellkulturüberstände transient transfizierter BHK-21-Zellen wurden 24, 48, und 72 Stunden nach Transfektion geerntet und anschließend gesammelt gereinigt. Die gereinigten F-Protein-Lösungen bzw. 10fach konzentrierter schein-Überstand (Kontrolle) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend per Western Blot auf eine Membran übertragen. A: Es wurden jeweils 3  $\mu$ l bF bzw. hF und 20  $\mu$ l Kontroll-Überstand aufgetragen. Die Membran wurde mit einem Maus-Anti-F-Antikörper (3ReS21) und einem Kaninchen-Anti-Maus-HRP-Antikörper gefärbt. B: Es wurden jeweils 1  $\mu$ l bF bzw. hF und 20  $\mu$ l Kontroll-Überstand aufgetragen. Die Membran wurde mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper gefärbt. F-Protein-Banden sind mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet.

## 5.2 Bindungsnachweise löslicher F-Proteine

Es wurden zwei verschiedene Bindungstests während dieser Arbeit entwickelt. Beide Nachweismethoden detektierten eine Bindung des F-Proteins an lebenden Zellen. Parallel wurden umfangreiche Infektionsstudien angestellt, um eine nicht-empfindliche Zelllinie zu finden, die als Negativ-Kontrolle für die Bindungstests dienen könnte. Allerdings waren BRSV und HRSV in der Lage, alle getesteten kontinuierlichen Zelllinien zu infizieren. Als Kontrolle diente daher 10fach konzentrierter Zellkulturüberstand von BHK-21-Zellen, die mit pCG1 (leerer Expressionsvektor) transfiziert worden waren. Für die Bindungstests wurden Vero-Zellen verwendet, da diese Zellen von beiden Viren effizient infiziert wurden (**Abb. 5.8**).

Das Infektionsexperiment in **Abbildung 5.8** zeigt die Empfänglichkeit von Vero-Zellen für eine HRSV- oder BRSV-Infektion. Im Phasenkontrast sind zudem die RSV-typischen Synzytien anhand von mehrkernigen Riesenzellen zu erkennen. In der Vergrößerung sind filamentöse Struk-



**Abbildung 5.8:** Immunfluoreszenztest von Vero-Zellen nach HRSV- und BRSV-Infektion. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Anti-RSV-F-Antikörper und einem Zweitantikörper Anti-Maus-FITC gefärbt. Jeweils links der Fluoreszenzkanal, rechts der Phasenkontrast. A: Die beiden oberen Reihen zeigen Vero-Zellen nach Infektion mit HRSV bzw. BRSV. Die unterste Reihe zeigt nicht infizierte Vero-Zellen (Kontrolle) nach der Antikörper-Inkubation. Aufgenommen mit einem 20er Objektiv. B: Vergrößerte Darstellung HRSV (obere Reihe), und BRSV (untere Reihe), infizierter Vero-Zellen. Pfeile zeigen auf knospende Viruspartikel an der Zelloberfläche. Aufgenommen mit einem 40er Objektiv.

turen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen deutlich zu sehen (**Abb. 5.8, B**, Pfeile). Hierbei handelt es sich um sich abschnürende filamentöse Viruspartikel.

Da weder über die Natur des zellulären Rezeptorproteins, noch die Art der Wechselwirkung zwischen diesem und dem F-Protein ausreichende Kenntnis bestand, wurde stets darauf geachtet, beide Interaktionspartner während der Bindungsphase in ihrem physiologischen Zustand zu erhalten, soweit dies möglich war. Auf Seite der Zellen wurde für Bindungsexperimente immer mit lebenden, unfixierten Zellen gearbeitet, was sich als wichtig für eine erfolgreiche Bindung herausstellte (siehe **5.3.4**). Außerdem wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt (**5.3.2**). Das F-Protein wurde zur Ernte aus dem Zellkulturüberstand bei 4 °C zwischengelagert.

gert, um Degradationsprozesse durch zelluläre Proteasen zu minimieren. Gleichzeitig wurde dadurch wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden, was sich als negativ auf die Qualität der Präparation bzw. auf die Struktur des F-Proteins auswirkte (Daten nicht gezeigt).

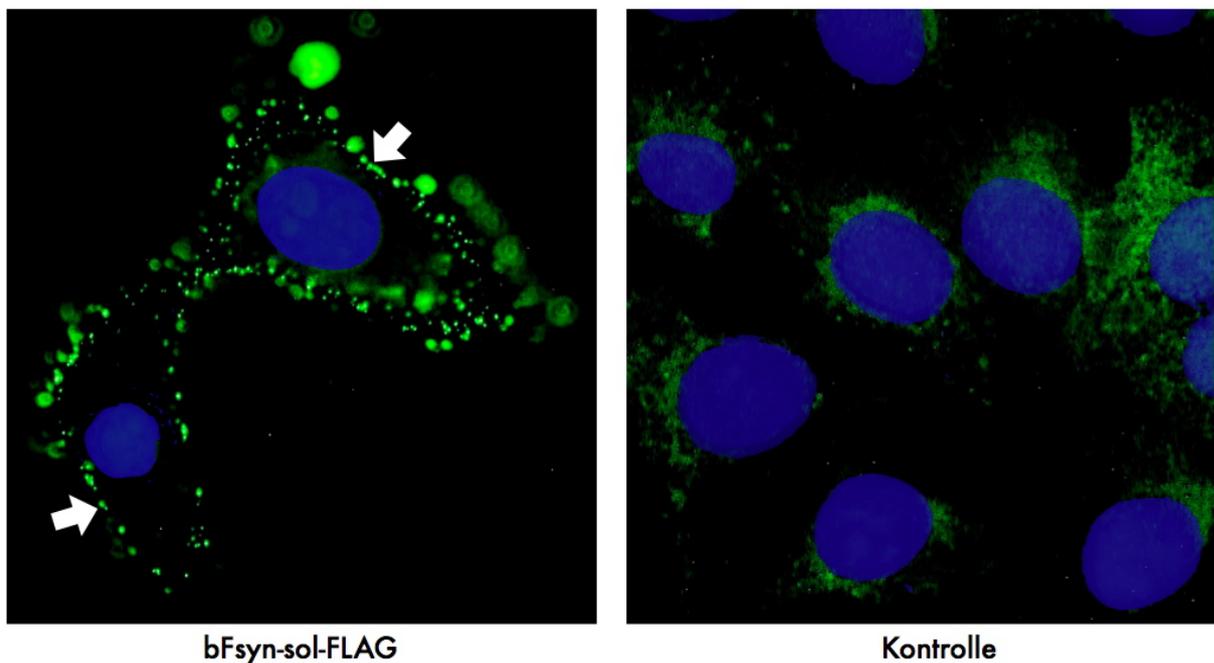
Leider war eine geeignete Quantifizierungsmethode zur Bestimmung der Protein-Konzentration im Anschluss an die Reinigung nicht verfügbar. Die übliche Durchführung eines BCA-Tests (Smith et al., 1985) im 96-Napf-Format war nicht empfindlich genug, um 10 µl gereinigter F-Protein-Lösung zu messen. Um nicht die gesamte Menge einer F-Protein-Präparation allein zur Konzentrationsmessung einsetzen zu müssen, wurde auf eine solche verzichtet und stattdessen per Western Blot und Bindungstest die Anwesenheit und Qualität ermittelt. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der präparierten F-Proteine in den jeweiligen Nachweis- und Bindungstests zu gewährleisten, wurde streng darauf geachtet, die wiederholten Proteinreinigungen nach einem einheitlichen Protokoll durchzuführen (4.5). So wurde beispielsweise für die Kontroll-Western Blots stets 1 µl F-Protein pro Spur aufgetragen. Ferner wurden für die Kontroll-Immunfluoreszenz-Bindungstests stets 2-3 µl der F-Proteinpräparation eingesetzt. Auf diese Weise konnte der Grad der Anreicherung bzw. die Qualität der Proteinpräparation abgeschätzt werden.

### 5.2.1 Bindungsnachweis mittels Immunfluoreszenz

Nach jeder Reinigung löslicher F-Proteine erfolgte deren Überprüfung per Western Blot (**Abb. 5.7**), sowie dem Immunfluoreszenz-Bindungstest (**Abb. 5.9** und **5.10**). Für letztgenannten wurden standardmäßig Vero-Zellen auf einem Deckglas mit löslichen F-Proteinen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend immunzytochemisch nachgewiesen. Dazwischen wurde mit PBS gewaschen, um ungebundene F-Proteine von den Zellen zu entfernen.

Zunächst soll am Beispiel von bFsyn-sol-FLAG die Bindung des F-Proteins an lebenden Zellen im Detail demonstriert werden (**Abbildung 5.9**). Aufgrund von Autofluoreszenz waren auch bei der Negativ-Kontrolle Fluoreszenzsignale zu sehen (**Abbildung 5.9**, rechtes Bild). Die F-spezifische Färbung unterschied sich davon durch die punktförmige Verteilung und die stärkere Intensität der Fluoreszenz (**Abbildung 5.9**, linkes Bild).

**Abbildung 5.10** stellt eine repräsentative Übersicht der beiden verwendeten löslichen F-Protein-konstrukte von BRSV und HRSV, sowie der Negativ-Kontrolle dar. Letztere bestand aus der

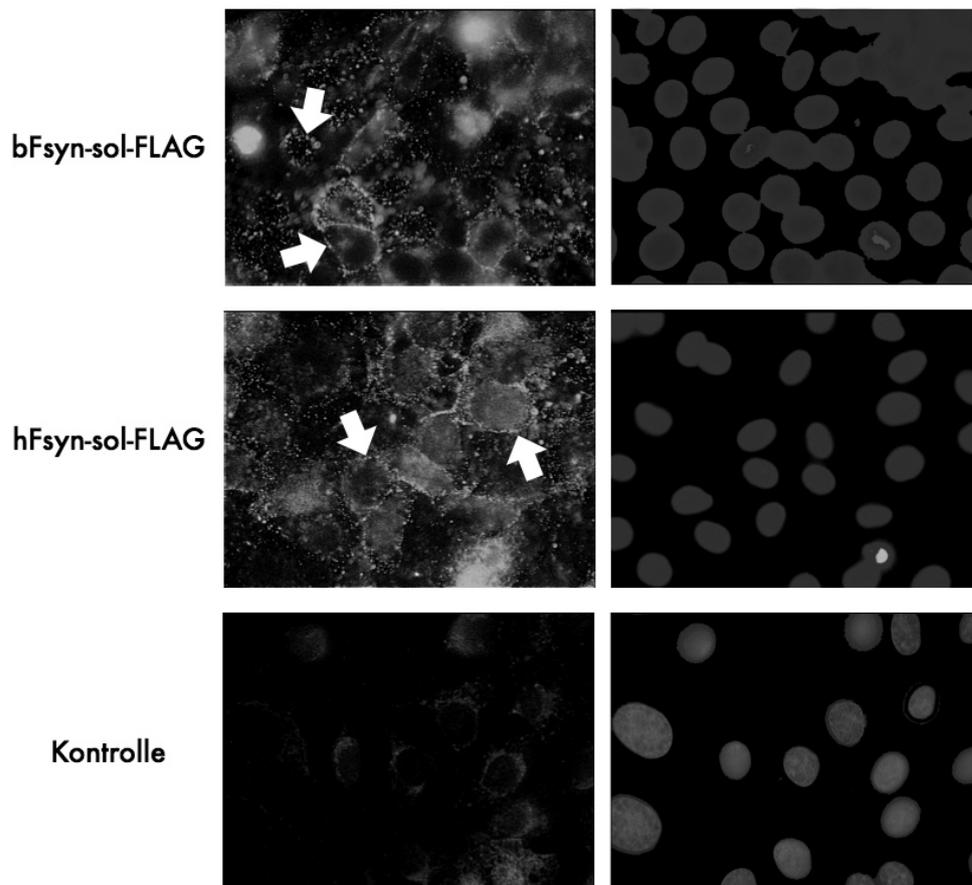


**Abbildung 5.9:** Immunfluoreszenz-Bindungstest mit gereinigtem bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen. Es wurden 2  $\mu$ l bF bzw. 20  $\mu$ l pCG1-Überstand aufgetragen. Anschließend wurden gebundene F-Proteine mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper angefärbt. Pfeile deuten auf F-Proteine. Zellkerne wurden mit DAPI und in blauer Farbe über das Bild gelegt.

Inkubation mit 10fach konzentriertem Zellkulturüberstand von pCG1-transfizierten BHK-21-Zellen. An dieser Stelle sei angemerkt, dass bei kleineren Abbildungen die Schwarz-Weiß-Darstellung durch den höheren Kontrast besser geeignet ist, um ein Bindungsereignis zu zeigen.

Trotz einer sichtbaren Hintergrundfluoreszenz der Zellen, sind gebundene F-Proteine beider Viren als kleine grüne Kügelchen an den Rändern der Zellen sichtbar (**Abb. 5.10**, obere und mittlere Reihe, Pfeile). Diese Strukturen waren bei der Negativ-Kontrolle nicht zu sehen, was auf eine spezifische Bindung der gereinigten F-Proteine an die Zellen hinwies (**Abb. 5.10**, untere Reihe). In der vorliegenden Arbeit wurden Vero-Zellen für die Bindungsexperimente verwendet, da diese Zellen eine relativ schwache Autofluoreszenz zeigten. Der Nachteil des Nachweises der Wechselwirkung mittels Immunfluoreszenztest bestand darin, dass die Auswertung nur durch den Experimentator selbst und nicht maschinell (z. B. mittels Zytometer) erfolgen konnte. Aus diesem Grund konnten Immunfluoreszenz-Bindungsexperimente nicht quantifiziert werden.

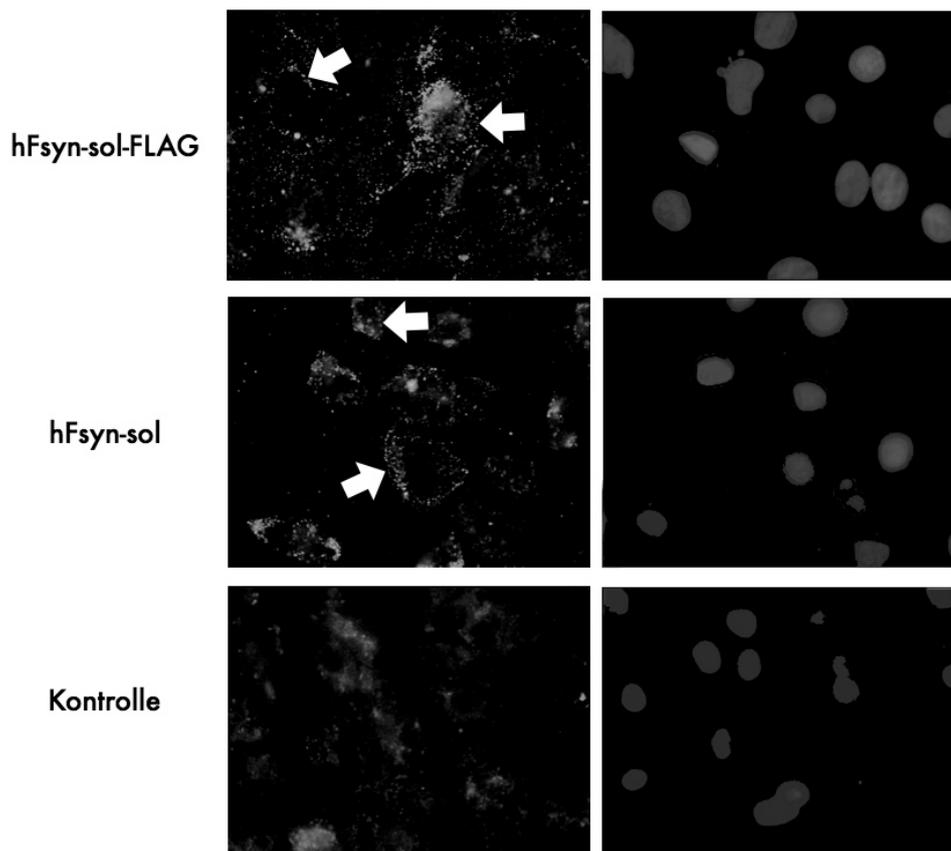
Um ausschließen zu können, dass die Bindung an die Zellen durch die FLAG-Markierung vermittelt wurde, wurde ein lösliches hFsyn-sol-Protein erzeugt. Dieses konnte zwar nicht über das



**Abbildung 5.10:** Übersicht von Immunfluoreszenz-Bindungstests mit gereinigten bF/hFsyn-sol-FLAG-Proteinen und Vero-Zellen. Es wurden jeweils 2  $\mu$ l bF bzw. hF und 20  $\mu$ l pCG1-Überstand aufgetragen. Anschließend wurden gebundene F-Proteine mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper angefärbt. Pfeile deuten auf F-Proteine (linke Spalte). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind in der rechten Spalte dargestellt. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv.

FLAG-Epitop gereinigt, aber ähnlich stark konzentriert werden. In **Abbildung 5.11** wurde die Bindung mit diesem und dem FLAG-markierten hF-Protein parallel durchgeführt. Die Pfeile zeigen auf gebundene F-Proteine nach Färbung mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper.

Wie in dem Immunfluoreszenz-Bindungstest in **Abbildung 5.11** zu sehen ist, war auch das lösliche hF-Protein ohne FLAG-Markierung in der Lage, spezifisch an Vero-Zellen zu binden. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die FLAG-Aminosäurenabfolge (DYKDDDDK) die Bindung vermittelte oder beeinflusste.



**Abbildung 5.11:** Immunfluoreszenz-Bindungstests mit gereinigtem hFsyn-sol-FLAG- und konzentriertem hFsyn-sol-Protein und Vero-Zellen. Es wurden 3  $\mu$ l hFsyn-sol-FLAG, 10  $\mu$ l hFsyn-sol, sowie 20  $\mu$ l pCG1-Überstand und Zellen inkubiert. Anschließend wurden gebundene F-Proteine mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper angefärbt. Pfeile deuten auf F-Proteine (linke Spalte). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind in der rechten Spalte dargestellt. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv.

