

**Untersuchung des Terminations/Reinitiations-Mechanismus
der Translation des kleinen Kapsidproteins
beim Felinen Calicivirus**

der Fakultät für Biologie der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

von
Christine Luttermann
aus Sulingen

vorgelegte
Dissertation

2009

Tag der mündlichen Prüfung : 29.05.09

Dekan: Prof. Dr. Hanspeter Mallot

1. Berichterstatter: Prof Dr. Gregor Meyers
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gregor Meyers am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, in Tübingen angefertigt.

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mich bei dieser Arbeit und in dieser Zeit unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. Gregor Meyers für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller anderen notwendigen Voraussetzungen sowie seine kompetente Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft. Ich habe in dieser Arbeit viel gelernt und danke ihm dafür.

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für seine Bereitschaft diese Arbeit gegenüber der Fakultät zu vertreten, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, für die freundliche Unterstützung und gute Arbeitsatmosphäre. Ich bedanke mich bei Maren, Petra und Janett für ihre hervorragende technische Unterstützung. Mein ganz besonderer Dank geht an Birke, die mich mit Rat und Tat während der gesamten Arbeit unterstützt und mir in vielerlei Hinsicht geholfen hat.

Ich danke den übrigen Mitarbeitern des FLI Tübingen, ohne die das wissenschaftliche Arbeiten nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während dieser Jahre.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	3
Inhaltsverzeichnis	4
Vorbemerkungen	7
Abkürzungen	8
1. Einleitung	11
1.1 Translation	11
1.1.1 Die Translationsinitiation	12
1.1.2 Virale Strategien zur Initiation der Proteinsynthese	14
1.2 <i>Caliciviridae</i>	17
1.2.1 Genera	17
1.2.2 Felines Calicivirus	18
1.2.3 Das Genom	19
1.2.4 Die Funktion des VPg	20
1.2.5 Das Kapsid	21
1.3 Fragestellung	22
2. Material	23
2.1 Biologisches Material	23
2.1.1 Zellen	23
2.1.2 Bakterienstämme	23
2.1.3 Viren	23
2.2 Antikörper	24
2.3 Enzyme, Proteine, Größenmarker	24
2.4 Chemikalien	25
2.5 Radiochemikalien	27
2.6 Sonstige Materialien	27
2.7 Geräte	27
2.8 Verwendete Kits	29
2.9 Verwendete Software	29
2.10 Medien, Lösungen und Puffer	29
2.11 Verwendete Oligonukleotide	33
2.12 Verwendete Plasmide	37
2.12.1 Käuflich erworbene Plasmide	37
2.12.2 Plasmide aus eigener Herstellung	38
3. Methoden	44
3.1 Nukleinsäure-basierte Methoden	44
3.1.1 Agarosegelelektrophorese	44
3.1.2 Aufreinigung von DNA	44
3.1.3 Restriktionsenzymspaltung	44
3.1.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	44
3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten zur Herstellung neuer Plasmide	45
3.1.6 Sequenzierung	45
3.1.7 PCR	45
3.2 Arbeiten mit Bakterien	46
3.2.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.2.2 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	46

3.2.3 DNA-Präparation	46
3.3 Zellkulturtechniken	47
3.3.1 Kultivierung der Zellen	47
3.3.2 Infektion von Zellen mit FCV	47
3.3.3 Transiente Expression von Proteinen durch Vaccinia MVA T7	47
3.4 Arbeiten mit Hefen.....	48
3.4.1 LiAc Transformation.....	48
3.4.2 Expression von Proteinen im Hefesystem.....	48
3.5 Proteinanalytische Methoden	49
3.5.1 Isolierung der Gesamtproteine aus Säuger-Zellen.....	49
3.5.2 Isolierung der Gesamtproteine aus Hefe-Zellen	49
3.5.3 Immunopräzipitation	49
3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.5.5 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	50
3.5.6 Immunodetektion der Proteine im Western Blot	50
4. Ergebnisse	52
4.1 Synthese der Kapsidproteine im transienten System	52
4.1.1 Nachweis der Kapsidproteine	53
4.1.2 Das Hauptkapsidprotein liegt nach Expression im transienten System als Vorläuferprotein L-VP1 vor.....	54
4.1.3 VP2 zeigt ein abweichendes Laufverhalten in der SDS-PAGE	54
4.1.4 Präzipitationsverhalten des VP1-Proteins	55
4.2 Bedeutung des AUG als Startkodon des ORF3 für den Mechanismus der VP2- Translation.....	56
4.2.1 Ein AUG als Startkodon ist nicht essentiell	56
4.2.2 Die VP2-Proteine, die ausgehend von einem veränderten Startkodon translatiert werden, beginnen zumeist weiterhin mit Methionin	59
4.3 Die VP2-Expression ist abhängig von der Translation des stromauf gelegenen Rasters (VP1).....	59
4.4 Bedeutung des Terminationssignals des ORF2 für die Translation des ORF3	60
4.4.1 Die Termination der VP1-Translation ist erforderlich für die Synthese des VP2 ...	60
4.4.2 Die Nähe des Terminationssignals des ORF2 zum ORF3 Start ist unabdingbar für die Reinitiation	62
4.5 Die von der Start/Stoppreion in 3´-Richtung gelegene Sequenz ist nicht essentiell für die Translation des VP2	64
4.6 Die vor der Start/Stoppreion gelegene Sequenz ist essentiell für die Translation des VP2	66
4.6.1 Eine Sequenz von circa 70 Nukleotiden stromauf von der Start/Stoppreion ist essentiell für die VP2-Expression.....	66
4.6.2 Die TURBS-Region allein vermittelt die Reinitiation nach Termination.....	68
4.7 Charakterisierung der TURBS-Region	70
4.7.1 Zwei Regionen innerhalb der TURBS sind unabdingbar für die VP2-Synthese.....	70
4.7.2 Der Abstand zwischen den beiden essentiellen Motiven kann variiert werden	73
4.7.3 Charakterisierung des Motivs 1	75
4.7.4 Nachweis der Interaktion zwischen Motiv 1 des FCV und der 18S rRNA im Hefesystem.....	80
4.7.5 Motiv 2 positioniert das Ribosom relativ zum ORF3 Start.....	83