## Autofluoreszenz

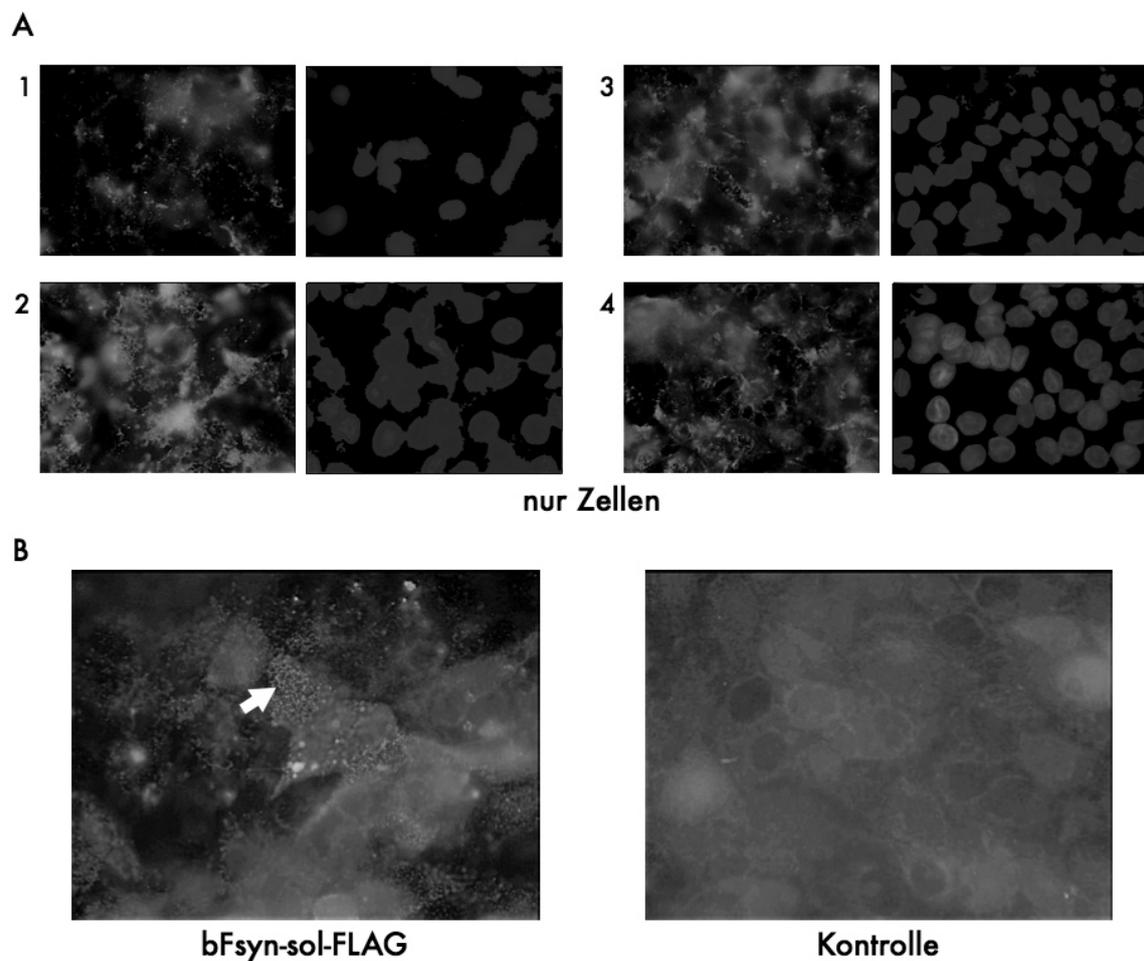
Ein großes Problem beim Immunfluoreszenz-Bindungstest stellte die Eigenfluoreszenz der Zellen dar. Bei der Fotografie gebundener F-Proteine, gefärbt mit dem FITC-gekoppelten Anti-F-Antikörper, gab es mitunter Schwierigkeiten, was auch in den **Abbildungen 5.9, 5.10 und 5.11** sichtbar ist. Das Fluoreszenzsignal des an die F-Proteine gebundenen Antikörpers war schwach und die Betrachtung der Bindungstests musste deshalb fast immer mit dem 63er Objektiv und Immersionsöl erfolgen. Daher war es nicht möglich, die Belichtungszeit so weit zu verkürzen, bis die Hintergrundfluoreszenz verschwand, ohne gleichzeitig die Bindungsfluoreszenz zu verlieren. Dieses Problem wurde von fluoreszierenden Molekülen im Inneren der Zellen verursacht,

deren Emissionsspektrum im Wellenlängenbereich der FITC-Fluoreszenz lag. Zusätzlich wurde das Problem durch das Fluoreszenzfiltersystem des verwendeten Mikroskops verstärkt, welches ein eher breites Lichtspektrum zur Detektion hindurch ließ. Dabei kam es mitunter zu Überlagerungen, welche einen entsprechenden Hintergrund verursachten. Dennoch ließ sich dieser Grundzustand beeinflussen, z. B. durch den Zustand der Zellen. War der Zellrasen übermäßig stark mit Zellen bewachsen, so wirkte sich dies nachteilig auf die Hintergrundfluoreszenz aus. Auch gab es Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. Vero-Zellen zeichneten sich durch eine vergleichsweise schwache Autofluoreszenz aus. Auch das sonst für den Immunfluoreszenztest übliche Fixieren von Zellen mit 3%igem PFA verstärkte die Eigenfluoreszenz der Zellen. Dies ergab ein Test verschiedener Substanzen, um die Fluoreszenz der Zellen zu reduzieren (**Abb. 5.12, A**) (Mosiman et al., 1997). Die Schwierigkeit, einen Immunfluoreszenz-Bindungstests unter ungünstigen Voraussetzungen (z. B. Fixierung, Zelllinie) auszuwerten, lässt sich durch **Abbildung 5.12, B** gut verdeutlichen. Hier war ein Bindungsereignis (Pfeil) kaum zu sehen, obwohl die F-Proteinpräparation zuvor positiv getestet wurde. Durch die Verstärkung der Eigenfluoreszenz der HBE-Zellen führte die Fixierung in der Hälfte der Experimente zu einer Nicht-Auswertbarkeit der Immunfluoreszenz-Bindungstests.

### 5.2.2 Bindungsnachweis mittels Western Blot

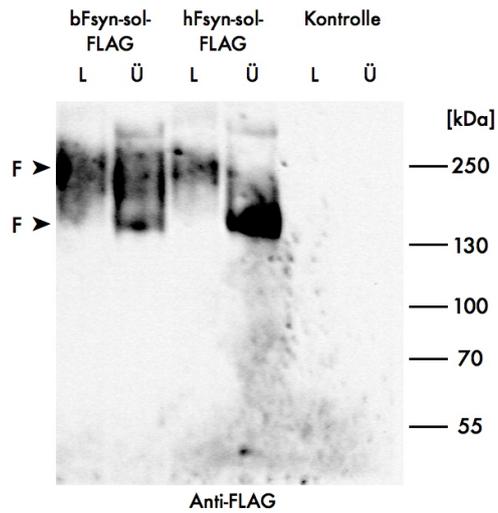
In **Abbildung 5.13** ist ein repräsentativer Western Blot von Lysaten aus Vero-Zellen nach einem Bindungstests mit b/hFsyn-sol-FLAG-Proteinen gezeigt. Die Bindung wurde mit  $3 \cdot 10^5$  in PBS resuspendierten Vero-Zellen und 5  $\mu$ l gereinigtem F-Protein für 90 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen des Zellsediments wurden die Zellen lysiert. Das Gesamtzelllysat wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper das gebundene F-Protein nachgewiesen. Ebenso wurde mit den Überständen nach der Bindung verfahren. Als Negativ-Kontrolle wurde 10fach konzentrierter Zellkulturüberstand von pCG1-transfizierten Zellen eingesetzt.

Die Ergebnisse der Western Blot-Bindungstests entsprachen denen aus den Immunfluoreszenz-Bindungstests. Die gereinigten löslichen F-Proteine von BRSV bzw. HRSV sind nach Inkubation mit Vero-Zellen im Lysat nach Antikörperfärbung nachweisbar (**Abb. 5.13, L**, Bande bei ca. 200 kDa). Direkt nach dieser Inkubationsphase wurde der Überstand vom Zellsediment getrennt und ebenfalls im Western Blot angefärbt (Ü). In diesen Proben befand sich ebenfalls F-



**Abbildung 5.12:** Autofluoreszenz und Immunfluoreszenz-Bindungstest von HBE-Zellen. A: Zur Reduktion der Autofluoreszenz wurden HBE-Zellen mit jeweils verschiedenen Chemikalien inkubiert, um die Autofluoreszenz der Zellen zu reduzieren. Anschließend wurden die Deckgläser mit den für Immunfluoreszenz-Bindungstests üblichen Mikroskop-Einstellungen fotografiert. 1: Zellen wurden nicht vorbehandelt, sondern direkt in Mowiol eingebettet. 2: Zellen wurden 15 min mit 3%igem PFA fixiert und anschließend 10 min mit 0,1 M Glycin inkubiert. 3: Zellen wurden 15 min mit 3%igem PFA fixiert, anschließend 10 min mit 0,1 M Glycin und dann 5 min mit 1 M DTT inkubiert. 4: Zellen wurden 15 sek mit Methanol/Aceton fixiert und anschließend 10 min mit 0,1 M Glycin inkubiert. Zellkerne wurden DAPI-gefärbt und jeweils rechts daneben dargestellt. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv. B: Immunfluoreszenz-Bindungstest mit bFsyn-sol-FLAG-Protein bzw. konzentriertem Kontroll-Zellkulturüberstand und HBE-Zellen. Pfeil zeigt auf gebundene F-Proteine. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und jeweils rechts daneben dargestellt. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv.

Protein, welches in zwei verschiedenen Formen vorlag. Eine Bande lief bei ca. 130 kDa und die zweite bei ca. 200 kDa. Es ist davon auszugehen, dass es sich dabei um verschiedene multimeren



**Abbildung 5.13:** Western Blot-Bindungstest von gereinigtem bF/hFsyn-sol-FLAG-Protein an Vero-Zellen. Die Proben wurden nach der Lyse nicht bei 96 °C inkubiert, um die Multimerbildung zu erhalten. Es wurden jeweils 20 µl des bF- bzw. hF-Bindungslysates (L) und 20 µl des Überstands nach Bindung (Ü) aufgetragen. Die Membran wurde mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper gefärbt. F-Protein-Banden sind mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet.

Formen des F-Proteins handelte. Bei den Lysatproben war auffällig, dass nur die hochmolekulare Bande vorhanden war, wohingegen bei dem aufgetragenen Überstand (von vermutlich nicht gebundenen F-Proteinen) entweder beide (bFsyn-sol-FLAG Ü) oder nur die niedermolekulare Bande (hFsyn-sol-FLAG Ü) sichtbar waren. Dies könnte daran gelegen haben, dass nur trimere F-Proteine (ca. 200 kDa) zur Bindung an die Zellen fähig waren, so dass im Überstand diese Fraktion fehlte bzw. bei einem Überschuss an Liganden beide Formen im Überstand nachweisbar waren. Eindeutig war, dass die dimere Form nicht im Lysat gefunden wurde. Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass die gereinigten F-Proteine spezifisch an Vero-Zellen binden und dass im Volumen von 5 µl eine ausreichende Menge F-Protein vorhanden war.

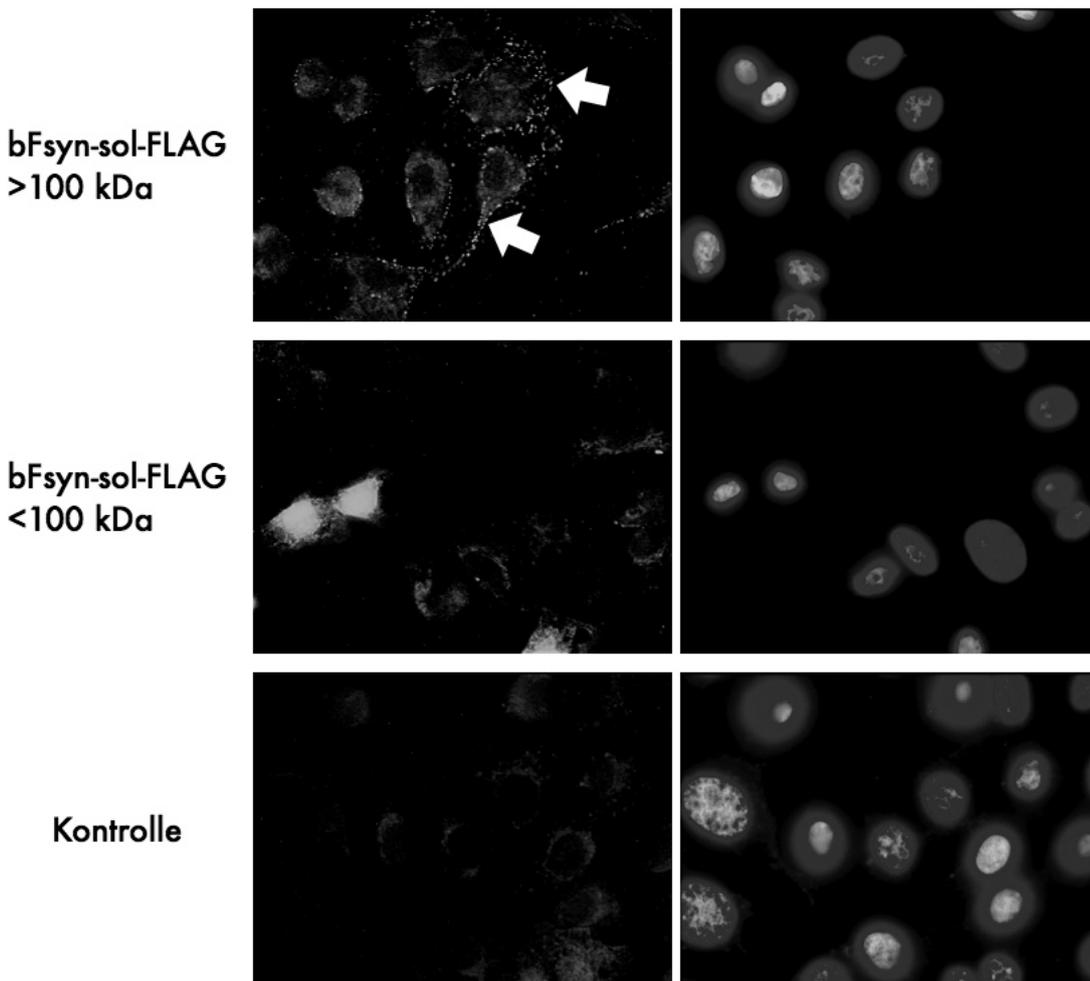
## 5.3 Bindungseigenschaften löslicher F-Proteine

### 5.3.1 Bedeutung der Quartärstruktur für die Bindung

Im Verlauf der Arbeit zeichnete sich die Wichtigkeit einer sehr starken Anreicherung der löslichen F-Proteine zur erfolgreichen Durchführung der Bindungstests ab. Außerdem wurde die Bedeutung der natürlichen trimeren Struktur des F-Proteins, wie sie im Virion vorkommt, offenkundig. Aufgrund dieser Kriterien wurde eine Affinitätsreinigung durchgeführt und anschließend eine Zentrifugationsfiltration durch einen Filter einer Porengröße von 100 kDa. Monomere F-Proteine konnten durch die Filtermembran hindurch gelangen, da sie ein Molekulargewicht von ca. 65 kDa besaßen. Multimere Formen (ca. 130 kDa und ca. 200 kDa) hingegen wurden im Filter zurückgehalten und für Bindungsstudien verwendet oder bei -80 °C gelagert. Um die Bedeutung des letzten Filtrationsschrittes und somit der Quartärstruktur des F-Proteins für das Bindungsereignis aufzuklären, wurden Immunfluoreszenz-Bindungstests durchgeführt, bei denen beide Fraktionen, Retentat und Durchlauf, zum Vergleich eingesetzt wurden.

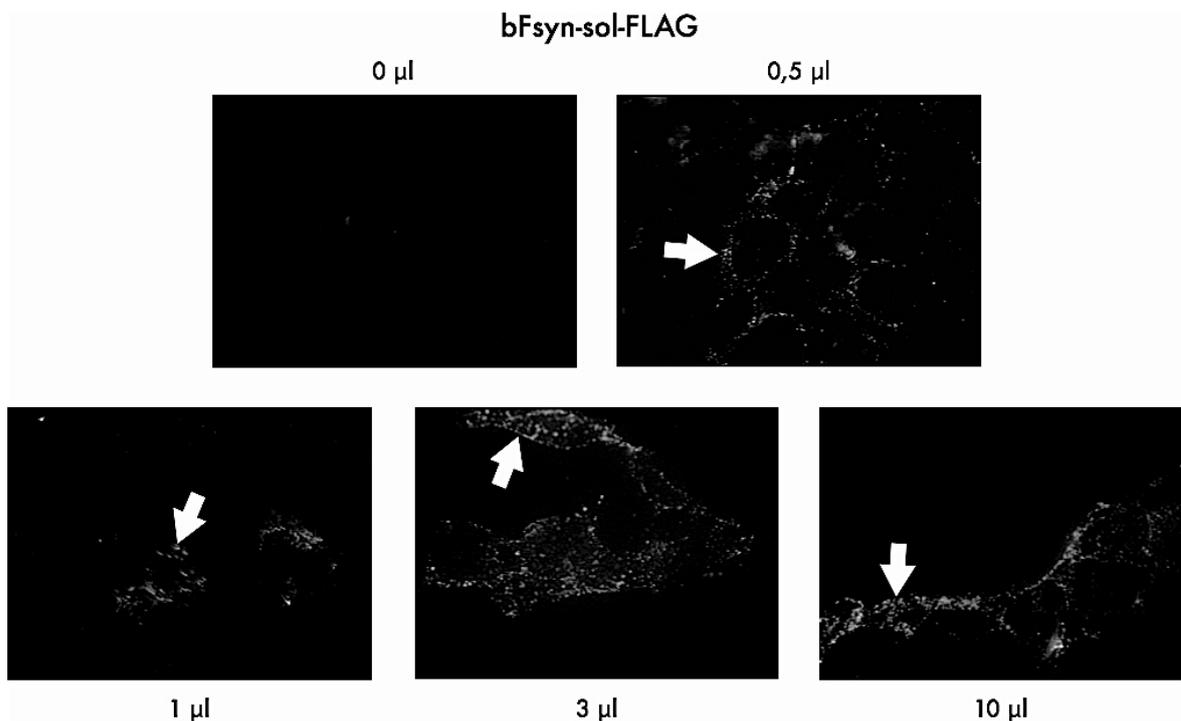
Der in **Abbildung 5.14** dargestellte Ausgang der Immunfluoreszenz-Bindungstests mit verschiedenen Protein-Fraktionen von bFsyn-sol-FLAG belegt, dass das Vorhandensein von multimerem F-Protein in hoher Konzentration essenziell für die Bindung an Zellen war. Von 380 µl affinitätsgereinigtem F-Protein wurde mittels 100 kDa Filtration eine Proteinlösung von multimeren F-Proteinen mit einem Volumen von 23 µl erhalten. Von dieser Lösung genügte 0,3 µl, um ein Bindungsereignis im Immunfluoreszenz-Bindungstest nachzuweisen (**Abb. 5.14**, obere Reihe). Setzte man hingegen 20 µl der Durchlauf fraktion ein, die bestenfalls nicht-multimere F-Proteine enthalten konnte, kam es zu keiner nachweisbaren Bindung.

Durch die Größenausschlussfiltration wurde neben der Abtrennung mono- und multimerer Formen auch eine zusätzliche Anreicherung der gereinigten F-Proteinlösung erzielt, was ebenfalls vorteilhaft für Bindungsexperimente war. Das wurde deutlich, als ein 20 µl-Aliquot der in **Abb. 5.14** verwendeten Proteinpräparation für einen Bindungstest eingesetzt wurde. Das Aliquot wurde von den 400 µl Lösung nach der Affinitätsreinigung, allerdings noch vor der 100 kDa Größenausschlussfiltration gewonnen. Der Bindungstest verlief negativ (Daten nicht gezeigt), woraus geschlossen wurde, dass in dieser Präparation die Konzentration an multimerem F-Protein nicht ausreichte, um eine Bindung nachzuweisen.



**Abbildung 5.14:** Immunfluoreszenz-Bindungstest mit monomerem und multimerem bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen. Nach der Affinitätsreinigung der FLAG-markierten, löslichen F-Proteine aus dem konzentrierten Zellkulturüberstand erhielt man ein Volumen von 380  $\mu\text{l}$ . Dieses wurde einer Größenausschlussfiltration mit einem 100 kDa-Ausschluss unterzogen. Dadurch wurde die Proteinpräparation aufgeteilt in F-Proteine von über (>100 kDa, 23  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen) bzw. unter (<100 kDa, 360  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen) 100 kDa Molekulargewicht. Anschließend wurde der Bindungstest mit diesen beiden Fraktionen durchgeführt, wobei 0,3  $\mu\text{l}$  der >100 kDa Fraktion bzw. 20  $\mu\text{l}$  der <100 kDa Fraktion eingesetzt wurden. Gebundene F-Proteine wurden mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper angefärbt. Pfeile deuten auf F-Proteine. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und rechten Spalte dargestellt. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde stets die Größenausschlussfiltration mit dem 100 kDa Filter zur Proteinpräparation angewandt.



**Abbildung 5.15:** Immunfluoreszenz-Bindungstest verschiedener Mengen bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen. Es wurden jeweils 0 µl, 0,5 µl, 1 µl, 3 µl und 10 µl bFsyn-sol-FLAG-Protein eingesetzt. Gebundene F-Proteine wurden mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper angefärbt. Pfeile deuten auf F-Proteine. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv.

### 5.3.2 Bindung in Abhängigkeit von der Konzentration

Der in der Arbeit entwickelte Immunfluoreszenz-Bindungstest wurde standardmäßig mit 3 µl F-Protein einer ebenfalls standardisiert durchgeführten Proteinpräparation vorgenommen. Auf diese Weise war es möglich einen Eindruck von der Qualität und Konzentration bindungsfähiger F-Proteine einer Probe zu erhalten, ohne eine Quantifizierung durchzuführen, die einen wesentlichen Anteil einer Präparation gefordert hätte. Um aber dennoch die Konzentrationsabhängigkeit eines Bindungsereignisses zu testen, wurden entsprechende Bindungs-Experimente durchgeführt, die in **Abbildungen 5.15** dargestellt sind.

Die Daten des Immunfluoreszenz-Bindungstests ergaben, dass bereits geringe Volumina einer standardisiert durchgeführten Proteinpräparation genühten, um ein Bindungsereignis detektieren zu können (**Abb. 5.15**). Schon 0,5 µl bFsyn-sol-FLAG-Protein-Lösung waren gebunden an Vero-Zellen nachweisbar. Das Signal konnte durch eine Konzentrationssteigerung auf 1 bzw.

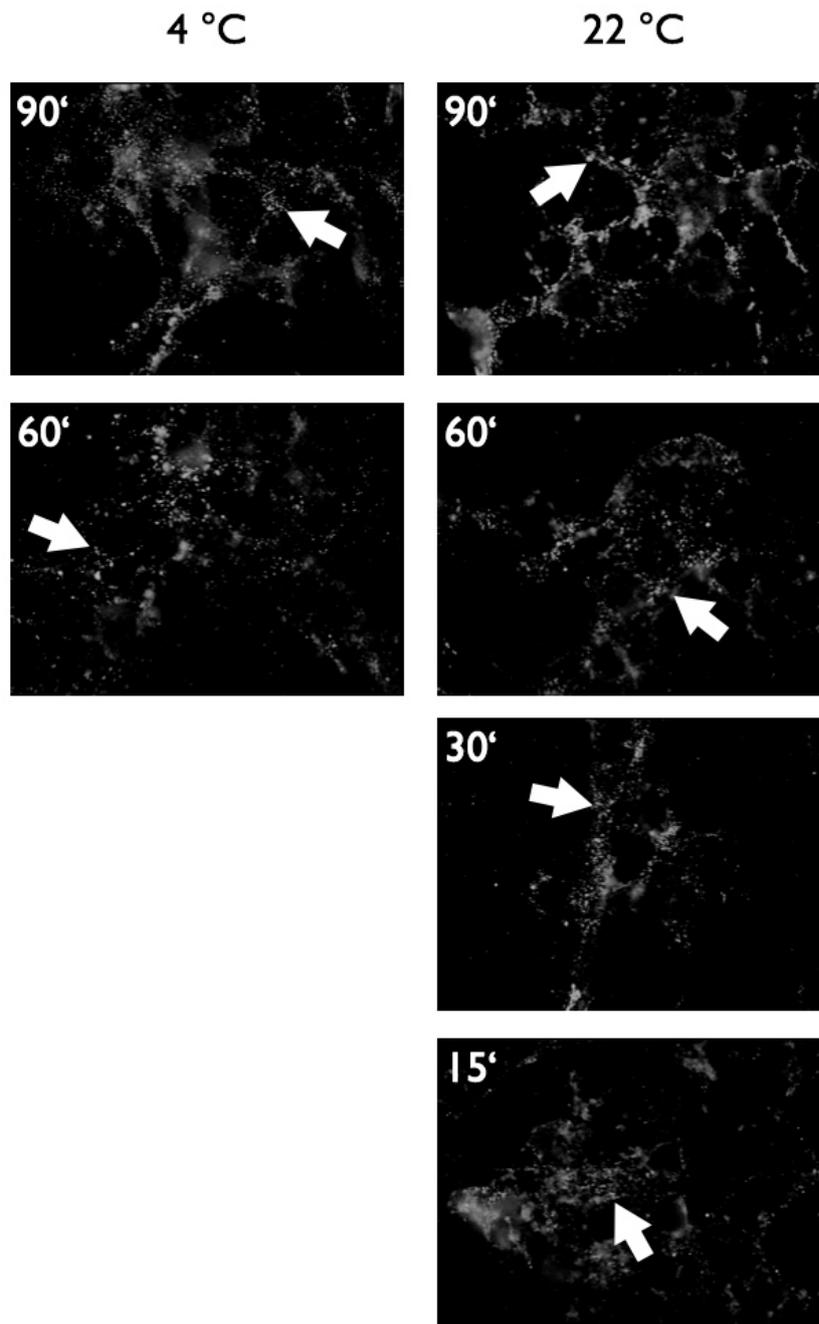
3  $\mu\text{l}$  verstärkt werden. Allerdings erbrachte eine weitere Steigerung auf 10  $\mu\text{l}$  pro Deckglas keine entsprechende Steigerung der an Zellen gebundenen F-Proteine. Das lässt darauf schließen, dass zwischen 3 und 10  $\mu\text{l}$  pro Deckglas eine Sättigung der für das F-Protein verfügbaren Bindungsstellen auf den Zellen erreicht wurde.

### 5.3.3 Bindung in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Um möglichst günstige Bedingungen während der Bindung zwischen F-Protein und zellulären Strukturen zur gewährleisten, wurden entsprechende Experimente standardmäßig bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde vermieden, bei 37 °C zu inkubieren, da bei dieser Temperatur eine verstärkte Internalisierung von Oberflächenproteinen ins Zellinnere auftreten könnte, was den Ausgang der Bindungsexperimente beeinflussen würde. Andererseits wurde die Temperatur während der Bindungsphase nicht auf 4 °C gesenkt, da hierbei die Zellen hin und wieder sichtlich Schaden nahmen und sich abkugelten, was sich ebenfalls ungünstig auf den Verlauf des Experiments auswirkte.

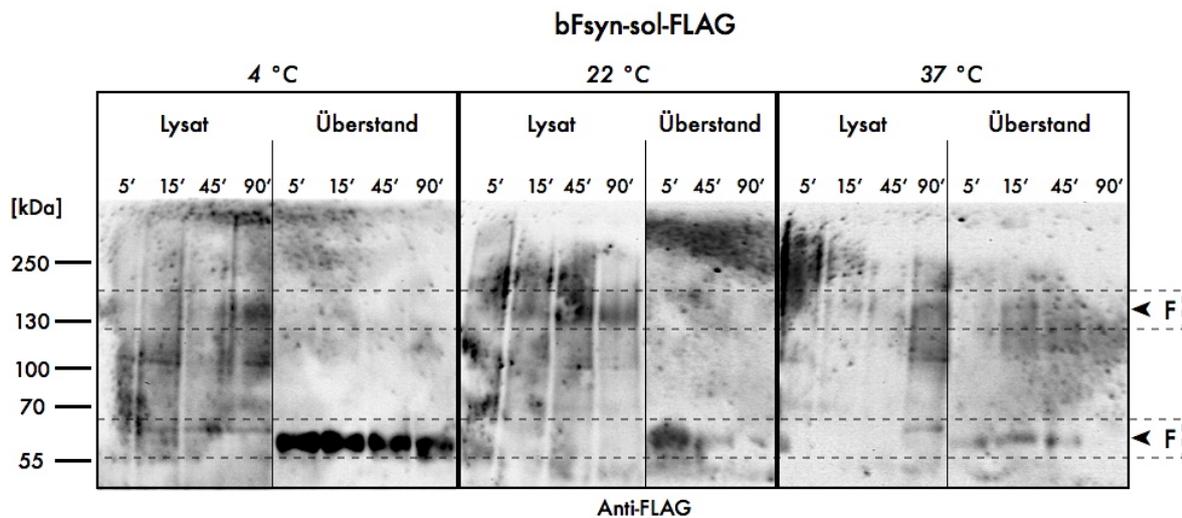
Um aber dennoch den Einfluss von Temperatur und Bindungsdauer auf die Bindung zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt. Der Immunfluoreszenz-Bindungstest (**Abb. 5.16**) sollte dazu dienen, neben einem Bindungsereignis auch den morphologischen Zustand der Zellen zu erfassen. Der in **Abbildung 5.17** gezeigte Western Blot-Bindungstest vermittelte einen quantitativen Eindruck von der Bindung bei den verschiedenen Temperaturen.

Der Immunfluoreszenz-Bindungstest in **Abbildung 5.16** zeigt, dass gereinigtes bFsyn-sol-FLAG-Protein sowohl bei Raumtemperatur (22 °C), als auch bei 4 °C an Vero-Zellen binden konnte. Die unterschiedlichen Adsorptionszeiten wirkten sich dabei nur gering auf das Bindungssignal aus. Dennoch gewinnt man den Eindruck, dass das Bindungsereignis nach 90 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur am stärksten war (**Abb. 5.16**, erster Ansatz der oberen Reihe). Kürzere Inkubationszeiten bei dieser Temperatur führten zu einem etwas schwächerem Fluoreszenzsignal gebundener F-Proteine. Die Inkubation mit löslichen F-Proteinen bei 4 °C ergab ebenfalls eine sichtbare Bindung, die sich ähnlich der bei Raumtemperatur darstellte. Die Bindungsereignisse nach 90 min bzw. 60 min waren vergleichbar mit den entsprechenden bei RT. Da das Signal bei 4 °C nicht stärker war als bei 22 °C, die Temperatur jedoch höchst unphysiologisch, wurde an der Inkubation bei 22 °C für die Bindungstests festgehalten.



**Abbildung 5.16:** Immunfluoreszenz-Bindungstest mit gereinigtem bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen bei verschiedenen Temperaturen und Adsorptionszeiten. Linke Spalte 4 °C, rechte Spalte 22 °C. Die Zellen wurden mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper angefärbt. Pfeile deuten auf gebundene F-Proteine. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv.

Dieses Experiment wurde parallel mit HBE-Zellen durchgeführt und führte zu einem ähnlichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).



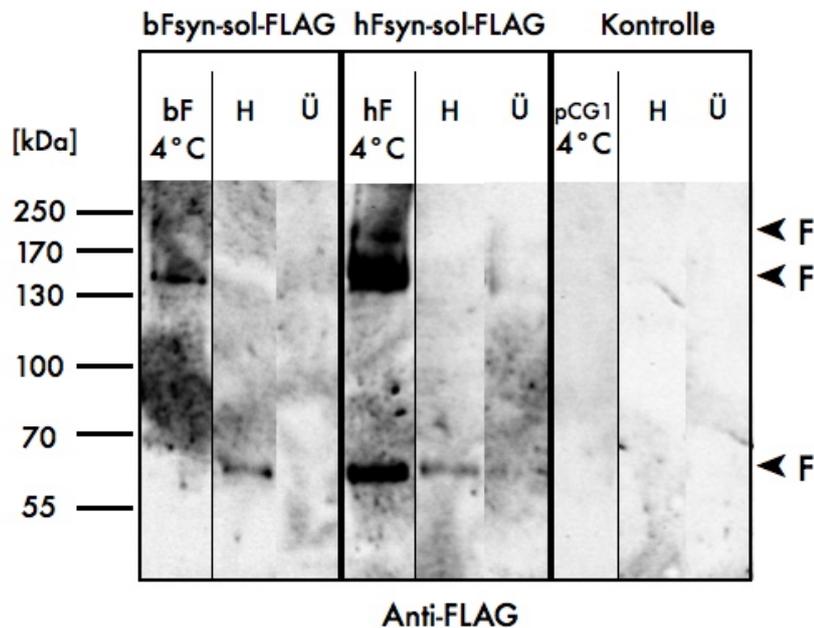
**Abbildung 5.17:** Western Blot-Bindungstest mit bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen. Je 3  $\mu$ l gereinigtes bFsyn-sol-FLAG-Protein wurde mit  $3 \times 10^5$  Vero-Zellen für jeweils 5, 15, 45 und 90 bei 4 °C, 22 °C bzw. 37 °C schwenkend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände mit nicht gebundenen F-Proteinen (Überstand) für die anschließende SDS-PAGE verwahrt (die 15'-Probe bei 22 °C ging dabei verloren). Die Zellsedimente wurden gewaschen und lysiert. Danach wurden die Lysate für 10 min bei 96 °C inkubiert und die dadurch von den Zellen abgelösten F-Proteine (Lysat) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper gefärbt. Die Laufhöhen der monomeren bzw. multimeren Formen der F-Proteine wurden mit gestrichelten Kästen umrandet und mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet.

Wie oben erwähnt, eignete sich diese Nachweismethode mittels Immunfluoreszenz nicht zur Quantifizierung gebundener F-Proteine. Daher wurden ähnliche Experimente mit dem Western Blot-Bindungstest durchgeführt, welche exemplarisch in **Abbildung 5.17** dargestellt sind.

Hierbei wurden Vero-Zellen mit 0,125%igem Trypsin abgelöst, in PBS resuspendiert und dann mit bFsyn-sol-FLAG-Protein bei verschiedenen Temperaturen und über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Da bei diesem Test F-Proteine in Ganzzelllysaten nachgewiesen wurden, kam es zu einem entsprechenden Hintergrund auf dem Western Blot (**Abb. 5.17**, Lysat). Um die Betrachtung relevanter Banden zu vereinfachen, wurden die Laufhöhen der F-Protein-spezifischen Banden gekennzeichnet (**Abb. 5.17**, gestrichelte Kästen). Nach der Bindungsphase wurde per Zentrifugation ungebundenes F-Protein im Überstand von gebundenem im Zellpellet getrennt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen (**Abb. 5.17**, Überstand). Alle drei unterschiedlichen Temperaturen ermöglichten eine Bindung von bFsyn-sol-FLAG-Protein an Vero-Zellen.

Die Inkubation bei 4 °C ergab nach 90 min das stärkste Signal für gebundenes F-Protein (**Abb. 5.17**, linker Abschnitt, Lysat). Bei den kürzeren Inkubationszeiten waren die entsprechenden Banden deutlich schwächer ausgeprägt. Dieses Bindungsverhalten spiegelte sich auch bei der Analyse der Zellüberstände wider, wo das Signal bei 65 kDa umgekehrt proportional zur Inkubationszeit war, und in der 90 min-Probe am stärksten reduziert war. Die eindrucksvollsten Ergebnisse der Bindungsexperimente ergaben sich bei Raumtemperatur (**Abb. 5.17**, mittlerer Abschnitt). Hier zeigten sich schon bei nur 5 bzw. 15 min deutliche 130 kDa-Banden, die bei 45- bzw. 90-minütiger Bindungsdauer noch stärker ausgeprägt waren. Bei diesem Ansatz war die monomere F-Protein-Fraktion im Überstand nur in der 5 min-Probe deutlich nachweisbar, während sie bei den 45 und 90 min-Proben deutlich reduziert war. Die Bindungsexperimente bei 37 °C ergaben zwar ein ähnliches Bild wie bei den 22 °C-Versuchen, aber die Intensität der Banden war reduziert (**Abb. 5.17**, rechter Abschnitt). Diese Bewertung galt auch für die Analyse der Überstände. Dieses Ergebnis könnte durch einen Abbau des F-Proteins erklärt werden, möglicherweise nach vorheriger Internalisierung.

Der in **Abb. 5.17** gezeigte Versuch wurde parallel mit hFsyn-sol-FLAG-Protein durchgeführt und ergab dabei dieselben Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.18:** Western Blot von gereinigtem bF/hFsyn-sol-FLAG-Protein an immobilisiertes Heparin. Jeweils 4  $\mu$ l der F-Proteine wurden über Nacht bei 4 °C mit 50  $\mu$ l Heparin-Agarose inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Heparin-Sediment in Probenpuffer gekocht und zusammen mit der ungebundenen Fraktion im Überstand einer SDS-PAGE/Western Blot unterzogen. Zur Kontrolle wurde pCG1-Zellkulturüberstand mit Heparin-Agarose inkubiert (Kontrolle). Zusätzlich wurde das jeweilige F-Protein in PBS ohne Heparininkubation bei 4 °C mitgeführt ( $\times$  4 °C). Die Membran wurde mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper gefärbt. F-Protein-Banden sind mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet.

## 5.4 Bindung an Glykosaminoglykane

### 5.4.1 Bindung an Heparin-Agarose

Es ist bekannt, dass die F-Proteine von BRSV und HRSV in der Lage sind, an Glykosaminoglykane, darunter hauptsächlich an heparin-ähnliche Strukturen, zu binden (Feldman et al., 2000). Um zu prüfen, ob diese fundamentale Eigenschaft auch bei den hier erzeugten löslichen FLAG-markierten F-Proteinen vorhanden war, wurden diese in gereinigter Form mit Heparin-Agarose über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C verwahrt. Das Sediment wurde gewaschen, in Probenpuffer gekocht und anschließend zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Im Western Blot wurde mittels Anti-FLAG-PO-Antikörper F-Protein nachgewiesen (**Abb. 5.18**).

Zunächst galt festzustellen, ob die Inkubation über Nacht bei 4 °C nicht die F-Proteinstruktur beeinträchtigt hatte. Dafür wurde in PBS gelöstes bFsyn-sol-FLAG- bzw. hFsyn-sol-FLAG-Protein ohne Heparin im Kühlraum gelagert und später auf das Gel aufgetragen (**Abb. 5.18**, jeweils linke Spur pro Konstrukt). Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass sich das Laufverhalten nach der Inkubation nicht verändert hatte. Außerdem bleiben auch die multimeren Formen (130 und 200 kDa) erhalten, welche besonders wichtig für die Bindung an Zellen waren. Die Negativ-Kontrolle ergab wie erwartet keine F-spezifischen Signale.

Die jeweils mittlere Spur (H) in jedem Abschnitt zeigte an Heparin-Agarose gebundenes F-Protein. Um die Proteine für die SDS-PAGE vorzubereiten, war es nötig, sie von der Heparin-Agarose durch eine Inkubation für 10 min bei 96 °C abzulösen. Dadurch zerfielen multimeren F-Proteine zu Monomeren mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa. Für beide löslichen RSV-F-Proteine konnte eine Proteinbande bei den Heparinproben bei ca. 65 kDa im Western Blot detektiert werden (**Abb. 5.18**, H). Jeweils rechts daneben wurde der Überstand (Ü) des Heparin-Agarose-Sediments auf das Gel aufgetragen (**Abb. 5.18**, Ü). Die Proben wurden nicht gekocht, wodurch F-Proteine ihre multimeren beibehalten konnten. Daher konnten in diesen Spuren auch F-spezifische Proteinbanden nicht nur bei 65 kDa, sondern auch bei 130 kDa und 200 kDa möglich sein. Tatsächlich wurde in diesen Fraktionen ungebundener F-Proteine bei bF und hF eine schwache Bande bei ca. 130 kDa sichtbar. Zusätzlich dazu konnte beim hF auch noch eine sehr schwache Bande bei 65 kDa detektiert werden.

Aus dem Experiment wurde geschlossen, dass die verwendeten löslichen F-Proteinkonstrukte von bF und hF gleichermaßen in der Lage waren, an immobilisiertes Heparin zu binden. Allerdings war die Bindung nicht vollständig und ein kleiner Anteil des F-Proteins verblieb in der ungebundenen Fraktion im Überstand.

#### **5.4.2 BRSV-Infektion auf heparin-negativen Zellen**

Um die Wechselwirkung der gereinigten F-Proteine mit Heparin und anderen zellulären Oberflächenstrukturen auf der Zelle zu untersuchen, wurden zwei L-Zelllinien (Maus) verwendet (Banfield et al., 1995). Diese wurden freundlicherweise vom Friedrich-Löffler-Institut (Insel Riems) zur Verfügung gestellt. Die sog9-Zellen hatten einen Defekt in der GAG-Synthese und stellten kein Heparansulfat her. Für BRSV und HRSV ist beschrieben, dass das F-Protein an

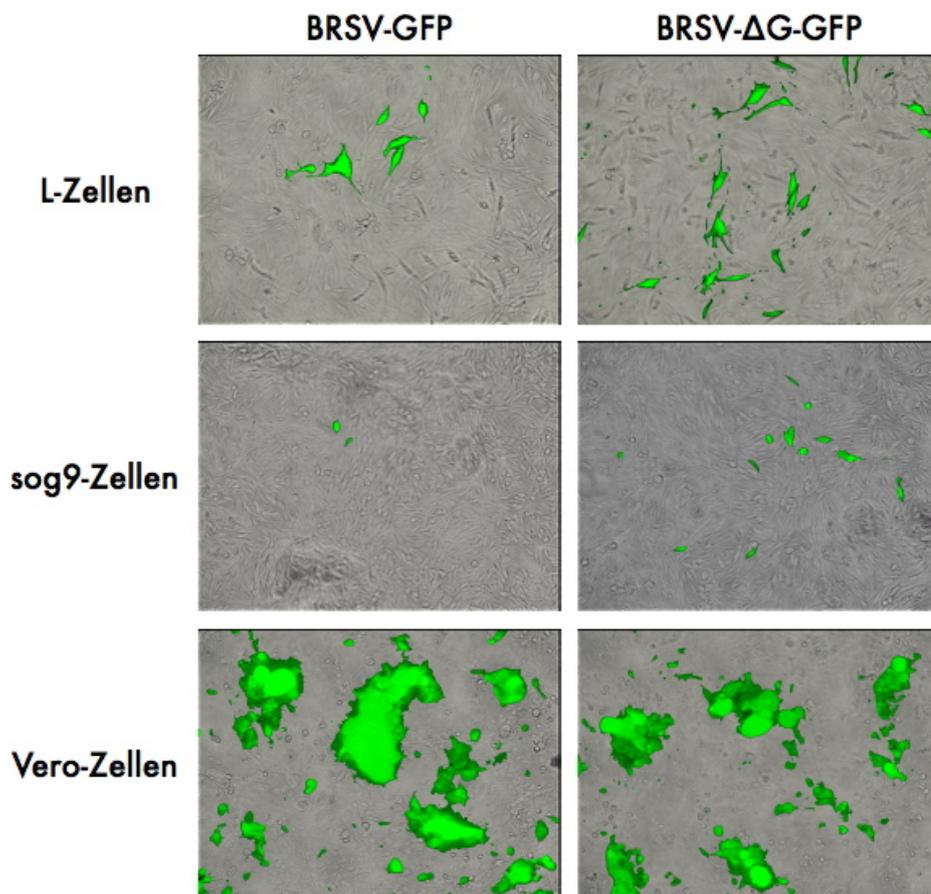
derartige Zuckerstrukturen bindet (Krusat & Streckert, 1997; Feldman et al., 2000). Dadurch konnte die Bindung des F-Proteins an andere Strukturen, außer Heparin, untersucht werden. Die Mutterzelllinie (L-Zellen) diente als Vergleichslinie, da diese Zellen keine Defekte in der GAG-Synthese aufwiesen. Da in den anderen Teilen der Arbeit bevorzugt mir Vero-Zellen gearbeitet wurde, wurden diese Zellen in diesem Abschnitt als Vergleichszelllinie bzw. Positivkontrolle bei Infektions- und Bindungsexperimenten mitgeführt.