4.7.6 Charakterisierung des Motivs 2	84
4.7.7 Motiv 2 ist komplementär zu einer Region, die dem Motiv 1 vorgelagert ist.....	86
5. Diskussion.....	89
5.1 Translation der Kapsidproteine im transienten System	90
5.2 Die Bedeutung des AUG als Startkodon der VP2-Translation.....	90
5.3 Bedeutung der Termination der Translation des VP1 für das Reinitiationsereignis	91
5.4 Die von der Start/Stoppreion stromab gelegene Sequenz ist nicht essentiell für die Translation des VP2.....	92
5.5 Eine stromauf der Start/Stoppreion gelegene Sequenz ist essentiell für die Translation des VP2	92
5.5.1 Funktion des Motivs 1	93
5.5.2 Bedeutung des Motivs 2	94
5.5.3 Funktion der Sekundärstruktur der TURBS	96
5.6 Rolle des eIF3 für die Reinitiation der VP2-Translation	98
5.7 Modell des Terminations/Reinitiations-Mechanismus zur Synthese des minoren Kapsidproteins beim Feline Calicivirus.....	99
5.8 Der VP2-Translationsmechanismus bei anderen Caliciviren.....	101
5.9 Bedeutung des caliciviralen Terminations/Reinitiations-Mechanismus.....	102
Zusammenfassung	106
Summary	107
Abbildungsverzeichnis	108
Literaturverzeichnis	109

Vorbemerkungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Luttermann, C. and G. Meyers. 2007. A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J. Biol. Chem.* **282**: 7056-7065.

Luttermann, C. and G. Meyers. 2009. The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes Dev.* **23**: 331-344

Abkürzungen

A	Ampere
A	Adenin
Ac	Acetat
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
A-Stelle	Aminoacyl-Stelle am Ribosom
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	"Baby Hamster Kidney", stabile Hamsternieren-Zelllinie
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C	Cystein
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Cap	Methylguanosin-Cap-Struktur
Ci	Curie
CPE	cytopathogener Effekt
cpm	Impulse pro Minute ("counts per minute")
CPV	"Cricket Paralysis virus"
CRFK	"Crandell Reese Feline Kidney", stabile Katzennieren-Zelllinie
CSFV	„classical swine fever virus“
C-terminal	Carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
Cys	Cystein
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM (-)	"Dulbecco's Minimal Essential Medium" ohne FCS und Antibiotika
DMEM (+)	"Dulbecco's Minimal Essential Medium" mit 10% FCS und Penicillin und Streptomycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholinsäure
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EBHSV	„european brown hare syndrome virus“
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure

eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
E-Stelle	“Exit”-Stelle am Ribosom
FCV	“feline calicivirus”
FCS	fötales Kälberserum
FeHV-1	„feline herpesvirus 1“
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Genomisch
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gal	Galaktose
GFP	„green fluorescent protein“
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H	Histidin
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
I	Isoleucin
IRES	"internal ribosome entry site"
JAM-A	„feline junctional adhesion molecule A“
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Milli
M	molar (mol/l)
M	Methionin
μ	Mikro
m.o.i.	"multiplicity of infection"
Met	Methionin
min	Minute
mio	Million
MOPS	3-[N-morpholino]propansulfonsäure
MVA	"modified virus ankara"
MW	Molekulargewicht
n	Nano
Nt	Nukleotid
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
NTR	"non translated region"
oD	optische Dichte
ORF	"open reading frame"
PABP	Poly(A)-Binde-Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
P-Stelle	Peptidyl-Stelle am Ribosom
RHDV	„rabbit haemorrhagic disease virus“
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-basierte PCR
s	Sekunde
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Natriumdodecylsulfat
sg	Subgenomisch
SMSV	„San Miguel sea lion virus“
ss	Einzelsträngig
<i>Staph.a</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SV	Sapovirus
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transformationspuffer
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TURBS	„termination upstream ribosomal binding side“
U	Aktivitätseinheit (bei Enzymen)
U	Uracil
u.a.	und andere
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
VESV	„vesicular exanthema virus of swine“
VLP	“virus like particle“
VPg	“virus protein, genome linked“
VSD	„virulent systemic disease“
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumenanteil
vs.	Versus
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen%

1. Einleitung

1.1 Translation

Die Translation hat eine Schlüsselfunktion in lebenden Zellen und wird daher stark reguliert. Die Proteinsynthese wird von den zellulären Ribosomen durchgeführt, welche aus einer großen und einer kleinen Untereinheit bestehen. Die Zusammensetzung der Ribosomen unterscheidet sich zwischen Prokaryoten und Eukaryoten (Tabelle 1.1). Bei der großen Untereinheit (60S) der Eukaryoten finden sich drei unterschiedliche rRNAs (28S; 5,8S und 5S) und bei den Prokaryoten (50S) zwei rRNAs (23S und 5S). Die kleine Untereinheit enthält jeweils eine rRNA, bei den Eukaryoten 18S und bei den Prokaryoten 16S. Auch in der Zusammensetzung und Anzahl der enthaltenen Proteine unterscheiden sich die beiden Systeme, wobei die Untereinheiten der Eukaryoten jeweils mehr Proteine enthalten als die der Prokaryoten. Bedeutend für den Mechanismus der Translation ist, dass Ribosomen drei tRNA-Bindestellen beinhalten, die nach ihrer Funktion als Aminoacyl (A)-, Peptidyl (P)- und „Exit“ (E)-Stelle bezeichnet werden.

	Prokaryoten	Eukaryoten
Ribosom		
Sedimentationskoeffizient	70S	80S
Anzahl der Untereinheiten	2	2
große Untereinheit		
Sedimentationskoeffizient	50S	60S
-RNA-Moleküle		
Anzahl	2	3
Größen	23S (2904 Nt) 5S (120 Nt)	28S (4718 Nt) 5,8S (160 Nt) 5S (120 Nt)
-Anzahl der Polyproteine	34	49
kleine Untereinheit		
Sedimentationskoeffizient	30S	40S
-RNA-Moleküle		
Anzahl	1	1
Größen	16S (1541 Nt)	18S (1874 Nt)
-Anzahl der Polyproteine	21	33

Tabelle. 1.1: **Zusammensetzung der Ribosomen**

Aufgelistet sind die jeweiligen Sedimentationskoeffizienten, die Anzahl der ribosomalen Proteine und der rRNAs der ribosomalen Untereinheiten im Vergleich zwischen Prokaryoten und Eukaryoten.