Zunächst wurden Infektionsexperimente durchgeführt, um die Empfänglichkeit dieser Zellen gegenüber BRSV-GFP zu ermitteln. Parallel dazu wurde auch mit BRSV $\Delta$ G-GFP infiziert, welches nur das F-Protein in der Virushülle trug (**Abb. 5.19**). Dadurch konnte gezielt die F-vermittelte Infektion dieser Zellen betrachtet werden. Da eine G-Deletionsmutation nur für BRSV verfügbar war, wurde in diesem Abschnitt der Arbeit nur die bovine Variante von RSV bzw. des F-Proteins untersucht.

Die Infektionsexperimente mit BRSV-GFP bzw. BRSV $\Delta$ G-GFP ergaben eine reduzierte Empfänglichkeit der sog9-Zellen gegenüber der Mutterzelllinie, den L-Zellen (**Abb. 5.19**, obere beiden Reihen). Dieser Unterschied war wahrscheinlich auf die fehlenden Heparansulfate auf der Zelloberfläche der sog9-Zellen zurückzuführen. Da aber eine Infektion dieser Zellen nicht vollständig verhindert werden konnte, musste eine andere zelluläre Oberflächenstruktur als Rezeptor für BRSV fungieren. Im Vergleich dazu wurden Vero-Zellen infiziert, da diese als Standardzellen für die BRSV-/HRSV-Titration galten. Diese Zellen zeigten eine wesentlich stärkere Empfänglichkeit gegenüber BRSV und BRSV $\Delta$ G, was sich in der Anzahl infizierter Zellen und in der Größe der Synzytien widerspiegelte (**Abb. 5.19**, untere Reihe). Die L- und sog9-Zellen bildeten nach Infektion fast keine Synzytien.

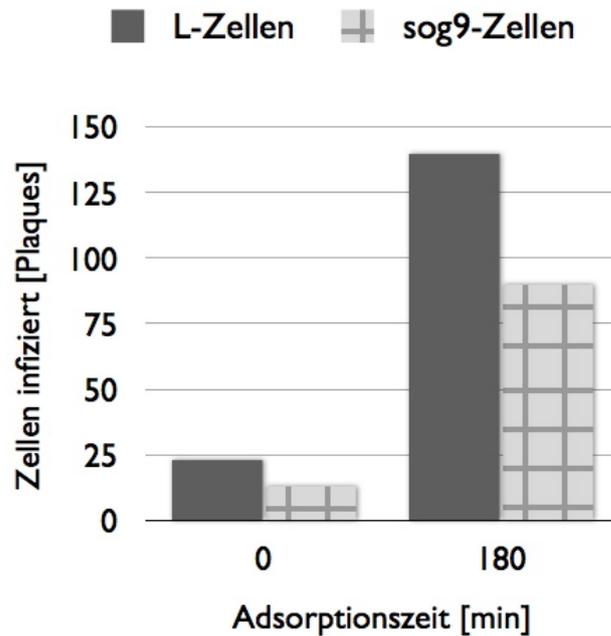
Weiterführend wurde die Infizierbarkeit von L- bzw. sog9-Zellen mit BRSV $\Delta$ G-GFP genauer untersucht. Durch Titrationsexperimente war es möglich, die Anzahl infizierter L- bzw. sog9-Zellen zu bestimmen und zueinander in Relation zu setzen (**Abbildung 5.20**).

In **Abbildung 5.20** ist ein Unterschied in der Anzahl infizierter Zellen zwischen den beiden Zelllinien sichtbar. Bereits bei dem Nullwert, der als Waschkontrolle diente, ließ sich eine schwach größere Anheftungsfähigkeit von BRSV $\Delta$ G-GFP an die L-Zellen ablesen (**Abbildung 5.20**, linker Abschnitt). Nach einer Inkubationszeit von 180 min war zu erkennen, dass die F-vermittelte Anheftung des Virus an die heparansulfat-defizienten sog9-Zellen gegenüber den L-Zellen um ca. 30% reduziert war. Die Ergebnisse beschreiben den Anteil des F-vermittelten



**Abbildung 5.19:** Fluoreszenzmikroskopie von L- und sog9-Zellen nach BRSV-GFP- und BRSV $\Delta$ G-GFP-Infektion. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1. Die Zellen wurden fixiert und die Expression des GFP im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die linke Spalte zeigt BRSV-GFP- und die rechte Spalte BRSV $\Delta$ G-GFP-Infektionen. Aufgenommen mit einem 10er Objektiv. Fluoreszenz und Phasenkontrast wurden übereinandergelegt.

Eintritts des Virus in die Zelle, wobei die rezeptor-unabhängige Heparansulfatadsorption eliminiert wurde und daher nur die Infektion über den unbekanntem Rezeptor stattfinden konnte. Die L-Zellen, die die Mutterzelllinie der sog9-Zelllinie darstellten, besaßen keinen Defekt in der GAG-Synthese und stellte somit dem F-Protein im BRSV $\Delta$ G-GFP neben dem unbekanntem Rezeptor noch Heparansulfat für die Anheftung zur Verfügung. Somit lässt sich schlussfolgern, dass der Anteil der heparansulfat-unabhängigen Infektion 70% betragen muss und im durchgeführten Experiment durch die Infektion der sog9-Zellen demonstriert wurde.

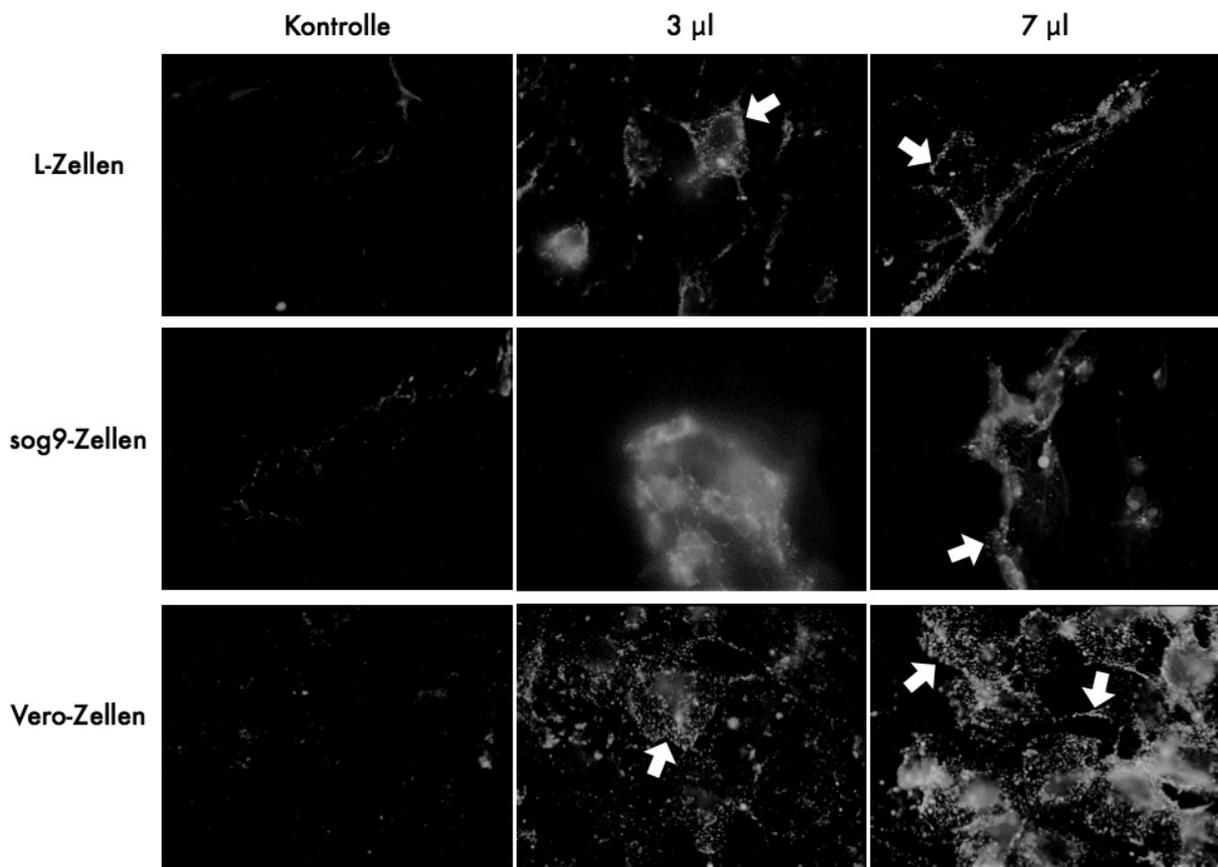


**Abbildung 5.20:** Infizierbarkeit von L- und sog9-Zellen mit BRSV $\Delta$ G-GFP. Die Infektion erfolgte mit einer abzählbaren Anzahl infektiöser Einheiten und die Virusinkubation auf den Zellen wurde nach 180 min gestoppt. Die Zellen wurden fixiert und die Plaques anhand der GFP-Expression infizierter Zellen im Fluoreszenzmikroskop gezählt. Werte für L-Zellen sind als graue Fläche, Werte für sog9-Zellen als karierte Fläche dargestellt.

### 5.4.3 Bindung des F-Proteins an heparin-negative Zellen

Mit Hilfe des Immunfluoreszenz-Bindungstests wurde geprüft, ob die unterschiedliche Infizierbarkeit der beiden Zelllinien auf die Anheftung des F-Proteins an die Zellen zurückzuführen war. Da durch die Infektionsstudien eine deutlich schlechtere Empfänglichkeit der L-Zellen im Vergleich zu Vero-Zellen für BRSV erkennbar war (**Abb. 5.19**), wurden für den Bindungstest neben der für diesen Test üblichen Menge von 3  $\mu$ l außerdem noch 7  $\mu$ l lösliches bFsyn-sol-FLAG-Protein eingesetzt (**Abb. 5.21**).

Der Immunfluoreszenz-Bindungstest stellte sich ähnlich dem Western Blot-Bindungstest in **Abbildung 5.21** dar. Die heparansulfat-positiven L-Zellen ermöglichten bFsyn-sol-FLAG-Protein an der Zelloberfläche zu binden (**Abb. 5.22**, obere Reihe). Bereits 3  $\mu$ l zeigen eine schwache, aber sichtbare Bindung, welche bei der höheren Dosis von 7  $\mu$ l ein noch stärkeres Signal ergab. Insgesamt lagen die Werte stark unter denen von Vero-Zellen (**Abb. 5.22**, untere Reihe). Sie waren aber dennoch höher als für die heparansulfat-negativen sog9-Zellen (**Abb. 5.22**, mittlere



**Abbildung 5.21:** Immunfluoreszenz-Bindungstest mit konzentriertem Kontroll-Zellkulturüberstand bzw. 3 µl, 7 µl gereinigtes bFsyn-sol-FLAG-Protein und L-, sog9- und Vero-Zellen. Gebundene F-Proteine wurden mit einem Anti-RSV-F-FITC-Antikörper angefärbt. Pfeile deuten auf F-Proteine. Aufgenommen mit einem 63er Objektiv.

Reihe). Bei diesen Zellen ließ sich bei einer Inkubation mit 3 µl F-Protein keine Bindung nachweisen. Erst nach der Inkubation mit 7 µl konnte gebundenes F-Protein auf den Zellen schwach detektiert werden. Zwar war eine Quantifizierbarkeit der Bindungsunterschiede zwischen L- und sog9-Zellen mit dieser Methode nicht möglich, jedoch war die Tendenz erkennbar.

Mit diesem Bindungsnachweis durch Immunfluoreszenz konnte ein Rückgang der Bindung von bFsyn-sol-FLAG-Protein an heparansulfat-negative Zellen (sog9-Zellen) gegenüber heparansulfat-positiven Zellen (L-Zellen) gezeigt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Infektionsanalysen zur Empfänglichkeit dieser Zelllinien gegenüber BRSVΔG-GFP, wobei der Virusanheftung und -eintritt ausschließlich F-vermittelt stattfinden konnten (Abb. 5.19, rechte Spalte).



# Kapitel 6

## Diskussion

### 6.1 Lösliche F-Proteine als Liganden an lebenden Zellen

Die in dieser Arbeit beschriebene Erzeugung löslicher viraler Fusionsproteine zur Untersuchung der Bindung an lebende Zellen wurde anhand des BRSV- und HRSV-F-Proteins erfolgreich durchgeführt (**Ergebnisse 5.1** und **5.2**). Dabei stellte sich heraus, dass eine starke, selektive Anreicherung der F-Proteine, unter Zuhilfenahme eines FLAG-Epitops zur Affinitätsreinigung, entscheidend für die Bindungsexperimente war. Die etablierten Bindungssysteme (Immunfluoreszenz- und Western Blot-Bindungstest) benutzten bFsyn-sol-FLAG und hFsyn-sol-FLAG als Liganden für die Bindung an Zelloberflächenstrukturen.

#### 6.1.1 Konstruktion und Reinigung

Die Konstruktion der löslichen F-Proteine erfolgte nach drei Kriterien: 1. Erhalt der strukturellen und biochemischen Eigenschaften. 2. Hohe Expression und Sekretion in den Zellkulturüberstand. 3. Gute Nachweisbarkeit. 4. Möglichkeit einer gezielten Anreicherung.

Ein wichtiger Aspekt des Proteindesigns war es, die natürliche Proteinstruktur weitestgehend zu erhalten, um die Situation im Virion nachzuahmen. Bei längeren Anhängen (z. B. GFP) musste damit gerechnet werden, dass aufgrund der Größe bzw. Anzahl an Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit struktureller Veränderungen und posttranslationaler Modifikationen erhöht

ist, was zu einem veränderten Phänotyp führen kann. Außerdem können in der zusätzlichen Aminosäuresequenz Motive enthalten sein, die bei der Expression, abhängig vom Zelltyp, eine Sekretion unterbinden oder die Degradation des Proteins in der Zelle beschleunigen. Auch wenn diese Bedenken experimentell ausgeräumt werden können, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die angefügte Sequenz die Tertiär- oder Quartärstruktur des F-Proteins stört und im Bindungsexperiment, sterisch oder biochemisch, die Wechselwirkung mit dem zellulären Interaktionspartner beeinflusst oder verhindert.

Aus diesen Gründen wurde darauf geachtet, dass die angehängte Aminosäureabfolge möglichst kurz war und sich weit entfernt von der putativen Region der Rezeptorbindung (F2-Untereinheit) sowie außerhalb der Multimerisierungsdomänen befand; letztere vermutet man in den HR-N- und HR-C-Abschnitten (Lawless-Delmedico et al., 2000; Matthews et al., 2000; Yin et al., 2006). Entsprechend war die FLAG-Markierung (DYKDDDDK) ideal, da auf diese Weise nur acht zusätzliche Aminosäuren C-terminal an das F-Protein angefügt werden mussten.

In Vorversuchen wurde die verbesserte Expression der verwendeten synthetischen cDNAs von BRSV-F und HRSV-F bestätigt (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf zeigten die durchgeführten Expressions-Experimente eine starke Proteinexpression von bFsyn-sol-FLAG und hFsyn-sol-FLAG (**Abb. 5.2** und **5.4**), sowie eine gute Nachweisbarkeit mittels Anti-FLAG-Antikörper im Zellkulturüberstand (**Abb. 5.3**). Da die bloße Ankonzentrierung der Proteine im Zellkulturüberstand per Filtrationszentrifugation nicht ausreichend war, um reproduzierbare Bindungstests durchzuführen, wurde die FLAG-Markierung erfolgreich zur Affinitätsreinigung der F-Proteine eingesetzt. Da diese Methode eine kompetitive Eluierung mit kommerziell verfügbaren FLAG-Peptiden bei physiologischem pH-Wert ermöglichte und gebundene FLAG-markierte Proteine nicht von den agarose-gekoppelten Antikörpern abgekocht oder bei extremen pH-Werten abgelöst werden mussten, bestand die Wahrscheinlichkeit, dass die native Struktur der gereinigten F-Proteine erhalten blieb.

Die in dieser Arbeit angewandte Methode der FLAG-Affinitätsreinigung von Liganden-Proteinen wurde für virale Proteine bisher noch nicht beschrieben. Viele Arbeitsgruppen wenden chromatographische Methoden zur Reinigung von Virusproteinen für Bindungsexperimente an, welche mit erheblichem maschinellen und zeitlichem Aufwand einhergehen (Boyle & Compton, 1998, Zelus et al., 1998)

Andere Strategien zur Gewinnung von löslichen viralen Glykoproteinen bestanden in der Ver-

gangenheit unter anderem darin, diese direkt vom Virion abzuspalten, zum Beispiel bei Influenza C mittels Bromelain (Formanowski & Meier-Ewert, 1988).

Das zur Proteinproduktion entwickelte sehr effiziente Expressionssystem beruhte auf einer transienten Transfektion der entsprechenden cDNA für b/hFsyn-sol-FLAG in BHK-21-Zellen. Um ca. 100 µl reine Proteinlösung am Ende zu erhalten, wurden in der Regel Zellen zweier 175 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen transfiziert, wobei pro Flasche 48,5 µg DNA und 130 µl Lipofectamine eingesetzt werden mussten. Dieser Umstand war mit gewissen Kosten verbunden. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Günther Keil (FLI, Riems) die Expression in einem Baculovirussystem geplant (König et al., 2003). Aus Zeitgründen konnte das Projekt allerdings nicht mehr in die Doktorarbeit integriert werden, sondern wird im Anschluss daran eingebunden.

### 6.1.2 Untersuchung der Struktur der löslichen F-Proteine

Es wird allgemein angenommen, dass die Ektodomänen von Glykoproteinen eigenständige Faltungsdomänen darstellen. Dies wurde durch verschiedene Arbeiten mit löslichen Glykoproteinen als Werkzeuge für biochemische Untersuchungen bestätigt, z. B. CD4 (Davis et al., 1990; Wu et al., 1997), Herpes Simplex Virus Typ 1 Glykoprotein D (Sisk et al., 1994) und La Crosse Virus Glykoprotein G1 (Pekosz & Gonzalez-Scarano, 1996). Dennoch lassen sich auch Berichte anführen, in denen die Abwesenheit der Transmembrandomäne zu einer veränderten Quartärstruktur des sezernierten Proteins führte. So zum Beispiel für ein ankerloses Spike Protein des Übertragbaren Gastroenteritisvirus der Schweine, welches unfähig zur Trimerisierung war (Gaudin et al., 1999; Godet et al., 1991). Und für eine lösliche Form des Hämagglutinin-Proteins (HA-Protein) des Influenzavirus, welches das ER als Monomer verließ, jedoch im späten Golgi-Apparat Aggregate bildete (Singh et al., 1990). Als Grund für dieses Phänomen wird einerseits der niedrige pH-Wert des Golgi-Kompartiments diskutiert und andererseits eine erniedrigte Qualitätskontrolle des ER für sezernierte Proteine, wobei offenbar auch fehlerhaft oligomerisierte Proteine nicht aussortiert werden (Singh et al., 1990; Vanlandschoot et al., 1998). Offensichtlich besteht also für einige Proteine die Rolle der Transmembranregion darin, die Homooligomerisierung zu fördern. Dies geschieht, indem sie die Diffusion von Proteinen auf die zwei Dimensionen der Membran reduzieren, wodurch die Assoziationskonstante der Untereinheiten erhöht wird (Gaudin et al., 1999). Darüberhinaus können Transmembrandomänen spezifisch den Oligomerisierungsprozess einleiten, wie es für MHC II-Moleküle berichtet wur-

de (Cosson & Bonifacino, 1992).

Diese Tatsachen waren Anlass, die Struktur der in dieser Arbeit verwendeten löslichen RSV-F-Proteine zu analysieren. Günstig war der Umstand, dass beim F-Protein von Paramyxoviren die Trimerisierung über die HR auf der F1-Untereinheit vermittelt wird und somit unabhängig vom Membrananker stattfinden kann (Lawless-Delmedico et al., 2000; Matthews et al., 2000; Yin et al., 2006). Durch die relativ sanfte Reinigung der löslichen Proteine ohne harsche Reagenzien bzw. extreme pH-Bedingungen wurde der Erhalt des natürlichen Zustands des Proteins angestrebt. Der Erfolg dieser Bemühungen konnte experimentell bestätigt werden (**Abb. 5.7**). Die gereinigten F-Proteine waren offensichtlich in der Lage, Homooligomere zu bilden. Diese Tatsache war von entscheidender Bedeutung für das Projekt, da sich die löslichen F-Proteine entsprechend ihrer natürlichen Struktur, wie sie im Virion vorkommt, verhielten. Dadurch wurden auch andere Bedenken bezüglich des Einflusses der Entfernung des Membranankers und des zytoplasmatischen Abschnitts und den dadurch bedingten Verlust einer Acylierungsstelle ausgeräumt. In einem Bericht von FLAG-markiertem HA2-Protein des Influenzavirus konnte sogar gezeigt werden, dass das FLAG-Peptid die Trimerisierung und Löslichkeit des HA2-Protein begünstigte, wenn es an den Carboxyterminus gekoppelt worden war (Chen et al., 1998).

Auch weitere Untersuchungen zur Proteinstruktur zeigten, dass das lösliche F-Protein die essenzielle Reifespaltung im Trans-Golgi-Netzwerk unterlief und korrekt in seine aktiven Untereinheiten gespalten wurde, die, nach erfolgter Sekretion, als F1-S-S-F2 im Zellkulturüberstand anwesend waren (**Abb. 5.5**).

### **6.1.3 Nachweis und Charakterisierung der Bindung an Zellen**

Die Funktionalität der löslichen F-Proteine wurde in Bindungsstudien getestet. In den Bindungsexperimenten konnte die gewünschte Fähigkeit zur Bindung an BRSV- bzw. HRSV-Wirtszellen demonstriert werden, wobei zwei Systeme zum Nachweis der Bindung etabliert wurden. Zunächst wurde der Immunfluoreszenz-Bindungstest vorgestellt, der in der Lage war, an Zellen gebundene F-Proteine qualitativ nachzuweisen (**Abb. 5.9, 5.10 und 5.11**). Nach der Inkubation von 3 µl gereinigten F-Proteins für 90 min auf Zellen wurden mittels Anti-RSV-F-FITC-Antikörper gebundene F-Proteine gefärbt. Allerdings war die Menge gebundener Proteine relativ gering und das Fluoreszenzsignal entsprechend schwach, sodass die Betrachtung

mit dem 63er Ölimmersions-Objektiv erfolgen musste und für Fotos eine lange Verschlusszeit gewählt werden musste, um die Bindung darzustellen. Auf Grund dieser Umstände war es nicht überraschend, dass die Eigenfluoreszenz der Zellen ebenfalls abgebildet wurde und mitunter die Auswertungen erschwerte, da sie zum Teil dieselbe Intensität besaß, wie die der gebundenen F-Protein-Antikörper-Komplexe an der Zelloberfläche (**Abb. 5.12**). Das Phänomen der Autofluoreszenz ist auf zelluläre Bestandteile (hauptsächlich NADH, Riboflavine und Flavin-Koenzyme) zurückzuführen (Aubin, 1979; Benson et al., 1979). Die Emissionswellenlängen dieser Moleküle liegen zwischen 500-700 nm nach Anregung mit blauem Licht. Die höchste Autofluoreszenz-Emission nach 488 nm Anregungswellenlänge befindet sich im grünen Bereich des Lichtspektrums und überlappt somit stark mit der Nachweisregion der FITC-Fluoreszenz (Shapiro, 1988). Zahlreiche Experimente zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz (Mosiman et al., 1997) der Zellen führten zum Verzicht auf eine Fixierung der Zellen nach der Bindungsphase (z. B. mit PFA). Außerdem wurde darauf geachtet, dass zum Tag der Durchführung des Bindungstests die Zellen nicht übermäßig konfluent gewachsen waren, da es dadurch häufiger zu abgekugelten Zellen kam, die eine starke Eigenfluoreszenz zeigten. Auch die Art der Zelllinie hatte einen Einfluss. So wurde beobachtet, dass Vero-Zellen eine niedrigere Autofluoreszenz besaßen, als beispielsweise HBE-Zellen oder Makrophagen.

Zur Etablierung des Bindungstests war es essenziell, dass die angehängte FLAG-Markierung nicht die Bindung vermittelte. Das Bindungsexperiment in **Abbildung 5.11** demonstrierte, dass die Bindung allein durch die Ektodomäne des F-Proteins vermittelt, da ein stark konzentriertes hFsyn-sol ohne FLAG-Markierung ein ebenso deutliches Fluoreszenzsignal zeigte, wie das hFsyn-sol-FLAG. Weiterführend wurde die Konzentrationsabhängigkeit für die Bindung an Zellen untersucht. Da eine Konzentrationsbestimmung nicht vorgenommen wurde, da dafür zu große Mengen der Proteinlösung verbraucht worden wären, wurde die Proteinreinigung stets nach einem strengen Protokoll durchgeführt, um so eine gewisse Einheitlichkeit der F-Proteinlösungen zu gewährleisten. In **Abbildung 5.15** wurden jeweils verschiedene Volumina einer bF-Proteinpräparation eingesetzt. Hierbei konnte der positive Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Fluoreszenzsignal demonstriert werden. Die geringe Menge von 0,5 µl reichte aus, um Bindung zu detektieren. Verwendete man stattdessen größere Mengen, wie z. B. 7 oder 10 µl, so wurde das Signal drastisch verstärkt, was auf die gesteigerte Anzahl gebundener F-Proteine zurückzuführen war.

Als weiterer Bindungsnachweis wurde der Western Blot-Bindungstest entwickelt. Hierbei wurden Zellen in Lösung mit 5  $\mu$ l löslichem F-Protein für 90 min schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Sediment wiederholt gewaschen wurde, wurde es lysiert und dann die gebundene sowie die ungebundene Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen. Im Western Blot wurde die FLAG-Markierung nachgewiesen (**Abb. 5.13**). Diese Nachweismethode barg den Vorteil, dass sie eine Quantifizierbarkeit der gebundenen Proteine ermöglichte. Zusätzlich gab sie noch Informationen zur Proteinstruktur. So legten die Ergebnisse der Western Blot-Bindungstests die Schlussfolgerung nahe, dass nur die trimere Fraktion (200 kDa) der F-Protein-Lösung in der Lage war, an die Zellen zu binden, da die dimere (130 kDa) bzw. monomere (65 kDa) Fraktion im Überstand verblieb (**Abb. 5.13** und **5.17**). Alternativ könnte es auch sein, dass durch die Bindung an Zellproteine die F-Proteine in räumliche Nähe zueinander kommen, woraufhin sich, vermittelt durch die *heptad repeats* im F-Protein, Homooligomere ausbilden.

Die Bedeutung des Vorhandenseins von multimeren F-Proteinen für ein Bindungsereignis konnte auch im Immunfluoreszenz-Bindungstest gezeigt werden (**Abb. 5.14**). Mit Hilfe einer Größenausschlussfiltration war es möglich, Monomere von Multimeren (Dimere oder Trimere) zu trennen. Wurden anschließend beide Fraktionen für Bindungsexperimente eingesetzt, so war es nur möglich, eine Bindung der multimeren F-Proteine nachzuweisen (**Abb. 5.14**, obere Reihe). Die Proteinlösung mit monomeren F-Proteinen verhielt sich wie die Negativkontrolle (**Abb. 5.14**, mittlere Reihe). Um die Trimerisierung der löslichen F-Proteine gezielt zu unterstützen bzw. zu stabilisieren, bietet es sich für künftige Untersuchungen an, die Trimerisierungsdomäne des GCN4-Proteins (32 AS) an das Protein zu koppeln. GCN4 ist ein weit verbreiteter eukaryotischer Transkriptionsfaktor (Harbury et al., 1993). Alternativ ließe sich auch das Trimerisierungs-Motif von Fibrin des T4-Bakteriophagen für diesen Zweck einsetzen (Yang et al., 2002). Arbeiten zu beiden Motiven an löslichen Glykoproteinen des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) zeigten die gewünschte Oligomerisierung der Proteine in Lösung (Yang et al., 2000, 2002). Da die N-terminale F2-Untereinheit mit Oberflächenproteinen der Wirtszelle interagiert, wird die Trimerisierungsdomäne C-terminal zwischen F1-Untereinheit und FLAG-Markierung integriert, um die Rezeptor-Wechselwirkung nicht zu stören.

In dieser Arbeit wurden zur Etablierung der Bindungsexperimente verschiedene Parameter ausprobiert. Die höchste Reproduzierbarkeit lieferte eine Bindungsphase für 90 min bei 22 °C. Sowohl im Immunfluoreszenz- (**Abb. 5.16**), als auch im Western Blot-Bindungstest (**Abb. 5.17**)

konnten diese Bedingungen als die günstigsten demonstriert werden. Es sei angemerkt, dass sich eine Inkubation bei 4 statt 22 °C für den Western Blot-Bindungstest durchaus eignet, da sie Proteindegradationsprozesse minimiert. Allerdings kann diese niedrige Temperatur nicht für den Immunfluoreszenzbindungstest eingesetzt werden, da sich die unfixierten Zellen bei 4 °C schneller abkugeln und dadurch, wie oben beschrieben, eine höhere Eigenfluoreszenz aufweisen. Inkubierte man die Zellen während der Bindungsphase hingegen bei 37 °C, so konnte nur ein vergleichsweise schwaches Signal im Western Blot detektiert werden (**Abb. 5.17**). Ebenfalls wichtig war die Dauer der Bindungsphase. Am deutlichsten konnte man den Verlauf der Bindungszunahme bei gesteigerter Adsorptionszeit in **Abbildung 5.17** betrachten. Es war bereits nach 15 min bei Inkubation bei 22 °C eine F-spezifische Bande bei ca. 130 kDa im Lysat zu erkennen, welche bei 90 min am stärksten ausgeprägt war. Die löslichen bF-Proteine banden also schon nach wenigen Minuten an die Zellen. Im Vergleich dazu dauert es ca. 30 min, bis 60% aller RSV-Partikel einer Lösung an die Zellen gebunden haben, und ca. 120 min, bis 80% aller Virionen zellassoziert vorliegen (Levine & Hamilton, 1969). Beide Datensätze decken sich in etwa, wodurch die Bindungstests mit löslichen F-Proteinen als authentisches Modell zur Untersuchung von Virusanheftung erscheinen.

Neben den verschiedenen Bindungsparametern war es durch Anwendung des Immunfluoreszenz-Bindungstests außerdem möglich, die räumliche Verteilung gebundener F-Proteine auf den Zellen zu untersuchen. Dabei fiel auf, dass die stärksten Fluoreszenzsignale von den Zwischenzellräumen aufgenommen wurden (**Abb. 5.9, 5.10 und 5.15**). Diese Beobachtung könnte Rückschlüsse auf einen zellulären Bindungspartner zulassen, der überwiegend lateral auf der Zelloberfläche lokalisiert wäre. Zur Untersuchung dieser Hypothese müssen die Bindungstests mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert werden, um eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale bei der hier durchgeführten Mikroskopie ausschließen zu können. Um die Spezifität der F-Proteinbindung an Zellen bildlich darzustellen, sollte ein homologer Kompetitionstest durchgeführt werden (Boyle & Compton, 1998). Dabei wird eine konstante Menge an b/hFsyn-sol-FLAG zu Zellen gegeben und zeitgleich in steigender Konzentration unmarkiertes F-Protein. Der Bindungstest wird per Western Blot mit einem Anti-FLAG-PO-Antikörper ausgewertet. Ist die Bindung von b/hFsyn-sol-FLAG spezifisch, so wird ab einer bestimmten Konzentration des unmarkierten b/hF-Proteins ein Rückgang des Peroxidasesignals des Anti-FLAG-Antikörpers auftreten, da bei dieser Konzentration beide Proteine um dieselben Bindungsstellen konkurrieren. Alternativ könnte man anstelle des unmarkierten F-Proteins auch

Virus benutzen. Dies birgt aber die Gefahr, dass durch den infektions-bedingten zytopathischen Effekt der Bindungstest schlecht interpretierbar werden könnte, da mit steigender Viruskonzentration die Biologie der Zellen verändert wird.

Ein weiterer Nachweis der Funktionalität der löslichen F-Proteine besteht in einem Infektionsinhibitionstest. Dabei werden die F-Proteine mit RSV-Wirtszellen ähnlich wie in den anderen Bindungstests vorinkubiert. Anschließend wird eine Infektion mit einer niedrigen MOI durchgeführt. Nach dreistündiger Inkubation wird das Virus entfernt und die Zellen mit Methylzellose überschichtet. Auf diese Weise lassen sich nach drei Tagen antikörper-gefärbte Plaques am Mikroskop auszählen. Der Ausgang des Experiments kann ganz unterschiedlich sein, abhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus der F-Protein-vermittelten Infektion. Sollte die Vorinkubation mit löslichen F-Proteinen zu einer Reduktion der infizierten Zellen führen, so kann man die Aussage treffen, dass ankerlose und membranständige F-Proteine in gleicher Weise an die Zielzellen bzw. deren Oberflächenstrukturen binden, und es zu einer Konkurrenzsituation kommt. Entsprechende Berichte liegen vor, z. B. für das G1-Protein des La Crosse Virus (Pekosz et al., 1995) und das Glykoprotein B des Zytomegalievirus (CMV) (Boyle & Compton, 1998). Sollte statt einer Inhibition, eine Steigerung der Plaques auftreten, so kann die Erklärung dafür sein, dass lösliche F-Proteine die virus-gebundenen F-Proteine bei der Fusion mit der Wirtszellmembran unterstützen. Ein solcher Fall wurde beim gD-Protein des Herpes Simplex Virus Typ 1 beobachtet (Cocchi et al., 2004). Diese Arbeiten sind für die nahe Zukunft geplant.

## 6.2 Zelluläre Bindungspartner und Tropismus

### 6.2.1 Bindung an Glykosaminoglykane (GAG)

Obwohl spezifische zelluläre Rezeptoren weder für BRSV noch für HRSV bekannt sind, so gibt es zahlreiche Belege für eine Bindung des Virus an GAG auf der Zelloberfläche (Bourgeois et al., 1998; Feldman et al. 1999, 2000; Hallak et al., 2000; Karger et al., 2001; Krusat & Streckert, 1997; Martinez & Melero, 2000; Techaarpornkul et al., 2002; Teng & Collins, 2002; Teng et al., 2001). Trotz dieser ausgeprägten Bindungsfähigkeit wird weiterhin ein noch unbekannter Rezeptor diskutiert (Hallak et al., 2000; Teng et al., 2002). Viele Viren sind auf GAG auf der Zelloberfläche angewiesen, um die Infektion einzuleiten (Byrnes & Griffin, 1998; Chen et al., 1997; Chung et al., 1998; Lee et al., 2004; Patel et al., 1993; Shafti-Keramat et al., 2003; Summerford & Samulski, 1998; Voigt et al., 1995; WuDunn & Spear, 1989). In Arbeiten mit löslichen GAG, wie Heparin oder Chondroitinsulfat B, konnte gezeigt werden, dass diese eine RSV-Infektion behindern können (Crim et al., 2007; Feldman et al., 1999; Hallak et al., 2000; Martinez & Meleron, 2000). Sowohl das G-, als auch das F-Protein binden an GAG, letzteres aber um ca. 50% schwächer (Karger et al., 2001; Techaarpornkul et al., 2002). Allerdings ist das G-Protein für die Infektion *in vitro* nicht essenziell, das F-Protein hingegen schon (Karron et al. 1997; Teng & Collins, 2002). Da GAG bei allen Viren nur eine primäre Bindung bewirken können, und für den Übergang zur Fusion noch die Bindung an einen anderen Rezeptor erforderlich ist, muss das F-Protein noch eine weitere Bindungsaktivität besitzen, die schließlich die Infektion vermittelt.

Um die GAG-Bindungsfähigkeit der in dieser Arbeit synthetisierten löslichen F-Proteine zu untersuchen, wurden die ankerlosen gereinigten Proteine mit an Agarose immobilisiertem Heparin inkubiert, da in den letzten Jahren deutlich wurde, dass andere GAG, außer Heparin bzw. Heparansulfat, so gut wie keine Relevanz für die Anheftung haben (Feldman et al., 2000; Karger et al., 2001; Krusat & Streckert; 1997; Techaarpornkul et al., 2002). In **Abbildung 5.18** konnte eindeutig die Heparinbindungsfähigkeit der F-Proteine demonstriert werden. Dieser Befund war sehr wichtig, da er die natürliche Funktionalität der Proteine beweist, welche für weitergehende Arbeiten zu Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Bindungsstudien gegeben sein muss.

Darüberhinaus wurde auch das Heparinbindungsverhalten des bovinen F-Proteins im Viruskon-

text studiert. Zu diesem Zweck wurde mit rekombinantem BRSV-GFP bzw. BRSV $\Delta$ G-GFP und heparansulfat-negativen (sog9-Zellen) bzw. -positiven (L-Zellen) Zellen gearbeitet. Die Ergebnisse aus diesen Studien wiesen einen deutlichen Unterschied zwischen heparansulfathaltigen und -freien Zellen auf (**Abb. 5.19** und **5.20**). Insgesamt wurde dabei der gravierende Unterschied zwischen Vero-Zellen und L-Zellen in der Virusreplikation und Synzytienbildung deutlich. Um aber Aussagen zum Einfluss von zellulärem Heparansulfat auf die F-abhängige Infektion zu treffen, waren die Infektionsversuche mit BRSV $\Delta$ G-GFP auf L- bzw. sog9-Zellen interessant. Dieses Virus besaß nur das F-Proteine des BRSV in seiner Hülle, wodurch die starke GAG-Bindung des G-Proteins ausgeschlossen wurde. In **Abbildung 5.19** bekommt man bereits einen ersten Eindruck der Infektionsunterschiede zwischen L- und sog9-Zellen. Nach Quantifizierung ergibt sich eine um ca. 30% reduzierte Infizierbarkeit der heparansulfat-negativen sog9-Zellen für BRSV $\Delta$ G-GFP (**Abb. 5.20**). Dieser Wert beschreibt den positiven Einfluss, den Heparansulfat auf den F-vermittelten Eintritt des Virus hatte und deckt sich mit Postulierungen in der Literatur (Techaarpornkul et al., 2002). Der Anteil von 70% geschieht durch andere Faktoren, unter denen sich wahrscheinlich auch mindestens ein unbekannter Interaktionspartner befindet, der als spezifischer Rezeptor für RSV fungieren könnte.

Der Bindungstest mit löslichem F-Protein wurde eingesetzt, um die F-vermittelte Heparinbindung isoliert von anderen Virusbestandteilen zu untersuchen (**Abb. 5.21**). Dabei wurden dieselben Zelllinien verwendet, wie zuvor für die Infektionsstudien. Auch bei diesem Experiment konnte ein besonders starkes Fluoreszenzsignal für an Vero-Zellen gebundene F-Proteine detektiert werden, besonders bei erhöhter Proteinmenge (**Abb. 5.21**, untere Reihe). Bei den L-Zellen und der heparansulfat-defizienten Tochterzelllinie sog9 war das Bindungssignal schwächer. Bei einer F-Proteinmenge von 3  $\mu$ l war ein schwaches Signal zu erkennen, das bei 7  $\mu$ l stärker wurde (**Abb. 5.21**, obere Reihe). Im Vergleich dazu ließ sich bei den sog9-Zellen erst bei 7  $\mu$ l eine Bindung nachweisen (**Abb. 5.21**, mittlere Reihe). Obwohl die Auswertung problematischer war, als bei Vero-Zellen, da die L-Zellen sich leichter vom Untergrund ablösten, zeigen diese Experimente auch nach 3 Wiederholungen dasselbe Ergebnis: Die Bindung von löslichem bFsyn-sol-FLAG ist heparansulfat-abhängig und bei sog9-Zellen reduziert. Obwohl eine Quantifizierung mit dem Immunfluoreszenz-Bindungstest nicht möglich war, entspricht das Resultat qualitativ den Ergebnissen der Infektionsstudien aus **Abbildungen 5.19** und **5.20**. Die Durchführung des Western Blot-Bindungstests gestaltete sich als problematisch, da die L- und sog9-Zellen während der Waschschriffe häufig verloren gingen. Entsprechende Experimente werden aber in

absehbarer Zeit nachgeholt.