Die Translation kann in die vier Phasen Initiation, Elongation, Termination und „Recycling“ eingeteilt werden (Abbildung 1.1) (Kapp and Lorsch, 2004). Bei der Initiation wird das Ribosom an der mRNA zusammengesetzt, wobei sich die Initiator-Methionyl-tRNA (Met-tRNA_i) in der P-Stelle befindet und über ihr Antikodon an das Startkodon (AUG) der mRNA gebunden ist. Danach ist der Komplex bereit, die Proteinsynthese zu starten. Während der Elongation besetzen Aminoacyl-tRNAs die A-Stelle, wo die Erkennung Kodon-Antikodon stattfindet. Wenn eine passende tRNA gebunden hat, katalysiert das Ribosom die Bildung der Peptidbindung, das nächste Kodon gelangt in die A-Stelle, die mit dem Peptid beladene tRNA rückt in die P-Stelle und die deacylierte tRNA in die E-Stelle. Dieser Vorgang des Weiterrückens des Ribosoms entlang der mRNA wiederholt sich bis ein Stoppkodon erreicht wird. Das Erreichen des Stoppkodons in der A-Stelle leitet die Termination ein, bei der das fertige Peptid dissoziiert. In der letzten Phase der Translation, dem Recycling, werden die beiden Untereinheiten des Ribosoms getrennt und die mRNA und die deacylierte tRNA freigesetzt. Danach stehen die Ribosomen für eine neue Runde der Translation zur Verfügung.

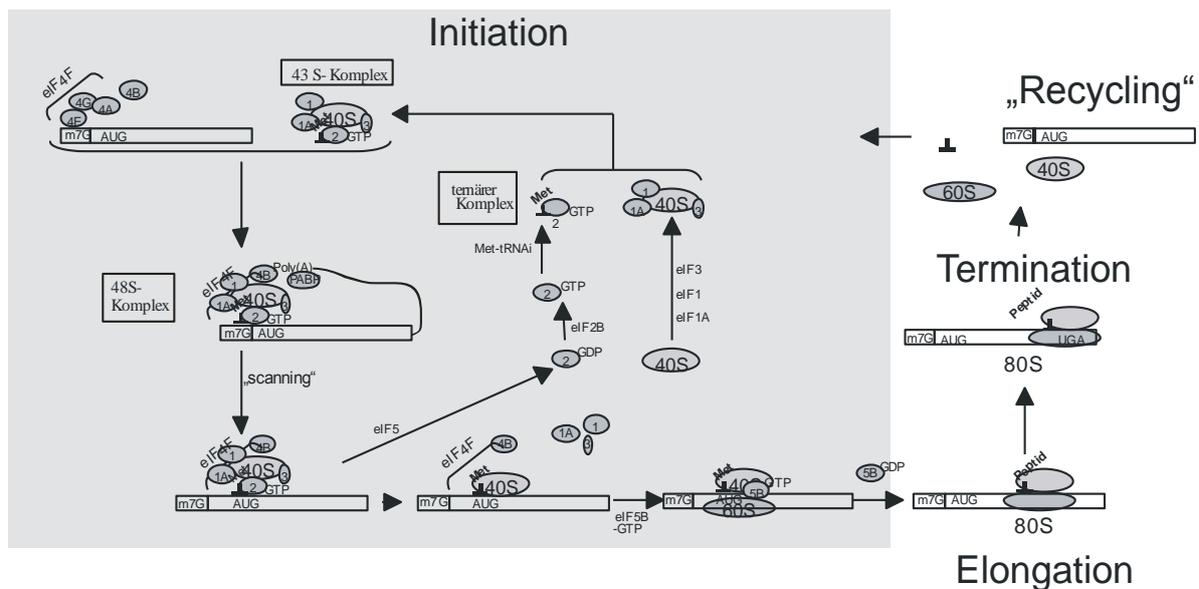


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der 4 Phasen der Translation

Dargestellt sind die 4 Phasen der Translation Initiation, Elongation, Termination und Recycling. Die Initiation ist detaillierter dargestellt als die weiteren Phasen und ist daher grau unterlegt.

1.1.1 Die Translationsinitiation

Die Initiation der Translation ist ein komplexer Prozess, der eine bedeutende Rolle bei der Genregulation spielt (Kapp and Lorsch, 2004; Sachs et al., 1997; Hershey J.W.B. and W.C.Merrick, 2000). Die Initiation ist der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt der Translation und ist ein stark regulierter Prozess, der zur Entstehung eines funktionalen ribosomalen Komplexes führt. Die Bildung des Initiationskomplexes wird gefördert und reguliert durch nicht ribosomale Proteine, die Initiationsfaktoren (IFs). Bei Prokaryoten sind

lediglich drei Initiationsfaktoren (IF1-3) an der Initiation beteiligt. Das Rekrutieren der mRNA an die kleine Untereinheit des Ribosoms (30S) erfolgt über eine Interaktion zwischen der Purin-reichen Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz (5'-AGGAGGU-3') mit dem 3'-Ende der 16S rRNA der 30S Untereinheit (Shine and Dalgarno, 1975). Die SD-Sequenz liegt ca. 10 Nukleotide stromauf vom Startkodon, und vermittelt nicht nur die Bindung der ribosomalen Untereinheit, sondern auch deren Positionierung am Startkodon.

Bei den Eukaryoten ist die Initiation ein wesentlich komplexerer Prozess, der das Binden eines Präinitiationskomplexes an eine Methylguanosin-„Cap-Struktur“ („Cap“) am 5'-Ende der mRNA und das „Scannen“ des Komplexes in 3'-Richtung entlang der mRNA bis zum ersten AUG erfordert (Kozak, 1989). An diesem Vorgang sind bei den Eukaryoten 12 Initiationsfaktoren (eIFs) als essentielle Faktoren beteiligt.

Als erster Schritt der Initiation erfolgt die Zusammenlagerung des ternären Komplexes, bestehend aus eIF2-GTP und Met-tRNA_i (Abbildung 1.1). Da eIF2 eine höhere Affinität zu GDP als zu GTP hat, muss das bei jeder vollständigen Initiation entstandene eIF2-GDP zu eIF2-GTP recycelt werden. Diese Reaktion wird durch eIF2B ermöglicht. Die Bindung des ternären Komplexes an die kleine ribosomale Untereinheit (40S) wird durch die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und eIF3 induziert. Der resultierende Komplex wird als 43S-Komplex bezeichnet.

Der heterotrimere Komplex eIF4F bindet an die mRNA und entwindet Sekundärstrukturen innerhalb der 5'-nicht-translatierten Region (NTR). eIF4F besteht aus eIF4A, einer ATP-abhängigen Helikase, eIF4G, einem multivalenten Adapterprotein, welches mit eIF4A, eIF4E, eIF3 und dem Poly(A)-Binde-Protein (PABP) interagiert, und eIF4E, einem „Cap“-Bindeprotein. Das Entwinden der 5'-Struktur der mRNA wird von einer ATP-abhängigen Aktivität von eIF4A mit Hilfe der RNA-Binde-Proteine eIF4B und in Säugern eIF4H vorgenommen. eIF4F in Verbindung mit eIF3 (40S) und dem PABP, welches am PolyA Schwanz der mRNA gebunden ist, lädt die mRNA auf den 43S-Komplex, wodurch der 48S-Komplex entsteht. Die Bindung des PABP an den PolyA-Schwanz und die Interaktion mit eIF4G führen zu einer Pseudo-Zirkularisierung der mRNA (Sachs, 1990). Dies resultiert in einer Erhöhung der Stabilität der mRNA und des 5'-„Cap“-Komplexes und sorgt so für eine effiziente Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten und damit für eine Steigerung der Translationseffizienz. Der ribosomale Komplex beginnt dann das „Scannen“ entlang der mRNA in 3'-Richtung auf der Suche nach einem Startkodon. eIF1 und eIF1A spielen möglicherweise eine Rolle bei diesem „Scann“-Prozess. Wenn ein AUG erreicht wird, kommt es zur Bindung an das Antikodon der Met-tRNA_i, und dies führt zur Hydrolyse des GTP mittels eIF2, eine Reaktion, die durch ein GTPase aktivierendes Protein, das eIF5, ermöglicht wird. eIF1 spielt vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Startkodon Erkennung. Nach der GTP Hydrolyse entlässt eIF2-GDP die Met-tRNA_i in die P-Stelle des Ribosoms und dissoziiert anschließend vom Komplex. Nach heutiger Vorstellung dissoziieren an diesem Punkt auch die Initiationsfaktoren 1, 1A, 3 und 5. Anschließend bindet eIF5B-GTP und ermöglicht die Anlagerung der 60S Untereinheit. Dies führt zur GTP-Hydrolyse und eIF5B-GDP dissoziiert vom Komplex. Mit diesem Schritt ist die Initiationsphase beendet und die Elongation startet.

1.1.2 Virale Strategien zur Initiation der Proteinsynthese

Viren sind bei der Synthese ihrer Proteine auf die Wirtszell-Maschinerie angewiesen. Daher haben sie unterschiedliche Strategien entwickelt, um das System der Zelle effektiv zu nutzen und der Konkurrenz durch die zelluläre Proteinsynthese zu entgehen, oder diese zumindest zu reduzieren. Des Weiteren sind Viren darauf angewiesen, ausgehend von einem limitierten genetischen Material die verschiedenen viralen Proteine zu synthetisieren. Sie nutzen daher neben dem üblichen „Scann“-Mechanismus alternative Mechanismen, die es ihnen ermöglichen, unterschiedliche Proteine von einer bi- oder polycistronischen mRNA zu synthetisieren. Viele der bei Viren nachgewiesenen alternativen Translations- und besonders Initiationsmechanismen konnten nachfolgend auch für die Synthese spezieller zellulärer Proteine nachgewiesen werden.

Eine Strategie von Viren, unterschiedliche Proteine ausgehend von einer mRNA zu generieren, ist die Synthese eines Polyproteins, welches durch zelluläre und/oder virale Proteasen in die verschiedenen Proteine gespalten wird. Virale mRNAs können aber auch mehr als ein funktionales offenes Leserraster enthalten („open reading frame“, ORF). Die Expression verschiedener ORFs einer RNA Spezies kann über sehr unterschiedliche Mechanismen erfolgen (Abbildung 1.2). Da im zellulären System die kleine Untereinheit des Ribosoms an der 5′-„Cap“-Struktur mit dem „Scannen“ beginnt, und dann in 3′-Richtung entlang der mRNA wandert, beginnt die Translation zumeist mit dem AUG-Kodon, welches dem 5′-Ende am nächsten liegt. In höheren Eukaryoten sollte sich dieses AUG in einem optimalen Sequenz-Kontext befinden, der nach Kozak die Basenfolge (GCC)RCCAUGG (R=Purin) aufweist (Kozak, 1999; Kozak, 1987). Bei „schwachen“ AUGs, die in einem nicht optimalen Sequenzkontext liegen, liest zumindest ein Teil der ribosomalen Untereinheiten über dieses 1. AUG hinweg. Es kommt dadurch zur Initiation an einem weiter in 3′-Richtung gelegenen AUG und somit zur Translation eines unterschiedlichen zweiten Produktes. Dieses zweite Protein ist im Vergleich zum ersten Produkt entweder nur N-terminal verkürzt oder weist eine völlig andere Sequenz auf, wenn es in einem anderen Raster kodiert wird. Bei diesem Mechanismus, den man „leaky scanning“ nennt, wird ein gewisses Mengenverhältnis zwischen den entstehenden Proteinen erreicht, da ein bestimmter Prozentsatz der Ribosomen über das erste oder weitere AUGs hinweg liest. Der „leaky-scanning“-Mechanismus wird von vielen Viren genutzt unter anderem vom humanen Immundefizienz Virus [HIV, (Schwartz et al., 1990)]. Neben dem Überlesen des Startkodons ist bei manchen Viren auch ein Überlesen des Stoppsignals möglich, wobei zumeist nur ca. 5% der Ribosomen das Terminationssignal übergehen und somit eine gewisse Menge an Proteinen mit einem verlängerten C-Terminus entstehen.