Bei den in den **Abschnitten 5.4.2** und **5.4.3** durchgeführten Infektions- und Bindungsexperimenten zur Klärung der Rolle von Heparansulfat wurden Vero-Zellen lediglich als Vergleichszelllinie zur grundsätzlichen Beurteilung des Experiments mitgeführt, da mit diesen Zellen die Bindungstests eingangs etabliert wurden. Dadurch konnten die großen Unterschiede in der allgemeinen Permissivität von L- bzw. sog9-Zellen gegenüber Vero-Zellen bei einer Infektion mit BRSVΔG-GFP gezeigt werden. Da dadurch die Notwendigkeit einer erhöhten Menge an löslichem F-Protein bei Bindungsexperimenten absehbar wurde, konnten die Bindungsdaten entsprechend interpretiert werden. Methodisch wäre es jedoch günstiger gewesen, wenn eine Vero-Tochterzelllinie analog zur sog9-Zelllinie zur Verfügung gestanden hätte, die ebenfalls einen Defekt in der Heparansulfat-Synthese besessen hätte, da sich Vero-Zellen als besonders robust während der Durchführung der Bindungstest erwiesen hatten. Leider stand eine derartige Zelllinie nicht zur Verfügung. Dennoch wurden alternative Methoden angestrebt, die die Verwendung von Vero-Zellen zugelassen hätten. So wurde versucht, Heparin mittels spezifischer Glykosidase (Heparinase) von den Vero-Zellen abzuspalten, wie von anderen Arbeitsgruppen zuvor durchgeführt (Crim et al., 2007; Karger et al., 2001; Techaarpornkul et al., 2002) (Daten nicht gezeigt). Problematisch bei diesem Ansatz war die Tatsache, dass die Zelle stets neue GAG synthetisierte, sodass mit Glykosidasen abgedautes Heparansulfat eventuell zum Versuchszeitpunkt bereits durch neusynthetisiertes auf der Zelloberfläche ersetzt worden war. Darüberhinaus gab es keine Daten darüber, inwieweit die Glykosidasebehandlung in der Lage war, sämtliche Heparansulfate abzuspalten. In diese Problematik gehört auch der Aspekt des Verbleibs der Glykosidasen auf der Oberfläche der Zellen. Dieser Umstand könnte sich sicherlich nachteilig auf die in dieser Arbeit angewandten Bindungstests auswirken, indem die Enzyme sterisch die Zelloberfläche für F-Proteine blockieren (Axel Karger, FLI, Riems; persönliche Kommunikation). Aufgrund dieser Probleme wurde diese Methode nach wenigen Durchführungen verworfen.

Eine weitere Methode stellte die Zugabe von Natriumchlorat zum Zellkulturmedium dar, wodurch gezielt die GAG-Synthese der Zelle gehemmt werden sollte (Karger et al., 2001) (Daten nicht gezeigt). Diese Methode hatte jedoch einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen und musste zudem über wenigstens 24 Stunden angewandt werden. Auch hier bestand ein großer Nachteil in der Unsicherheit über den Grad des Erfolges der Reduktion der GAG von der Zelloberfläche. Ob wirklich die Zelloberfläche zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung

frei von GAG war, ließ sich nicht eindeutig sicherstellen. Auch dieser experimentelle Ansatz wurde nach einigen Durchführungen eingestellt, um sich ganz auf die Versuche mit L- und sog9-Zellen zu konzentrieren.

Bei den hier vorgestellten Infektionsstudien besteht allgemein die Möglichkeit der graduellen Adaptation der in Zellkultur vermehrten RS-Viren an diese Wirtszellen (**Abb. 5.19** und **5.20**). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass das beobachtete Infektionsverhalten, speziell im Bezug auf die Heparinbindungsstudien, künstlich erzeugt wurde und mit der Situation im Feld wenig gemein hat (Crim et al., 2007; Techaarpornkul et al., 2002). Jedoch gibt es einen Bericht über primäre Virusisolate, deren initiale Vermehrung in vitro ebenfalls durch Heparin gehemmt wurde (Teng et al., 2001). Außerdem demonstriert die vorliegende Arbeit, dass die lösliche Ektodomäne des F-Proteins, basierend auf der Wildtyp-Aminosäuresequenz, in der Lage ist, an Heparin zu binden. Diese Befunde zeigen eine eindeutige Relevanz der GAG- bzw. Heparinbindung durch RSV bzw. das F-Protein an.

### 6.2.2 Rezeptor

Für ein erfolgreiches Eindringen des Virions in die Wirtszelle sind zwei Reaktionen entscheidend: Die Anheftung und die Penetration. Anders als bei vielen Viren, die bei einem niedrigen pH-Wert mit der Wirtszelle fusionieren, benötigen solche, die bei neutralem pH-Wert mit der Plasmamembran verschmelzen, zelluläre Rezeptoren oder weitere Faktoren (Weiss, 1992). Bei diesem Vorgang wechselwirken virale Oberflächenprotein(e) spezifisch mit Strukturen auf der Wirtszelle. RSV besitzt drei solcher Glykoproteine in seiner Lipidhülle, das G-, das F- und das SH-Protein. Das G-Protein dient der primären Anheftung des Virions an die Zelle über GAG-Interaktion und das F-Protein vermittelt die Fusion mit der Wirtszellmembran. Die Funktion des SH-Proteins ist nicht eindeutig geklärt, seine Rolle bei der Infektion von Zellkulturen scheint jedoch vernachlässigbar zu sein. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass sowohl das G-Protein als auch das F-Protein an GAG binden. Es ist bekannt und wurde auch in dieser Arbeit in **Abbildung 5.19** demonstriert, dass das F-Protein in Abwesenheit des G-Proteins in der Lage ist, zumindest in Zellkultur, die Virusinfektion und -replikation zu vermitteln (Feldman et al., 2000; Techaarpornkul et al., 2002). Die von anderen berichtete und ebenfalls in dieser Arbeit demonstrierte Fähigkeit der GAG- bzw. Heparinbindung des F-Proteins ist jedoch kein Hinweis auf den zellulären Rezeptor, sondern dient höchstwahrscheinlich nur der Anheftung des Virions (Crim

et al., 2007; Feldman et al., 2000; Techaarpornkul et al., 2002; Teng & Collins, 2002). Diese Bindungsaffinität muss nicht zwangsläufig mit der Infizierbarkeit der Zelle korreliert sein, da eine Absättigung von Virionen mit löslichem Heparin nicht zu einer Inhibition der Infektion führte (Feldman et al., 2000; Techaarpornkul et al., 2002). Zusätzlich wurde auch gezeigt, dass auch heparansulfat-negative sog9-Zellen infizierbar mit BRSV waren (**Abb. 5.19**). Daher geht man davon aus, dass neben der Heparinbindungsfähigkeit eine weitere Bindungsaffinität zu einer bestimmten Oberflächenstruktur auf den Wirtszellen besteht. Dieser Rezeptor ist letzten Endes für eine Infektion notwendig und könnte auch den speziesspezifischen Eintritt vermitteln.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Zellproteine als Rezeptorkandidaten bzw. Interaktionspartner von RSV untersucht. So galt zum Beispiel die GTPase RhoA als Rezeptorkandidat (Pастey et al., 1999). Dies wurde aber revidiert, indem berichtet wurde, dass RhoA nicht auf der Oberfläche lokalisiert ist und außerdem eine Inhibition des Proteins keine Auswirkung auf die Empfänglichkeit der Zelle gegenüber RSV hat (Gower et al., 2005). Weitere Interaktionspartner sind Toll-like Rezeptoren (Rudd et al., 2005), CX3CR1 (Tripp et al., 2001), Annexin II (Malhotra et al., 2003), ICAM (Behera et al., 2001), der Rezeptor für den Tumornekrosefaktor (Langedijk et al., 1998), Surfactant-Protein A oder D (Ghildyal et al., 1999; Hickling et al., 1999) und GAG (Crim et al., 2007; Feldman et al., 2000). Die entwickelten Bindungstests könnten in Zukunft dafür eingesetzt werden, den zellulären Rezeptor von BRSV bzw. HRSV aufzuklären. Allerdings würde die Bindung an GAG die spezifische Wechselwirkung überlagern, sodass es im Bindungstest schwierig sein wird, die Daten korrekt zu interpretieren. Auf lange Sicht wird es nötig sein, Methoden, wie zum Teil oben beschrieben, zur Entfernung der GAG-Strukturen einzusetzen. Im Allgemeinen wäre der erste Schritt die Identifikation einer Zelllinie, die entweder negativ in Infektion und Bindungstest ist oder die auffällig gut infizierbar ist und ein überdurchschnittlich starkes Bindungssignal liefert. Tatsächlich wurden in diesem Zusammenhang viele verschiedene Zellen per Infektion- und Bindungsstudien im Lauf dieser Arbeit untersucht. Obwohl es sich dabei um sehr verschiedene Zelltypen handelte (immortalisierte Epithelzellen und Fibroblasten, primäre Epithelzellen, Fibroblasten, Immunzellen), wurden keine Zellen gefunden, die negativ in der Infektion und Bindung oder überdurchschnittlich empfänglich für Virus bzw. F-Protein waren. Diese Befunde decken sich mit Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (Branigan et al., 2005).

Zunächst könnte schon eine Literaturrecherche zu der auffälligen Zelllinie Aufschluss über in-

dividuelle Proteinexpressionsmuster geben. So exprimieren Immun-Zellen beispielsweise wesentlich mehr Rezeptoren für Faktoren des Immunsystems auf ihrer Oberfläche, als andere Zellen. Im Fall einer verstärkten Infizierbarkeit bzw. Bindungsfähigkeit einer bestimmten Zelllinie könnte man experimentell eine Koimmunpräzipitation mit Ganzzelllysaten und gereinigtem F-Protein durchführen, welche anschließend zur Bindungsstabilisierung chemisch quervernetzt werden könnten. Alternativ würde man die Oberflächenproteine der Zelle isolieren und einer SDS-PAGE unterziehen und nach stark exprimierten Proteinen suchen. Die isolierten Membranproteine der Zellen könnte man mittels Western Blot auf einer Membran fixieren und diese dann mit einer Lösung gereinigter F-Proteine inkubieren. Mittels eines Anti-F- bzw. Anti-FLAG-Antikörpers wäre es möglich, gebundene F-Proteine auf der Membran zu detektieren. Die Bande, bei der gebundenes F-Protein nachgewiesen wurde, würde bei einer weiteren SDS-PAGE der Zelloberflächenproteine nach Coomassiefärbung ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie sequenziert und somit identifiziert werden können (Schwegmann-Wessels et al., 2002). Zusätzlich könnte ein Rezeptorkandidatenprotein ebenfalls als lösliche Form in BHK-21-Zellen exprimiert und anschließend über eine angefügte FLAG-Markierung oder anderweitig affinitäts-gereinigt werden. Für Wechselwirkungsstudien dieses Proteins mit dem F-Protein hätte man dann den Vorteil, hochreine Lösungen vorliegen zu haben, die frei von anderen Proteinen oder Verunreinigungen wären. Unter dieser Voraussetzung hätte man auch methodisch bessere Möglichkeiten und könnte die Protein-Proteininteraktion z.B. mittels Oberflächenplasmonresonanz- oder Röntgenstrukturanalyse untersuchen. Lösliche Kandidatenproteine könnten auch dazu eingesetzt werden, um die Infektion zu inhibieren, indem sie vor Virusgabe mit den Zellen inkubiert werden (Hofmann et al., 2004; Li et al., 2003). Als weitere Methoden zur Untersuchung von Rezeptorkandidaten können Überexpressionstechniken in resistenten Zelllinien dienen. Im Fall der Identifizierung des angiotensin-konvertierenden Enzyms 2 (ACE 2) als zellulären Rezeptor des SARS-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV) wurden zuvor nicht-infizierbare humane Nierenzellen (293T) per transienter Transfektion der ACE2-cDNA empfänglich für das Virus (Li et al., 2003). Im umgekehrten Fall sollte es möglich sein, mit Hilfe von *small interfering* (si)RNA die Translation der mRNA für das Protein zu reduzieren und somit die Infizierbarkeit der Zelle herabzusetzen. Steht ein Antikörper gegen das vermutete Rezeptorprotein zur Verfügung, so sollte eine Inkubation damit eine anschließende Infektion stören können (Li et al., 2003).

### 6.2.3 Tropismus

Neben der Aufklärung des zellulären Rezeptors von BRSV und HRSV ist auch der unterschiedliche Tropismus der beiden Viren sehr interessant. Obwohl eine große genetische Ähnlichkeit auf Aminosäureebene von ca. 80% der F-Proteine beider Viren zueinander besteht (Walravens et al., 1990) und beide Varianten in der Lage sind, permanente Zelllinien zu infizieren, so wird doch in der Natur ein strenger Wirtstropismus beobachtet. Es gibt keine Berichte einer BRSV-Infektion im Menschen (Buchholz et al., 1999; Kimman & Westerbrink, 1990). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der F-Proteine beider Varianten, so findet man eine Übereinstimmung von 88% der F1-, jedoch nur 67% unter den F2-Untereinheiten (Walravens et al., 1990). In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten von Schlender et al. (Schlender et al., 2003) besonders interessant, da sie zeigten, dass der spezies-spezifische Eintritt von RSV durch die F2-Untereinheit vermittelt wird. Allerdings wurden diese Untersuchungen noch nicht auf Aminosäureebene durchgeführt, da häufig mit rekombinanten Viren gearbeitet wurde, und eine große Studie mit vielen verschiedenen Punktmutationen im F-Protein extrem aufwändig wäre. Mit den in dieser Arbeit entwickelten Reinigungs- und Bindungssystemen für RSV-F-Proteine an lebende Zellen steht nun ein Werkzeug zur Verfügung, mit vergleichbar geringem Zeit- und Arbeitsaufwand eine Reihe von Aminosäureaustauschen in das F-Protein zu integrieren, um die essenziellen Aminosäuren zu identifizieren, die entscheidend für die wirtsspezifische Anheftung sind (z. B. per Alanin-scan). Da häufig prolinreiche Regionen charakteristisch sind für Orte an denen Protein-Protein-Wechselwirkungen stattfinden, würde die Anwesenheit eines solchen Abschnitts die Mutationsstudien beschleunigen (Cocchi et al., 2004). Allerdings konnte für das F-Protein keine entsprechende Sequenzauffälligkeit gefunden werden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Hintergrund PBMC aus bovinem und auch humanem Blut isoliert, da hier der spezies-spezifische Eintritt von BRSV bzw. HRSV beobachtet werden könne (Schlender et al., 2003). Leider waren, entgegen Berichten von Schlender und Kollegen, Makrophagen beider Spezies gleichermaßen mit BRSV bzw. HRSV infizierbar, sodass es nicht möglich war, mit diesen Zellen die tropismus-relevanten Aminosäuren auf dem bF- bzw. hF-Protein per Bindungstest zu bestimmen.

Der Zelltropismus muss jedoch nicht zwingend durch eine Oberflächenstruktur auf den unterschiedlichen Wirtszellen bedingt sein. Denkbar ist auch eine Situation, in der beide Viren gleichermaßen erfolgreich in die jeweiligen Zellen des Menschen und des Rindes eindringen

können, jedoch aber nur das korrespondierende Virus sich produktiv replizieren kann. Dies könnte am einfachsten durch eine unterschiedlich starke Interferonantwort der infizierten Zelle erfolgen, die gegen beide Viren unterschiedlich stark ausfällt. Bei Retrovirusinfektionen in Affen wurde gezeigt, dass antivirale Proteine in der Zelle den Tropismus vom HIV-1 bestimmen. Hierbei erkennt das zelluläre Protein TRIM-5-Zyclophilin, eintretende retrovirale Kapside und inaktiviert diese (Virgen et al., 2008). Entsprechend sind weitere Szenarien vorstellbar, wonach nicht das reine Vorhandensein eines Oberflächenmoleküls über das Infektionsereignis entscheidet, sondern die intrazelluläre Umgebung die Expression bzw. Prozessierung viraler Proteine oder die Virusgenomreplikation oder den Virionzusammenbau verhindert. In diesem Fall würde ebenfalls eine Anheftung stattfinden, jedoch keine Virusvermehrung.

Um diese Fragen zu beantworten müssen umfangreiche Studien angestellt werden, die auch methodisch sehr vielfältig sein sollten, um alle Möglichkeiten des RSV-Tropismus untersuchen zu können.

# Literaturverzeichnis

ARUMUGHAM, R. G., SEID, R. C. Jr., DOYLE, S., HILDERETH, S. W. & PARADISO, P. R. (1989): Fatty acid acylation of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Biol. Chem.* **264**, 10339-10342.

ATREYA, P. L., PEEPLES, M. E. & COLLINS, P. L. (1998): The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J. Virol.* **72**, 14521461.

AUBIN, J. E. (1979): Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 36-43.

BAKER, K. A., DUTCH, R. E., LAMB, R. A. & JARDETZKY, T. S. (1999): Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol. Cell* **3**, 309-319.

BANFIELD, B. W., LEDUC, Y., ESFORD, L., SCHUBERT, K. & TUFARO, F. (1995): Sequential isolation of proteoglycan synthesis mutants by using herpes simplex virus as a selective agent: evidence for a proteoglycan-independent virus entry pathway. *J. Virol.* **69**, 3290-3298.

BEHERA, A. K., MATSUSE, H., KUMAR, M., KONG, X., LOCKELY, R. F. & MOHAPATRA, S. S. (2001): Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 188-195.

BENNETT, C. R. Jr. & HAMRE, D. (1962): Growth and serological characteristics of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis* **110**, 8-16.

BENSON, R. C., MEYER, R. A., ZARUBA, M. E. & MCKHANN, G. M. (1979): Cellular autofluorescence: Is it due to flavins? *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 44-48.

BERMINGHAM, A. & COLLINS, P. L. (1999): The M2-2 protein of human respiratory syn-

cytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11259-11264.

BOURGEOIS, C., BOUR, J. B., LIDHOLT, K., GAUTHRAY, C. & POTHIER, P. (1998): Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *J. Virol.* **72**, 7221-7227.

BOWEN, H. A. & LYLES, D. S. (1982): Kinetics of incorporation of Sendai virus proteins into host plasma membranes and virions. *Virology* **121**, 1-11.

BOYLE, K. A. & COMPTON, T. (1998): Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.* **72**, 1826-1833.

BRATT, M. & GALLAGHER, W. (1969): Preliminary analysis of the requirements for fusion from within and fusion from without by Newcastle disease virus. *Natl. Acad. Sci. U.S.A* **64**, 536-540.

BRACIALE, T. J. (2005): Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 141-146.

BRANIGAN, P. J., LIU, C., DAY, N. D., GUTSHALL, L. L., SARISKY, R. T. & DEL VECCHIO, A. M. (2005): Use of a novel cell-based fusion reporter assay to explore the host range of human respiratory syncytial virus F protein. *Virol. J.* **2**, 54-65.

BRIZZARD, B. L., CHUBERT, R. G. & VIZARD, D. L. (1994): Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* **16**, 730-735.

BUCHHOLZ, U. J., FINKE, S. & CONZELMANN, K. K. (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**, 251-259.

BUKREYEV, A., WHITEHEAD, S. S., MURPHY, B. R. & COLLINS, P. L. (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**, 8973-8982.

BYRNES, A. P. & GRIFFIN, D. E. (1998): Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 7349-7356.

CALDER, L. J., GONZALES-REYES, L., GARCIA-BARRENO, B., WHARTON, S. A., SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. & MELERO, J. A. (2000): Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* **271**, 122-131.

CARDENAS, S., AUAIS, A. & PIEDIMONTE, G. (2005): Palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus infection. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **3**, 719-726.

CATHOMEN, T., BUCHHOLZ, C. J., SPIELHOFER, P. & CATTANEO, R. (1995): Preferential initiation at the second AUG of the measles virus F mRNA: a role for the long untranslated region. *Virology* **214**, 628-632.

CHANOCK, R. M., ROIZMAN, B. & MEYERS, R. (1957): Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* **66**, 281-290.

CHEN, J., SKEHEL, J. J. & WILEY, D. C. (1998): A polar octapeptide fused to the N-terminal fusion peptide solubilizes the influenza virus HA2 subunit ectodomain. *Biochemistry* **37**, 13643-13649.

CHEN, Y., MAGUIRE, T., HILEMAN, R. E., FROMM, J. R., ESKO, J. D., LINHARDT, R. J. & MARKS, R. M. (1997): Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**, 866-871.

CHOPPIN, P. & COMPANS, R. (1975): Reproduction of paramyxoviruses in H. FRAENKEL-CONRAT & R. R. WAGNER (Hrsg.) *Comprehensive Virology*. Plenum Pub. Corp., New York. 95-178.

CHUNG, C. S., HSIAO, J. C., CHANG, Y. S. & CHANG, W. (1998): A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 1577-1585.

CLARKE, S. K. R., GARDNER, P. S., POOLE, P. M., SIMPSON, H. & TOBIN, J. O. H. (1978): Respiratory syncytial virus infection: admissions to hospital in industrial, urban, and rural areas. Research Council subcommittee on respiratory syncytial virus vaccines. *Br. Med. J.* **2**, 796-798.