Ein weiterer Mechanismus ist die Leserasterverschiebung, die bei RNA-Viren weit verbreitet ist, und unter anderem beim Maus-Mammatumovirus untersucht wurde (Gesteland and Atkins, 1996). Bei der Leserasterverschiebung pausiert das Ribosom auf Grund von Sekundärstrukturen der RNA, und es kann zu einem Verrutschen des Ribosoms um 1 Nukleotid vor oder zurück kommen, so dass es mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in einem anderen Leseraster weiter translatiert. Dieses Verrutschen des Ribosoms wird durch eine spezifische Heptanukleotid-Sequenz ermöglicht, die man als „slippery sequence“ bezeichnet.

Ein weiterer Mechanismus, der abhängig ist vom Anlagern des ribosomalen Komplexes an 5′-Strukturen, aber zur Initiation der Translation an einer weiter in 3′-Richtung gelegenen Position führt, ist das „shunting“. Hierbei kann der Initiationskomplex, wenn er beim „Scannen“ auf eine „Shunt“-Sequenz trifft, auf eine Initiationsstelle weiter stromab

übertragen werden. Es gibt verschiedene Typen des „Shunt“-Mechanismus, die auf besonderen Sequenzen in der RNA basieren, und zum Teil auch spezielle Proteine benötigen, die das Übertragen des Initiationskomplexes ermöglichen. Der „Shunt“-Mechanismus ist am besten beim Pararetrovirus Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) untersucht (Dominguez et al., 1998; Schmidt-Puchta et al., 1997), wurde aber auch in einigen anderen viralen Systemen nachgewiesen (Hohn et al., 1988).

Die Initiation der Translation kann aber auch unabhängig vom 5'-Ende erfolgen. Dazu ist eine interne Initiationsstelle („internal ribosome entry site“, IRES) erforderlich. Bei einer IRES handelt es sich um eine spezielle RNA-Struktur, die in der Lage ist, das Anlagern von Initiationskomplexen an eine Position innerhalb der mRNA zu vermitteln. Dieses Prinzip findet man z.B. bei Picornaviren, Hepatitis C Virus, oder Pestiviren (Pestova et al., 2001). Die Initiation mittels einer IRES ist in unterschiedlichem Grad von den zellulären Initiationsfaktoren abhängig. So benötigen z.B. CPV („Cricket Paralysis virus“) und Hepatitis C für die Initiation an der IRES nicht den Faktor eIF4F (Pestova et al., 1998; Pestova and Hellen, 2003; Wilson et al., 2000; Jackson, 2005). Dieser Mechanismus der IRES vermittelten Initiation der Translation vermindert den Konkurrenzdruck, der durch die große Zahl zellulärer mRNA's verursacht wird, erreicht die Unabhängigkeit von bestimmten Initiationsfaktoren und bewirkt bei manchen Viren über die Spaltung von für die virale Initiation nicht essentiellen Faktoren durch virale Proteasen eine Möglichkeit der aktiven Verschiebung des Gleichgewichtes hin zur Translation der viralen RNA.

Ribosomen können auch durch eine Startregion rekrutiert werden, nachdem sie die Translation eines stromauf gelegenen ORFs terminiert haben. Im Unterschied zur Leserasterverschiebung und dem Überlesen des Stoppkodons kommt es bei diesem Mechanismus zu einer neuen Initiation. Diese Reinitiation für das zweite Leseraster erfolgt in Abhängigkeit von der Translation des ersten Leserasters und deren Termination. Die Grundlagen solch eines Terminations/Reinitiations-Mechanismus sind noch nicht vollständig geklärt. Es wurde postuliert, dass für einen Terminations/Reinitiations-Mechanismus das erste Leseraster kurz sein muss (Kozak, 2001; Pöyry et al., 2004). Das dann translatierte Protein hat zumeist keine Funktion. Somit dienen solche kurzen stromauf gelegenen Leseraster vermutlich allein der Regulation der Translation des folgenden Leserasters. Die Reinitiation beruht hier möglicherweise darauf, dass Initiationsfaktoren nicht komplett vom Ribosom dissoziieren und somit nach einer kurzen Elongationsphase noch Faktoren am ribosomalen Komplex gebunden sind und für die Initiation der Translation des zweiten Leserasters zur Verfügung stehen. Es gibt jedoch auch Beispiele für eine Reinitiation nach Translation von langen Leserastern (Ahmadian et al., 2000; Horvath et al., 1990a; Meyers, 2003). Dabei handelt es sich um einen anderen Mechanismus der Reinitiation, der auf eine neue Rekrutierung von Faktoren angewiesen ist. Zum Teil sind bei diesem speziellen Mechanismus stromauf von der Startstelle gelegene Sequenzen essentiell (Gould and Easton, 2005; Meyers, 2003), für die gezeigt wurde, dass die RNA-Sequenz und nicht das kodierte Protein für diese Funktion bei der Reinitiation verantwortlich ist (Meyers, 2003).

1. Einleitung

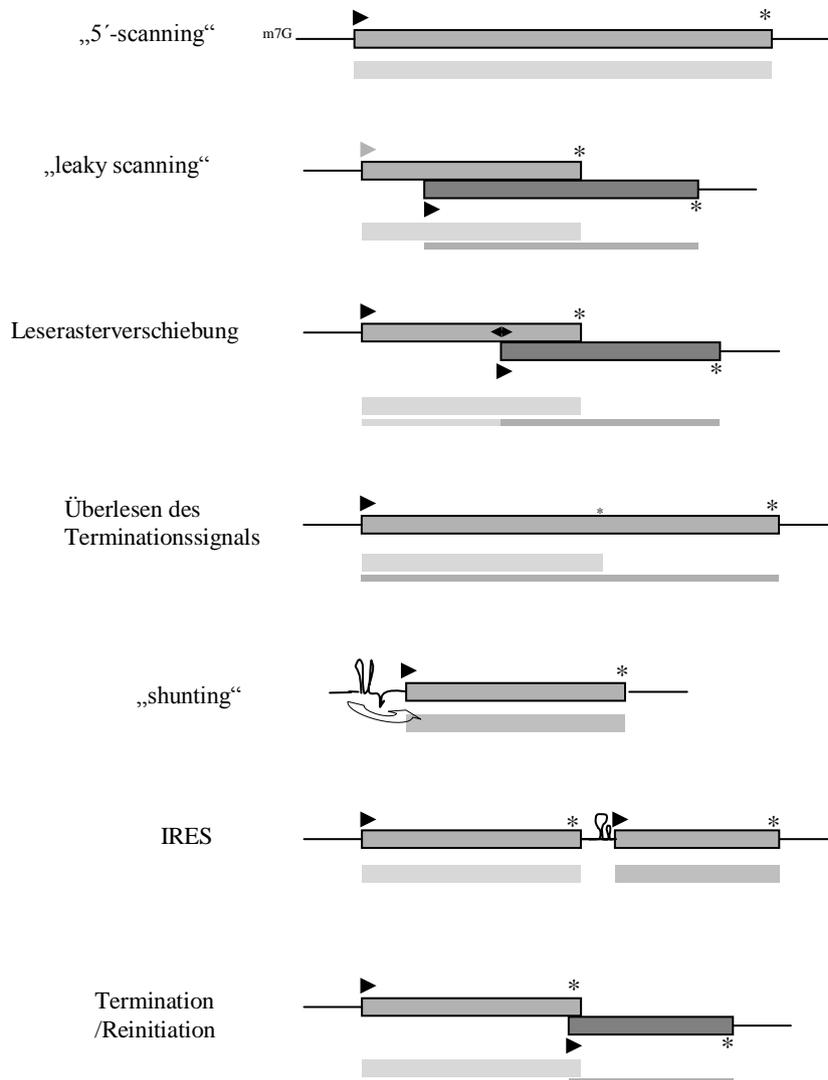


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung verschiedener Translationsmechanismen

Schematische Übersicht unterschiedlicher Translationsmechanismen. Gezeigt sind jeweils als umrandete Kästchen die Leseraster mit Kennzeichnung der Start- (>) und Stopps-Position (*). Unter den Leserastern sind jeweils schraffiert die resultierenden Translationsprodukte dargestellt.

1.2 *Caliciviridae*

Caliciviren sind eine wenig untersuchte heterogene Gruppe von Erregern verschiedener Krankheiten beim Menschen und bei Tieren. Sie infizieren ein breites Spektrum an Tieren darunter Hasen, Kaninchen, Schweine, Rinder, Katzen, Flossenfüßler, Reptilien, Skunks, Wale und Schimpansen, wobei die geographische Verbreitung verschiedener Caliciviren das Wirtsspektrum widerspiegelt. Die Übertragung erfolgt über kontaminiertes Essen, Wasser, und gegebenenfalls über Aerosolisierung von fäkalem Material, Erbrochenem und respiratorischen Sekreten. Allgemein treten keine Vektoren als Überträger auf, jedoch wurde mechanische Übertragung mittels Arthropoden beim RHDV beschrieben. Die erste gesicherte dokumentierte Calicivirusinfektion trat 1932 auf [VESV, (Traum J., 1936)]. In der Folge wurden dann Caliciviren im Zusammenhang mit Krankheiten bei den oben genannten Spezies beschrieben. Der erste Nachweis eines humanen Calicivirus (*Norovirus*) erfolgte 1968. Nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) gilt heute eine Meldepflicht für Norovirus-Erkrankungen, wodurch das Auftreten verfolgt und analysiert werden kann. Derzeit treten Norovirusinfektionen speziell im Winterhalbjahr gehäuft auf (siehe Robert Koch Institut).

Die Caliciviren sind nah verwandt mit den Picornaviren, denen sie zunächst zugeordnet wurden. Aus dieser Familie wurden sie aber 1978 ausgegliedert und seit 1979 gibt es offiziell die Familie der *Caliciviridae* (Green et al., 2000). Hauptmerkmal der Caliciviren ist ein Kapsid charakteristischer Morphologie, das aus einem einzelnen Hauptkapsidprotein besteht, und das kelchförmige Vertiefungen aufweist. Diese kennzeichnenden Vertiefungen waren Namensgebend für diese Familie, da „Calix“ im Lateinischen Kelch bedeutet.

Das Genom der Caliciviren besteht aus einem einzigen einzelsträngigen RNA Molekül, das positive Polarität besitzt und eine Länge von ca. 7,5 kb aufweist. Am 5'-Ende trägt die RNA ein Protein, das VPg („viral protein genome linked“) gebunden, welches essentiell ist. Das Genom gliedert sich in 2-3 Leseraster, wobei die Nicht-Strukturproteine am 5'-Ende und die Strukturproteine am 3'-Ende kodiert werden. Als weiteres Charakteristikum generieren die Caliciviren eine 3'-koterminale subgenomische RNA von ca. 2 kb Länge, von der ausgehend zumindest die Hauptmenge der Strukturproteine exprimiert wird.

1.2.1 Genera

Die Familie *Caliciviridae* gliedert sich in 4 Genera, basierend auf Unterschieden in der genomischen Organisation, der Kodierungsstrategie, dem Wirtsspektrum, und der Persistenz. Die Genera *Norovirus* und *Sapovirus* beinhalten die hochinfektiösen humanpathogenen Vertreter, die in der Regel zu akuten Gastroenteritiden mit Durchfall und Erbrechen führen. Besonders Vertreter der Noroviren sind bekannt und gefürchtet wegen der von ihnen ausgelösten epidemieartigen Krankheitsausbrüche in Krankenhäusern, Pflegeheimen oder auf Kreuzfahrtschiffen. Sie sind die häufigste nicht bakterielle Ursache für Durchfallerkrankungen. Die Benennung erfolgte nach dem Ort Norwalk, in Ohio, USA 1968, an dem der erste charakteristische Ausbruch, verursacht durch einen Vertreter dieses Genus, verzeichnet wurde (Kapikian et al., 1972). Auch das Genus *Sapovirus* ist nach dem Ort eines Ausbruchs (1982) benannt, bei dem es sich um die Stadt Sapporo, in Japan, handelt.