- COCCHI, F., FUSCO, D., MENOTTI, L., GIANNI, T., EISENBERG, R. J., COHEN, G. H., CAMPADELLI-FIUME, G. (2004): The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7445-7450.
- COLLINS, P. L. & MOTTET, G. (1991): Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 3095-3101.
- COLLINS, P. L. & WERTZ, G. W. (1983): cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3208-3212.
- 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. 103-162.
- COLLINS, P. L. (1999): Respiratory syncytial virus-human (Paramyxoviridae) in: GRANOFF, A. & WEBSTER, R. G. (Hrsg.); *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press, San Diego. 1479-1487.
- COLLINS, P. L., MCINTOSH, K. & CHANOCK, R. M. (2001): Respiratory syncytial virus; in: KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. (Hrsg.) *Fields Virology*, 4th edition. Lippincott, Philadelphia. 1443-1485.
- COSSON, P. & BONIFACINO, J. S. (1992): Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science* **258**, 659-662.
- COSTA, M., GARCIA, L., YUNUS, A. S., ROCKEMANN, D. D., SAMAL, S. K. & CRISTINA, J. (2000): Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. *Vet. Res.* **31**, 241-246.
- CRIM, R. L., AUDET, S. A., FELDMAN, S. A., MOSTOWSKI, H. S. & BEELER, J. A. (2007): Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity. *J. Virol.* **81**, 261-271.
- DALBY, B., CATES, S., HARRIS, A., OHIKI, E. C., TILKINS, M. L., PRICE, P. J. & CICCARONE, V. C. (2004): Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **33**, 95-103.

- DAVIS, S. J., WARD, H. A., PUKLAVEC, M. J., WILLIS, A. C., WILLIAMS, A. F. & BARCLAY, A. N. (1990): High level expression in Chinese hamster ovary cells of soluble forms of CD4 T lymphocyte glycoprotein including glycosylation variants. *J. Biol. Chem.* **265**, 10410-10418.
- DE GRAAFF, P. M., DE JONG, E. C., VAN CAPEL, T. M., VAN DIJK, M. E., ROHOLL, P. J., BOES, J., LUYTJES, W., KIMPEN, J. L. & VAN BLEEK, G. M. (2005): Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *J. Immunol.* **175**, 5904-5911.
- DELGADO, M. F., COVIELLO, S., MONSALVO, A. C., MELENDI, G. A., HERNANDEZ, J. Z., BATALLE, J. P., DIAZ, L., TRENTO, A., CHANG, H. Y., MITZNER, W., RAVTECH, J., MELERO, J. A., IRUSTA, P. M. & POLACK, F. P. (2008): Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat. Med.* **15**, 34-41.
- ELLIS, J. A., HASSARD, L. E. & MORLEY, P. S. (1995): Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **206**, 354-361.
- ENGLUND, J. A., SULLIVAN, C. J., JORDAN, M. C., DEHNER, L. P., VERCELLOTTI, G. M., & BALFOUR, H. H. Jr. (1988): Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *Ann. Intern. Med.* **109**, 203-208.
- FALSEY, A. R., WALSH, E. E. & BETTS, R. F. (1990): Serologic evidence of respiratory syncytial virus infection in nursing home patients. *J. Infect. Dis.* **162**, 548-549.
- FEARNS, R. & COLLINS, P. L. (1999): Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J. Virol.* **73**, 5852-5864.
- FELDMAN, S. A., HENDRY, R. M. & BEELER, J. A. (1999): Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J. Virol.* **73**, 6610-6617.
- FELDMAN, S. A., AUDET, S. A. & BEELER, J. A. (2000): The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J. Virol.* **74**, 6442-6447.

- FLEMING, E. H., KOLOKOLTSOV, A. A., DAVEY, R. A., NICHOLS, J. E. & ROBERTS, N. J. Jr. (2006): Respiratory syncytial virus F envelope protein associates with lipid rafts without a requirement for other virus proteins. *J. Virol.* **80**, 12160-12170.
- FORMANOWSKI, F. & MEIER-EWERT, H. (1988): Isolation of the influenza C virus glycoprotein in a soluble form by bromelain digestion. *Virus Res.* **10**, 177-191.
- FUENTES, S., TRAN, K. C., LUTHRA, P., TENG, M. N. & HE, B. (2007): Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J. Virol.* **81**, 8361-8366.
- GALINSKI, M. S., MINK, M. A., LAMBERT, D. M., WECHSLER, S. L. & PONS, M. W. (1987): Molecular cloning and sequence analysis of the human parainfluenza 3 virus gene encoding the matrix protein. *Virology* **157**, 24-30.
- GAUDIN, Y., MOREIRA, S., BENEJEAN, J., BLONDEL, D., FLAMAND, A. & TUFFE-REAUAUDIN, C. (1999): Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **80**, 1647-1656.
- GHILDYAL, R., HARTLEY, C., VARRASSO, A., MEANGER, J., VOELKER, D. R., ANDERS, E. M. & MILLS, J. (1999): Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J. Infect. Dis.* **180**, 2009-2013.
- GLEZEN, W. P. & DENNY, F. W. (1973): Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N. Engl. J. Med.* **288**, 498-505.
- GLEZEN, W. P., TABER, L. H., FRANK, A. L. & KASEL, J. A. (1986): Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am. J. Dis. Child.* **140**, 543-546.
- GODET, M., RASSCHAERT, D. & LAUDE, H. (1991): Processing and antigenicity of entire and anchor-free spike glycoprotein S of coronavirus TGEV expressed by recombinant baculovirus. *Virology* **185**, 732-740.
- GONZALES-REYES, L., RUIZ-ARGUELLO, M. B., GARCIA-BARRENO, B., CALDER, L., LOPEZ, J. A., ALBAR, J. P., SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. & MELERO, J. A. (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. USA* **98**, 9859-9864.

- GORIS, K., UHLENBRUCK, S., SCHWEGMANN-WESSELS, C., KÖHL, W., NIEDORF, F., STERN, M., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., BALS, R., TAYLOR, G., BRAUN, A., BICKER, G., KIETZMANN, M. & HERRLER, G. (2009): Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. *J. Virol.* **83**, 1962-1968.
- GOWER, T. L., PASTEY, M. K., PEEPLES, M. E., COLLINS, P. L., MCCURDY, L. H., HART, T. K., GUTH, A., JOHNSON, T. R. & GRAHAM, B. S. (2005): RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. *J. Virol.* **79**, 5326-5336.
- GRAHAM, B. S., HENDERSON, G. S., TANG, Y. W., LU, X., NEUZIL, K. M. & COLLEY, D. G. (1993): Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J. Immunol.* **151**, 2032-2040.
- GRUBER, C. & LEVINE, S. (1983): Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins. *J. Gen Virol.* **64**, 825-832.
- HALLAK, L. K., SPILLMANN, D., COLLINS, P. L. & PEEPLES, M. E. (2000): Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J. Virol.* **74**, 10508-10513.
- HARBURY, P. B., ZHANG, T., KIM, P. S. & ALBER, T. (1993): A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* **262**, 1401-1407.
- HARCOURT, J., ALVAREZ, R., JONES, L. P., HENDERSON, C., ANDERSON, L. J. & TRIPP, R. A. (2006): Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses. *J. Immunol.* **176**, 1600-1608.
- HARDY, R. W. & WERTZ, G. W. (1998): The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J. Virol.* **72**, 520-526.
- HEMINWAY, B. R., YU, Y., TANAKA, Y., PERRINE, K. G., GUSTAFSON, E., BERNSTEIN, J. M. & GALINSKI, M. S. (1994): Analysis of respiratory syncytial virus F, G and SH proteins in cell fusion. *Virology* **200**, 801-805.
- HENDERSON, F. W., CLYDE, W. A. Jr., COLLIER, A. M., DENNY, F. W., SENIOR, R.

- J., SHEAFFER, C. I., CINLEY, W. G. 3rd & CHRISTIAN, R. M. (1979): The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. *J. Pediatr.* **95**, 183-190.
- HENDERSON, G., MURRAY, J. & YEO, R. P. (2002): Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology* **300**, 244-254.
- HICKLING, T. P., BRIGHT, H., WING, K., GOWER, D., MARTIN, S. L., SIM, R. B. & MALHOTRA, R. (1999): A recombinant trimeric surfactant protein D carbohydrate recognition domain inhibits respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3478-3484.
- HOFMANN, H., GEIER, M., MARZI, A., KRUMBIEGEL, M., PEIPP, M., FEY, G. H., GRAMBERG, T. & PÖHLMANN, S. (2004): Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 1216-1221.
- INABA, Y., TANAKA, Y., OMORI, T. & MATUMOTO, M. (1970): Isolation of bovine respiratory syncytial virus. *Jpn. J. Exp. Med.* **40**, 473-474.
- JACOBS, J. W. & EDINGTON, N. (1975): Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. *Res. Vet. Sci.* **18**, 299-306.
- JOHNSON, P. R., SPRIGGS, M. K., OLMSTEDT, R. A. & COLLINS, P. L. (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. USA* **84**, 5625-5629.
- JOHNSON, S., OLIVER, C., PRINCE, G. A., HEMMING, V. G., PFARR, D. S., WANG, S. C., DORMITZER, M., O'GRADY, J., KOENIG, S., TAMURA, J. K., WOODS, R., BANSAL, G., COUCHENOUR, D., TSAO, E., HALL, W. C. & YOUNG, J. F. (1997): Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **176**, 1215-1224.
- JORDAN, W. S. Jr. (1962): Growth characteristics of respiratory syncytial virus. *J. Immunol.* **88**, 581-590.
- KAPIKIAN, A. Z., MITCHELL, R. H., CHANOCK, R. M., SHVEDOFF, R. A. & STEWART, C. E. (1969): An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS)

virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 405-421.

KARGER, A., SCHMIDT, U. & BUCHHOLZ, U. J. (2001): Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J. Gen. Virol.* **82**, 631-640.

KARRON, R. A., BUONAGURIO, D. A., GEORGIU, A. F., WHITEHEAD, S. S., ADAMUS, J. E., CLEMENTS-MANN, M. L., HARRIS, D. O., RANDOLPH, V. B., UDEM, S. A., MURPHY, B. R. & SIDHU, M. S. (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. USA* **94**, 13961-13966.

KIMMAN, T. G., SOL, J., WESTENBRINK, F. & STRAVER, P. J. (1989): A severe outbreak of respiratory tract disease associated with bovine respiratory virus probably enhanced by vaccination with modified live vaccine. *Vet. Q.* **11**, 250-253.

KIMMAN, T. G. & WESTENBRINK, F. (1990): Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* **112**, 1-25.

KLENK, H. D. & GARTEN, W. (1994): Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* **2**, 39-43.

KÖNIG, P., BEER, M., MAKOSCHEY, B., TEIFKE, J. P., POLSTER, U., GIESOW, K. & KEIL, G. M. (2003): Recombinant virus-expressed bovine cytokines do not improve efficacy of a bovine herpesvirus 1 marker vaccine strain. *Vaccine* **22**, 202-212.

KREMPL, C., MURPHY, B. R. & COLLINS, P. L. (2002): Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. *J. Virol.* **76**, 11931-11942.

KRUSAT, T. & STRECKERT, H. J. (1997): Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch. Virol.* **142**, 1247-1254.

KUO, L., GROSFELD, H., CRISTINA, J., HILL, M. G. & COLLINS, P. L. (1996): Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **70**, 6892-6901.

- KYHSE-ANDERSON, J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- LAMB, R. A. & KOLAKOFSKY, D. (2001): Paramyxoviridae: the viruses and their replication; in: KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. (Hrsg.) *Fields Virology*, 4th edition. Lippincott, Philadelphia.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LANGEDIJK, J. P., DE GROOT, B. L., BERENDSEN, H. J. & VAN OIRSCHOT, J. T. (1998): Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *Virology* **243**, 293-302.
- LANGEDIJK, J. P., SCHAAPER, W. M., MELOEN, R. H. & VAN OIRSCHOT, J. T. (1996): Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **77**, 1249-1257.
- LAWLESS-DELMEDICO, M. K., SISTA, P., SEN, R., MOORE, N. C., ANTCZAK, J. B., WHITE, J. M., GREENE, R. J., LEANZA, K. C., MATTHEWS, T. J. & LAMBERT, T. M. (2000): Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry* **39**, 11684-11695.
- LEE, E., HALL, R. A. & LOBIGS, M. (2004): Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *J. Virol.* **78**, 8271-8280.
- LERCH, R. A., ANDERSON, K. & WERTZ, G. W. (1990): Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **64**, 5559-5569.
- LERCH, R. A., STOTT, E. J. & WERTZ, G. W. (1989): Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins and mRNAs and generation of cDNA clones to the viral mRNAs. *J. Virol.* **63**, 833-840.

- LEVINE, S. & HAMILTON, R. (1969): Kinetics of the respiratory syncytial virus growth cycle in HeLa cells. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **28**, 122-132.
- LEVINE, S., KLAIBER-FRANCO, R. & PARADISO, P. R. (1987): Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 2521-2524.
- LI, W., MOORE, M. J., VASILIEVA, N., SUI, J., WONG, S. K., BERNE, M. A., SOMASUNDARAN, M., SULLIVAN, J. L., LUZURIAGA, K., GREENOUGH, T. C., CHOE, H. & FARZAN, M. (2003): Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450-454.
- LIEBERMANN, H. (1992): Pneumokokkenvirusinfektionen in H. LIEBERMANN (Hrsg.) *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart. 107-108.
- LINGGI, T. & WYLER, R. (1985): Bovine respiratory syncytial virus as a pathogen in the respiratory tract diseases of cattle: a clinical and seroepidemiologic study in Switzerland. Schweiz. *Arch. Tierheilkd.* **127**, 651-659.
- LÖFFLER, G. (2003): *Basiswissen Biochemie*. Springer Verlag. 7-8, 98-99.
- LOTTHAMMER, K. H. & EHLERS, J. (1990): Epidemiologic studies of the detection of viral infection agents in calf losses in the Weser-Ems-region. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **97**, 418-420.
- LURIA, S. E. (1953): Host-induced modifications of viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **18**, 237-244.
- MALHOTRA, R., WARD, M., BRIGHT, H., PRIEST, R., FOSTER, M. R., HURLE, M., BLAIR, E. & BIRD, M. (2003): Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes Infect.* **5**, 123-133.
- MALLIPEDDI, S. K., LUPIANI, B. & SAMAL, S. K. (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**, 1019-1023.
- MARTINEZ, I. & MELERO, J. A. (2000): Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J. Gen. Virol.* **81**, 2715-2722.
- MARTIN, A. J., GARDNER, P. S. & MCQUILLIN, J. (1978): Epidemiology of respiratory

viral infection among pediatric inpatients over a six year period in northeast England. *Lancet* **2**, 1035-1038.

MARTINEZ-SOBRIDO, L., GITIBAN, N., FERNANDEZ-SESMA, A., CROS, J., MERTZ, S.E., JEWELL, N. A., HAMMOND, S., FLANO, E., DURBIN, R. K., GARCIA-SASTRE, A., & DURBIN, J. E. (2006): Protection against respiratory syncytial virus by a recombinant Newcastle disease virus vector. *J. Virol.* **80**, 1130-1139.

MATTHEWS, J. M., YOUNG, T. F., TUCKER, S. P. & MACKAY, J. P. (2000): The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J. Virol.* **74**, 5911-5920.

MCDONALD, T. P., PITT, A. R., BROWN, G., RIXON, H. W. & SUGRUE, R. J. (2004): Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase complex associates with lipid rafts in virus- infected cells: a proteomic analysis. *Virology* **330**, 147-157.

MCINTOSH, K. & CHANOCK, R. M. (1985): Respiratory syncytial virus in: B. N. FIELDS (Hrsg.) *Virology*. Raven Press., New York. 1285-1304.

MORRIS, J. A., BLOUNT, R. E. & SAVAGE, R. E. (1956): Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 544-549.

MOSIMAN, V. L., PATTERSON, B. K., CANTERERO, L. & GOOLSBY, C. L. (1997): Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method. *Cytometry* **30**, 151-156.

OLMSTED, R. A. & COLLINS, P. L. (1989): The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J. Virol.* **63**, 2019-2029.

ORVELL, C., NORRBY, E. & MUFSON, M. A. (1987): Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J. Gen. Virol.* **68**, 3125-3135.

PACCAUD, M. F. & JACQUIER, C. (1970) : A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **30**, 327-342.

PASTEY, M. K. & SAMAL, S. K. (1995): Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **76**, 193-197.

PASTEY, M. K. & SAMAL, S. K. (1997): Role of individual N-linked oligosaccharide chains and different regions of bovine respiratory syncytial virus fusion protein in cell surface transport. *Arch. Virol.* **142**, 2309-2320.

PASTEY, M., CROWE, J. E. Jr. & GRAHAM, B. S. (1999): RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J. Virol.* **73**, 7262-7270.

PATEL, M., YANAGISHITA, M., RODERIQUEZ, G. BOU-HABIB, D. C., ORAVECZ, T., HASCALL, V. C. & NORCROSS, M. A. (1993): Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **9**, 167-174.

PEKOSZ, A., GRIOT, C., NATHANSON, N. & GONZALEZ-SCARANO, F. (1995): Tropism of Bunyaviruses: Evidence for a G1 glycoprotein-mediated entry pathway common to the California serogroup. *Virology* **214**, 339-348.

PEKOSZ, A. & GONZALEZ-SCARANO, F. (1996): The extracellular domain of La Crosse virus G1 forms oligomers and undergoes pH-dependent conformational changes. *Virology* **225**, 243-247.

PLOTNICKY-GILQUIN, H., HUSS, T., AUBRY, J. P., HAEUW, J. F., BECK, A., & BONNEFOY, J. Y. (1999): Absence of lung immunopathology following respiratory syncytial virus (RSV) challenge in mice immunized with a recombinant RSV G protein fragment. *Virology* **258**, 128-140.

PRINGLE, C. R. (1999): Virus nomenclature. *Arch. Virol.* **144**, 1463-1466.

RESH, M. D. (1999): Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1451**: 1-16.

Robert Koch Institut (2004): RKI Ratgeber/Merkblätter für Ärzte, Stand: Januar 2004. *Epidemiol. Bulletin* 03/2004.

ROBERTS, P. C., GARTEN, W., KLENK, H. D. (1993): Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J. Virol.* **67**, 3048-3060.

ROBERTS, R. J. & MACELIS, D. (1996): REBASE - restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 223-235.

- ROBERTS, S. R., COMPANS, R. W. & WERTZ, G. W. (1995): Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **69**, 2667-2673.
- ROBERTS, S. R., LICHTENSTEIN, D., BALL, L. A. & WERTZ, G. W. (1994): The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J. Virol.* **68**, 4538-4546.
- ROUSSO, I., NIXON, M. B., CHEN, B. K., KIM, P.S. (2000): Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13523-13525.
- RUDD, B. D., BURSTEIN, E., DUCKETT, C. S., LI, X. & LUKACS, N. W. (2005): Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J. Virol.* **79**, 3350-3357.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., EHRLICH, H. A. & ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & EHRLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 387-491.
- SAMAL, S. K., ZAMORA, M., MCPHILLIPS, T. H. & MOHANTY, S. B. (1991): Molecular cloning and sequence analysis of bovine respiratory syncytial virus mRNA encoding the major nucleocapsid protein. *Virology* **180**, 453-456.
- SCHLENDER, J., BOSSERT, B., BUCHHOLZ, U. & CONZELMANN, K. K. (2000): Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* **74**, 8234-8242.
- SCHLENDER, J., WALLISER, G., FRICKE, J. & CONZELMANN, K. K. (2002): Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *J. Virol.* **76**, 1163-1170.
- SCHLENDER, J., ZIMMER, G., HERRLER, G. & CONZELMANN, K. K. (2003): Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J. Virol.* **77**, 4609-4616.

- SCHREIBER, P., MATHEISE, J. P., DESSY, F., HEIMANN, M., LETESSON, J. J., COPPE, P. & COLLARD, A. (2000): High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **47**, 535-550.
- SCHWARZE, J., O'DONNELL, D. R., ROHWEDDER, A. & OPENSHAW, P. J. (2004): Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 801-805.
- SCHWEGMANN-WESSELS, C., ZIMMER, G., LAUDE, H., ENJUANES, L. & HERRLER, G. (2002): Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to cell surface sialoglycoproteins. *J. Virol.* **76**, 6037-6043.
- SHAFTI-KERAMAT, S., HANDISURYA, A., KRIEHUBER, E., MENEGUZZI, G., SLUPETZKY, K. & KIRNBAUER, R. (2003): Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J. Virol.* **77**, 13125-13135.
- SHAPIRO, H. M. (1988): Practical flow cytometry in A. R. LISS (Hrsg.), Inc. New York.
- SIGURS, N., BJARNASON, R., SIGURBERGSSON, F. & KJELLMANN, B. (2000): Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1501-1507.
- SIGURS, N., GUSTAFSSON, P. M., BJARNASON, R., LUNDBERG, F., SCHMIDT, S., SIGURBERGSSON, F. & KJELLMANN, B. (2005): Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 137-141.
- SINGH, I., DOMS, R. W., WAGNER, K. R. & HELENIUS, A. (1990): Intracellular transport of soluble and membrane-bound glycoproteins : folding, assembly and secretion of anchor-free influenza hemagglutinin. *EMBO J.* **9**, 631-639.
- SISK, W. P., BRADLY, J. D., LEIPOLD, R. J., STOLZFUS, A. M., PONCE DE LEON, M., HILF, M., PENG, C., COHEN, G. H. & EISENBERG, R. J. (1994): High-level expression and purification of secreted forms of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gD synthesized by baculovirus-infected insect cells. *J. Virol.* **68**, 766-775.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C.