Das Genus *Lagovirus* umfasst Viren die „Lagomorphe“ also hasenartige Wirte infizieren, mit den bekanntesten Vertretern EBHSV („european brown hare syndrome virus“, 1982, Dänemark) und dem nah verwandten RHDV („rabbit hemorrhagic disease virus“, 1984,

China) (Thiel and König, 1999). Das RHDV induziert den dramatischsten Krankheitsverlauf innerhalb der Caliciviren mit einer kurzen Inkubationszeit und einer hohen Morbidität und Mortalität für erwachsene Kaninchen. Pathologisch äußert sich die Erkrankung durch eine gestörte Blutgerinnung und zumeist eine ausgeprägte Lebernekrose (Ueda et al., 1992). Namensgebend für das Genus *Vesivirus* war das VESV (Virus des Vesiculär-Exanthems der Schweine), dessen Name Bezug nimmt auf die im Krankheitsverlauf auftretenden markanten Vesikel. Mit den vesikulären Läsionen sind die Symptome des VESV klinisch kaum von denen der Maul- und Klauenseuche (MKS) zu unterscheiden. Die Vertreter des Genus *Vesivirus* weisen ein breiteres Wirtsspektrum auf als die der anderen Genera und sind weit verbreitet in marinen und terrestrischen Säugern. Als bekanntester Vertreter der Vesiviren gilt das Feline Calicivirus [FCV, 1957 Neuseeland, (FASTIER, 1957)], welches zeitweise auch als Felines Picornavirus bezeichnet wurde. Innerhalb der Vesiviren gibt es eine sogenannte „Ozeanische Gruppe“, zu der z.B. das „San Miguel sea lion virus“ (SMSV) gehört. SMSV ruft bei Meeressäugern ein ähnliches Krankheitsbild hervor wie das VESV bei Schweinen und ist mit diesem eng verwandt (Neill et al., 1995). Inzwischen werden als 5. Genus die Beco- bzw. Naboviren vorgeschlagen (Oliver et al., 2006;Smiley et al., 2002) und seit Kurzem ein 6. Genus, das als *Recovirus* (rhesus enteric CV) bezeichnet werden soll und bisher das Tulane Virus als einzigen Vertreter enthalten würde (Farkas et al., 2008).

1.2.2 Felines Calicivirus

Das FCV ist weit verbreitet in der Katzenpopulation, sowohl bei Wild- als auch bei Hauskatzen, und ist vor allem für Jungtiere gefährlich. Es gilt neben dem FeHV-1 („feline herpesvirus 1“) als Haupterreger des „infektiösen Katzenschnupfens“. Eine FCV-Infektion kann in einem breiten Spektrum an klinischen Symptomen resultieren. Das signifikanteste ist die Erkrankung der oberen Atemwege (Dawson et al., 1994). Andere Krankheitsbilder sind Bindehautentzündungen, Bildung von Geschwüren auf der Zunge, akute Arthritis oder Gelbsucht. Die Infektion in trächtigen Tieren kann durch Übertragung auf den Fötus zu dessen Tod im Uterus führen. Die Schwere der von FCV ausgelösten Symptome ist stammspezifisch. Es gibt jedoch keine Einteilung in Biotypen (Geissler et al., 1997). In den letzten Jahren sind hoch virulente Stämme in den USA (Hurley et al., 2004;Pedersen et al., 2000;Schorr-Evans et al., 2003) und kürzlich auch in Großbritannien (Coyne et al., 2006) aufgetreten, die in einer systemischen Krankheit mit hoher Sterblichkeitsrate (~50%) (Hurley et al., 2004;Ossiboff et al., 2007) resultieren, und eher Adulte als Jungtiere gefährden. Diese VSD („virulent systemic disease“) erinnert mit hämorrhagischem Fieber und hoher Virulenz an das RHDV, welches vermutlich lange schon als harmloser Darmparasit existierte (Capucci et al., 1996) und mit einem spontanen Wechsel des Gewebestropismus Ende der 80er als hochletales Pathogen zunächst in China auftrat (Ohlinger et al., 1990).

Die Aufnahme des FCV erfolgt nasal, oral und conjunctival und die Vermehrung findet hauptsächlich in oralen und respiratorischen Geweben statt. FCV infiziert nach bisherigem Kenntnisstand nur feline Zellen. Als ein Rezeptor für FCV wurde das „feline junctional adhesion molecule A“ (JAM-A) identifiziert (Makino et al., 2006;Ossiboff and Parker, 2007). JAM-A gehört zur Immunglobulin Superfamilie, und es wird vermutet, dass dieser Rezeptor eine Rolle beim Aufbau von apikalen „tight junctions“ spielt. JAM-A wird auf verschiedenen Zellen unterschiedlicher Gewebe exprimiert, unter anderem Epithelzellen, Endothelzellen,

Leukozyten, Blutplättchen (Thrombozyten), und roten Blutkörperchen (Erythrozyten) (Mandell and Parkos, 2005). Als weiterer Faktor für die FCV-Bindung an Zellen wurde α 2,6-Sialinsäure als N-verbundene Struktur an Glykoproteinen ermittelt (Stuart and Brown, 2007). Die Aufnahme des Virus in die Zelle erfolgt vermutlich über Clathrin vermittelte Endocytose und Ansäuerung in Endosomen (Stuart and Brown, 2006).

1.2.3 Das Genom

Bei den Caliciviren handelt es sich um nicht umhüllte RNA-Viren, mit einem nicht segmentierten Einzelstranggenom positiver Polarität. Das Genom von ca. 7,5 kb trägt ähnlich den Picornaviren am 5'-Ende ein VPg kovalent verknüpft (Dunham et al., 1998; Herbert et al., 1997; Meyers et al., 1991; Schaffer et al., 1980), weist recht kurze 5'- und 3'-untranslatierte Regionen (NTR) auf und ist am 3'-Ende polyadenyliert (Ehresmann and Schaffer, 1977). Die Replikation erfolgt im Zytoplasma über ein Negativ-Strang Intermediat, welches als Matrize für die genomische RNA, sowie für eine subgenomische RNA dient (Carter, 1990; Neill and Mengeling, 1988a). Im für die Nicht-Strukturproteine kodierenden Bereich weisen die Genome der Caliciviren eine ähnliche Genomorganisation wie die Picornaviren auf. Daher werden in Analogie die Nicht-Strukturproteine als 2C-ähnliche Helikase (NTPase), 3C-ähnliche Protease und 3D-ähnliche Polymerase bezeichnet (Neill, 1990; Sosnovtseva et al., 1999). Ein besonders auffälliger Unterschied in der Genomorganisation ist, dass die Strukturproteine bei den Picornaviren am 5'-Ende bei den Caliciviren hingegen am 3'-Ende des Genoms kodiert werden.