- (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- SPRIGGS, M. K., JOHNSON, P. R. & COLLINS, P. L. (1987): Sequence analysis of the matrix protein gene of human parainfluenza virus type 3: extensive sequence homology among paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* **68**, 1491-1497.
- STEIN, R. T., SHERRILL, D., MORGAN, W. J., HOLBERG, C. J., HALONEN, M., TAUSIG, L. M., WRIGHT, A. L. & MARTINEZ, F. D. (1999): Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* **354**, 541-545.
- SUMMERFORD, C. & SAMULSKI, R. J. (1998): Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* **72**, 1438-1445.
- TAKIMOTOI, T., HURWITZ, J. L., ZHAN, X. & KRISHNAMURTHY, S., PROUSER, C., BROWN, B., COLECLOUGH, C., BOYD, K., SCROGGS, R. A., PORTNER, A. & SLOBOD, K. S. (2005): Recombinant Sendai virus as a novel vaccine candidate for respiratory syncytial virus. *Viral Immunol.* **18**, 255-266.
- TECHAARPORNKUL, S., BARRETTO, N. & PEEPLES, M. E. (2001): Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J. Virol.* **75**, 6825-6834.
- TECHAARPORNKUL, S., COLLINS, P. L. & PEEPLES, M. E. (2002): Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent of cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* **294**, 296-304.
- TENG, M. N. & COLLINS, P. L. (1999): Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J. Virol.* **73**, 466-473.
- TENG, M. N., WHITEHEAD, S. S. & COLLINS, P. L. (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**, 283-296.
- TENG, M. N. & COLLINS, P. L. (2002): The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J. Virol.* **76**, 6164-6171.
- THOMAS, L. H., STOTT, E. J., JONES, P. W., JEBBETT, N. J. & COLLINS, A. P. (1980): The

possible role of respiratory syncytial virus and *Pastuerella* spp in calf respiratory disease. *Vet. Rec.* **107**, 304-307.

THOMAS, L. H., STOTT, E. J., COLLINS, A. P., CROUCH, S. & JEBBETT, J. (1984): Infection of gnotobiotic calves with a bovine and human isolate of respiratory syncytial virus. Modication of the response by dexamethasone. *Arch. Virol.* **79**, 67-77.

THOMAS, L. H., COOK, R. S., WYLD, S. G., FURZE, J. M. & TAYLOR, G. (1998): Passive protection of gnotobiotic calves using monoclonal antibodies directed at different epitopes on the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **177**, 874-880.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

TRIPP, R. A., JONES, L. P., HAYNES, L. M., ZHENG, H. Q., MURPHY, P. M. & ANDERSON, L. J. (2001): CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat. Immunol.* **2**, 732-738.

VALARCHER, J. F. & TAYLOR, G. (2007): Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* **38**, 153-180.

VANLANDSCHOOT, P., BEIRNAERT, E., GROOTEN, J., JOU, W. M. & FIERIS, W. (1998): pH-dependent aggregation and secretion of soluble monomeric influenza hemagglutinin. *Arch. Virol.* **143**, 227-239.

VIRGEN, C.A., KRATOVAC, Z., BIENIASZ, P. D. & HATZIOANNOU, T. (2008): Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3563-3568.

VOIGT, A., SAWITZKY, D., ZEICHHARDT, H. & HABERMEHL, K. O. (1995): Cellular receptor structures for pseudorabies virus are blocked by antithrombin III. *Med. Microbiol. Immunol.* **184**, 97-103.

WALRAVENS, K., KETTMANN, R., COLLARD, A., COPPLE, P. & BURNY, A. (1990): Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* **71**, 3009-3014.

- WALSH, E. E. & HRUSKA, J. (1983): Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J. Virol.* **47**, 171-177.
- WARIS, M. E., TSOU, C., ERDMAN, D. D., ZAKI, S. R. & ANDERSON, L. J. (1996): Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J. Virol.* **70**, 2852-60.
- WEISS, R. (1992): Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry in: LEVY, J. (Hrsg.); *The Retroviruses*. Plenum Press, New York Vol. 2. 1-108.
- WOOLUMS, A. R., SINGER, R. S., BOYLE, G. A. & GERSHWIN, L. J. (1999): Interferon gamma production during bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection is diminished in calves vaccinated with formalin-inactivated BRSV. *Vaccine* **17**, 1293-1297.
- WRIGHT, P. F., KARRON, R. A., BELSHE, R. B., THOMPSON, J., CROWE, J. E. Jr., BOYCE, T. G., HALBURNT, L. L., REED, G. W., WHITEHEAD, S. S., ANDERSON, E. L., WITTEK, A. E., CASEY, R., EICHELBERGER, M., THUMAR, B., RANDOLPH, V. B., UDEM, S. A., CHANOCK, R. M. & MURPHY, B. R. (2000): Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J. Infect. Dis.* **182**, 1331-1342.
- WU, H., KWONG, P. D. & HENDIRCKSON, W. A. (1997): Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* **387**, 527-530.
- WUDUNN, D. & SPEAR, P. G. (1989): Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**, 52-58.
- YANG, X., FLORIN, L., FARZAN, M., KOLCHINSKY, P., KWONG, P. D., SODROSKI, J. & WYATT, R. (2000): Modifications that stabilize human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimers in solution. *J. Virol.* **74**, 4746-54.
- YANG, X., LEE, J., MAHONY, E. M., KWONG, P. D., WYATT, R & SODROSKI, J. (2002): Highly stable trimers formed by human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins fused with the trimeric motif of T4 bacteriophage fibritin. *J. Virol.* **76**, 4634-4642.
- YIN, H. S., WEN, X., PATERSON, R. G., LAMB, R. A. & JARDETZKY, T. S. (2006): Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*

439, 38-44.

YUNUS, A. S., COLLINS, P. L. & SAMAL, S. K. (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**, 2231-2238.

ZELUS, B. D., WESSNER, D. R., WILLIAMS, R. K., PENSIERO, M. N., PHIBBS, F. T., DESOUZA, M., DVEKSLER, G. S. & HOLMES, K. V. (1998): Purified, soluble recombinant mouse hepatitis virus receptor, Bgp1(b), and Bgp2 murine coronavirus receptors differ in mouse hepatitis virus binding and neutralizing activities. *J. Virol.* **72**, 7237-7244.

ZHANG, L., PEEPLES, M. E., BOUCHER, R. C., COLLINS, P. L. & PICKLES, R. J. (2002): Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J. Virol.* **76**, 5654-5666.

ZIMMER, G., BUDZ, L. & HERRLER, G. (2001 a): Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem.* **276**, 31642-31650.

ZIMMER, G., TROTZ, I. & HERRLER, G. (2001 b): N-glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **75**, 4744-4751.

ZIMMER, G., CONZELMANN, K. K. & HERRLER, G. (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**, 9218-9224.

ZIMMER, G., BOSSOW, S., KOLESNIKOVA, L., HINZ, M., NEUBERT, W. J. & HERRLER, G. (2005): A chimeric respiratory syncytial virus fusion protein functionally replaces the F and HN glycoproteins in recombinant Sendai virus. *J. Virol.* **79**, 10467-10477.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung von BRSV . . . . .	7
1.2	Genomorganisation von BRSV . . . . .	8
1.3	Replikationszyklus von RSV . . . . .	12
1.4	Schematische Darstellung des Fusionsproteins . . . . .	15
4.1	Schematische Darstellung der Erzeugung eines Fusionsproteins . . . . .	44
4.2	Schematische Darstellung der Klonierung von pCG1-hFsyn-sol-FLAG . . . . .	51
5.1	Schematische Darstellung von bFsyn-sol-6His, hF/bFsyn-sol-FLAG, bFsyn-sol-GFP . . . . .	66
5.2	Analyse der Expression in Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	67
5.3	Western Blot der bF-Konstrukte in Zellkulturüberständen . . . . .	68
5.4	Immunfluoreszenztest von bFsyn-sol-FLAG- und hFsyn-sol-FLAG-Protein . . . . .	69
5.5	Western Blot zum Nachweis der Spaltung in F2 und F1 . . . . .	70
5.6	Kinetik bFsyn-sol-FLAG-Proteinsekretion . . . . .	71
5.7	Western Blot gereinigter bF/hFsyn-sol-FLAG-Proteine . . . . .	72
5.8	Immunfluoreszenztest von Vero-Zellen nach HRSV- und BRSV-Infektion . . . . .	73
5.9	Immunfluoreszenz-Bindungstest mit bFsyn-sol-FLAG-Protein . . . . .	75
5.10	Immunfluoreszenz-Bindungstest mit bF/hFsyn-sol-FLAG-Proteinen . . . . .	76

---

5.11	Immunfluoreszenz-Bindungstest mit hFsyn-sol- und -FLAG-Protein . . . . .	77
5.12	Autofluoreszenz und Immunfluoreszenz-Bindungstest von HBE-Zellen . . . . .	79
5.13	Western Blot-Bindungstest von gereinigtem bF/hFsyn-sol-FLAG-Protein an Vero-Zellen . . . . .	80
5.14	Immunfluoreszenz-Bindungstest mit monomerem und multimerem bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen . . . . .	82
5.15	Immunfluoreszenz-Bindungstest verschiedener Mengen bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen . . . . .	83
5.16	Immunfluoreszenz-Bindungstest mit bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen bei verschiedenen Temperaturen und Adsorptionszeiten . . . . .	85
5.17	Western Blot-Bindungstest mit bFsyn-sol-FLAG-Protein und Vero-Zellen . . . . .	86
5.18	Western Blot von gereinigtem bF/hFsyn-sol-FLAG-Protein an immobilisiertes Heparin . . . . .	88
5.19	Fluoreszenzmikroskopie von L-, sog9- und Vero-Zellen nach BRSV-GFP- und BRSV $\Delta$ G-GFP-Infektion . . . . .	91
5.20	Infizierbarkeit von L- und sog9-Zellen mit BRSV $\Delta$ G-GFP . . . . .	92
5.21	Immunfluoreszenz-Bindungstest mit bFsyn-sol-FLAG-Protein und L-, sog9- und Vero-Zellen . . . . .	93

# Tabellenverzeichnis

1.1	Paramyxoviridae . . . . .	2
1.2	RSV-Proteine . . . . .	10
3.1	Ursprung und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien . . . . .	21
3.2	Verwendete Primer (Sequenzen in 5'→3'-Richtung) . . . . .	30
3.3	Verwendete Antikörper . . . . .	31
4.1	Zellkulturbedingungen der verwendeten Zelllinien . . . . .	39
4.2	Standard-Ansatz für die <i>Pfu</i> -PCR . . . . .	42
4.3	Bedingungen der <i>Pfu</i> -PCR . . . . .	42
4.4	Standard-Ansatz für die Hybridisierung . . . . .	43
4.5	Bedingungen der Hybridisierung der PCR-Fragmente . . . . .	44
4.6	Standard-Ligations-Ansatz . . . . .	47
4.7	Standard-Ansatz für eine Kolonie-PCR . . . . .	48
4.8	Bedingungen der Kolonie-PCR . . . . .	49
4.9	Klonierte F-Proteinkonstrukte und dafür verwendete Primer . . . . .	50

# Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

## bFsyn-sol-FLAG

Nukleotidsequenz (1599 bp):

```
ATGGCCACGACCACGATGCGGATGATCATCAGCATCATCATTATCTTCATCTACGTGCAGCACAT
CACGCTGTGCCAGAACATCACCGAGGAGTTCTACCAGAGCACGTGCTCGGCCGTGTCCCGCGGCT
ACCTGAGCGCGCTGCGCACCGGTTGGTACACCAGCGTCGTCACGATCGAGCTGAGCAAGATCCAG
AAGAACGTCTGCAACAGCACGGACAGCAACGTCAAGTTAATTAAGCAGGAACTCGAGCGCTACAA
CAACGCGGTCTGGAGCTGCAGAGCCTGATGCAGAACGAGCCGGCGAGCAGCTCCCGGGCGAAGC
GCGGCATCCCGGAGCTGATCCACTACAAGCGCAACAGCACGAAGAAGTTCTACGGCCTGATGGGC
AAGAAGCGCAAGCGCCGCTTCCTAGGCTTCCTGCTGGGCATCGGCAGCGGATCGCGAGCGGCGT
GGCGGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCGAGGTCAACAAGATCAAGAATGCATTGCTGAGCA
CCAACAAGGCGGTGGTGCACCTGAGCAACGGCGTCAGCGTGCTGACGAGCAAGGTCCTGGACCTG
AAGAACTACATCGACAAGGAGCTCCTGCCGAAGGTCAACAACCACGACTGCCAGATCAGCAACAT
CGCGACCGTCATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGCCTGCTGGAGATCGCCCCGGGAGTTCAGCG
TCAACGCGGGCATCACCAACCGCTGAGCACGTACATGCTGACCAACAGCGAGCTCCTGAGCTTA
ATTAACGACATGCCGATCACCAACGACCAGAAGAAGCTGATGAGCAGCAACGTGCAGATCGTGCG
CCAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCGTCGTCAAGGAGGAGGTATGGCGTACGTCTCCAGCTGC
CAATCTATGGCGTCATCGACACGCCGTGCTGGAAGCTGCACACGAGCCCGCTGTGCACGACGGAC
ACAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACGCGCACCGACCGCGGCTGGTACTGCGACAACGCCGG
CAGCGTCAGCTTCTTCCCGCAGGCGGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACCGCGTCTTCTGCGACA
CCATGAACAGCCTGACCCTGCCGACCGACGTCAACCTGTGCAACACCGACATCTTCAACGCGAAG
TAGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACGGACATCAGCAGCAGCGTCATCACCAGCATCGGCGC
CATCGTCAGCTGCTACGGCAAGACGAAGTGACCCGCGAGCAACAAGAACCGCGGCATCATCAAGA
CGTTCTCCAACGGGTGCGACTACGTGAGCAACCGCGGCGTCGACACGGTCAGCGTGGGCAACACG
CTGTAACGTCGTCGCAAGCTGGAGGGCAAGGCGCTGTACATCAAGGGCGAGCCGATCATCAACTA
CTACGACCCGCTGGTCTTCCCGAGCGACGAGTTCGATGCATCCATCGCGCAGGTCAACGCGAAGA
TCAACCAGAGCCTGGCGTTCATCCGCCGACGACGAGCTGCTCCACAGCGTCGACGTCGGCAAG
AGCACGACCAACGATTATAAGGATGATGATGACAAGTAA
```

Aminosäuresequenz (533 AS):

```
MATTTMRMIISIIIFIVVQHITLQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVVTIELSKIQ
KNVCNSTDSNVKLIKQELERYNNNAVVELQSLMQNEPASSRAKRGIPELIHYKRNSTKRFYGLMG
```

KKRKRFLGFLLGIGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNKIKNALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDL  
KNYIDKELLPKVNNHDCQISNIATVIEFQKNNRLLIAREFSVNAGITTPYSTYMLTNSSELLSL  
INDMPITNDQKMLMSSNVQIVRQQSYSIMSVVKEEVMAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTD  
NKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPTDVNLCNTDIFNAK  
YDCKIMTSKTDISSSVITSIGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNRGVDTVSVGNT  
LYYVKNLEKALYIKGEPIINYDPLVFP SDEFDASIAQVNAKINQSLAFIRRSDELLHSVDVGK  
STTNDYKDDDDK\*

## hFsyn-sol-FLAG

Nukleotidsequenz (1599 bp):

ATGGAGCTGCCTATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACAATTCTGGCCGCCGTGACCTTCTGTTT  
TGCCAGCAGCCAGAACATCACCGAGGAGTTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGAGCAAGGGCT  
ATCTGAGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAG  
GAGAACAAAGTGCAACCGCACCGCAAGGTGAAGCTGATGAAGCAGGAGCTGAACAAGTGCAA  
CGGCACCGACGCCAAGGTGAAGCTGATGAAGCAGGAGCTCCCTGCCGCCAACACAGAGCCAGAC  
GGGAGCTGCCCGGTTTCATGAACTACACCCTGAACAACACCAAGAAAACCAACGTGACCCTGAGC  
AAGAAGCGGAAGCGGAGATTCTGGGCTTTCTGCTGGGAGTGGGCTCTGCCATCGCCTCTGGCAT  
CGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAGGGAGAGGTGAACAAGATCAAGAGCGCCCTGCTGAGCA  
CCAATAAGGCCGTGGTGAACCTGAGCAATGGCGTGAGCGTGCTGACAAGCAAGGTGCTGGACCTC  
AAGAACTACATCGACAAGCAGAGCGTGCTGACAAGCAAGGTGCTGGACCTCAAGAACTACATCGA  
CAAGCACGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAGATCACAGGGAGTTCAGCG  
TGAATGTGGGCGTGACCACCCCTGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTG  
ATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAGAAGCTGATGTCCAACAACGTGCAGATCGTGCG  
GCAGCAGAGCTACAGCATCATGTCCATCATCAAGGAGGAGGTGCTGGCTTACGTGGTGCAGCTGC  
CTCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTTGTGGAAGCTGCACACCAGCCCTCTGTGCACCACCAAT  
ACCAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCAGGACCGATAGAGGCTGGTACTGCGACAATGCCGG  
CAGCGTGAGCTTCTTTCCACAGGCCGAGACCTGTAAGGTGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACA  
CCATGAACAGCCTGACCCTGCCTTCTGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAG  
TACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGAGCAGCAGCGTGATTACAAGCCTGGGCGC  
CATCGTGAGCTGTTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGCGGCATCATCAAGA  
CCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGAGCAACAAGGGCGTGGATACAGTGAGCGTGGGCAACACC  
CTGTACTACGTCAACAAGCAGGAGGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTT  
CTACGACCCCTGGTGTTCCTAGCGACGAGTTCGATGCCAGCATCAGCCAGGTGAACGAGAAGA  
TCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGGAAGAGCGACGAGCTGCTGCACAATGTGAACGCCGGCAAG  
AGCACCACCAACGACTACAAGGACGACGACGACAAGTAA

Aminosäuresequenz (533 AS):

MELPILKANAIITLAAVTFCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIK  
ENKNGTDAKVKLMLKQELNKNKNGTDAKVKLMLKQELPAANNRARRRELPRFMNYTLNNTKKNVTLS

KKRKRRLGFLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL  
KNYIDKQSVLTSKVLDLKNYIDKHVIEFQKNNRLEITREFSVNMGVTPVSTYMLTNSSELLSL  
INDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWLHTSPLCTTN  
TKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPK  
YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNT  
LYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGK  
STNDYKDDDDK\*

## Wissenschaftliche Beiträge

### Kongressbeiträge

Paul, A., Schwegmann-Wessels, C., Herrler, G. Analysis of the Binding Activity of the Fusion Protein (F) of Respiratory Syncytial Virus. *Experimental Biology 2008* (ASBMB), San Diego, U.S.A. Posterpräsentation. 2008, April.

Paul, A., Schwegmann-Wessels, C., Herrler, G. Analysis of the Binding Activity of the Fusion Protein (F) of Respiratory Syncytial Virus (RSV). *3rd European Congress of Virology*, Nürnberg. Posterpräsentation. 2007, September.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Nachname	Paul
Vorname	André
Geburtstag	29. Januar 1980
Geburtsort	Langenhagen
Nationalität	deutsch

### Studium und Promotion

---

2006, März - 2009, Juli	Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover Doktorarbeit bei Prof. Georg Herrler, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover: "Untersuchung der Bindungseigenschaft des Fusionsproteins des respiratorischen Synzytialvirus"
2006, Januar	Universitätsabschluss "Diplom-Biologe" Hauptfach: Genetik, Nebenfächer: Biochemie, Virologie Gesamtnote "sehr gut"
2003, August - 2004, Mai	Auslandsstudium an der Purdue University, West Lafayette, U.S.A., Department of Biological Sciences
2000, Oktober - 2006, Januar	Studium an der Leibniz Universität Hannover, Fachbereich Biologie; Diplomarbeit bei Prof. Georg Herrler, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover: "Charakterisierung des intrazellulären Transports des Spike-Proteins des Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine"

**Zivildienst**

---

1999, Juli - 2000, Juli                      Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Kreisverband  
Hannover-Stadt, Abteilung Rettungsdienst  
Ausbildung zum "Rettungssanitäter"

**Schul Ausbildung**

---

1986, Juni - 1999, Juli                      Grund- und Orientierungsschule in Hannover  
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife  
am Humboldt-Gymnasium Hannover

## Danksagung

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Georg Herrler für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete motivierende Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Frau Dr. Christel Schwegmann-Wessels für die hervorragende Betreuung und die motivierende Zusammenarbeit.

Ich möchte mich außerdem bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für das sehr gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Von Herzen danke ich meiner Frau und meiner Tochter für ihre Unterstützung und Geduld.

Steve Jobs danke ich für Leopard.