Das Genom enthält je nach Genus 2 bis 3 funktionale offene Leseraster (Abbildung 1.3). ORF1 kodiert für die Nicht-Strukturproteine, die als Polyprotein translatiert werden, und an spezifischen Spaltstellen durch die intrinsische virale Cystein-Protease ko- und posttranslational prozessiert werden (Clarke and Lambden, 1997; Green et al., 2000; Clarke and Lambden, 2000; Neill and Mengeling, 1988a; Wirblich et al., 1995). Bei den Lago- und Sapoviren ist in diesem Leseraster auch das Hauptkapsidprotein (VP1) kodiert (Abbildung 1.3), während dieses Protein bei den Noro- und Vesiviren ausgehend von einem separaten ORF exprimiert wird. Bei allen Caliciviren wird vom 3'-terminalen ORF, der mit dem stromauf gelegenen ORF geringfügig in unterschiedlichem Maße überlappt, ein kleines Kapsidprotein kodiert, das als VP2 bezeichnet wird. Da bei den Vesi- und Noroviren das Hauptkapsidprotein von einem separaten Leseraster (ORF2) kodiert wird, wird das VP2-Protein hier vom ORF3 kodiert, bei den Lago- und Sapoviren dagegen vom ORF2 (Abbildung 1.3).

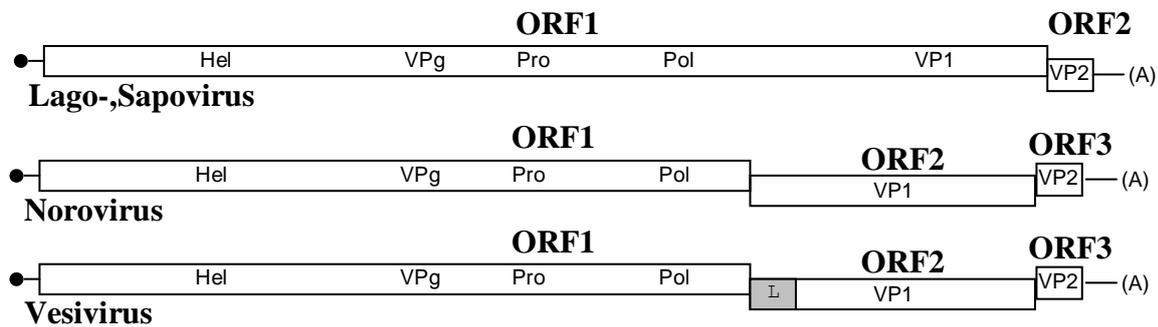


Abbildung 1.3: **Genomorganisationen der 4 Calicivirus-Genera**

Schematische Darstellung der Genome der verschiedenen Calicivirus-Genera. Der Kreis am 5'-Ende stellt das gebundene VPg dar, und die Striche an 5'- und 3'-Ende die nicht translatierten Regionen. Die kodierten Proteine sind als Abkürzungen angegeben. (Hel) 2C-ähnliche Helikase; (VPg) „viral protein genome linked“; (Pro) 3C-ähnliche Protease; (Pol) RNA-abhängige RNA Polymerase; (L) „Leader“-Protein, (VP1) Hauptkapsidprotein; (VP2) minores Kapsidprotein; (A) Poly(A)-Schwanz. Die kodierenden Regionen sind nicht proportional zu ihrer Größe angegeben.

Die Caliciviren transkribieren eine subgenomische RNA von 2,2 bis 2,4 kb, die 3'-koterminale zum Genom ist, und für die Strukturproteine kodiert (Meyers et al., 1991; Carter, 1990; Carter et al., 1992; Neill and Mengeling, 1988b; Neill et al., 1991a). Für RHDV (Meyers et al., 1991) und FCV (Neill, 2002) konnte gezeigt werden, dass die subgenomische RNA in Partikel verpackt wird, und vermutlich auch separat repliziert wird (Carter, 1990). Des Weiteren findet sich auch bei der subgenomischen RNA am 5'-Ende das VPg kovalent verknüpft (Herbert et al., 1997; Machin et al., 2001; Meyers et al., 1991). Ein VPg Protein ist bei Caliciviren, Picornaviren und verschiedenen Pflanzenviren (Nepoviren, Luteoviren und Comoviren) zu finden (Wimmer, 1982), hat aber jeweils eine sehr unterschiedliche Größe und Funktion.

1.2.4 Die Funktion des VPg

Im Gegensatz zu den Picornaviren, bei denen das VPg nur wenige Aminosäuren groß ist, handelt es sich bei den Caliciviren um ein Protein von ca. 12 bis 14 kDa (Dunham et al., 1998; Herbert et al., 1997; Meyers et al., 1991; Schaffer et al., 1980; Thiel and König, 1999). Das VPg der Caliciviren ist essentiell, da gezeigt werden konnte, dass eine Abspaltung des VPg dazu führt, dass keine infektiösen Viren generiert werden können (Herbert et al., 1997). Zum Einen kommt dem VPg eine Funktion bei der Transkription zu (Machin et al., 2001; Rohayem et al., 2006), indem es vermutlich eine Funktion ähnlich wie bei den Picornaviren übernimmt und somit wahrscheinlich der viralen Polymerase als Primer für die Transkription dient. Zum Anderen hat es eine wichtige Funktion bei der Translation (Daughenbaugh et al., 2003; Herbert et al., 1997; Chaudhry et al., 2006; Goodfellow et al., 2005):

Da die Calicivirus-RNA keine „Cap“-Struktur am 5'-terminalen Bereich trägt (Ehresmann and Schaffer, 1977), erfolgt die Translation der viralen Proteine über eine „Cap“-unabhängige Synthese. Das VPg übernimmt bei den Caliciviren wahrscheinlich die Funktion des „Caps“ der Zell-mRNA. Diese Rolle bei der Translationsinitiation bestätigt sich durch den Nachweis,

dass das VPg verschiedener Caliciviren mit den Translationsinitiationsfaktoren eIF3 und/oder eIF4E interagiert (Chaudhry et al., 2006; Daughenbaugh et al., 2003; Goodfellow et al., 2005). Da die Translation vom „Cap“ unabhängig ist, ist sie vermutlich auch unabhängig von einem Teil der Initiationsfaktoren. So kommt es nach der Infektion mit FCV zur Spaltung des eIF4G, was unter anderem dafür verantwortlich sein könnte, dass es zu einem „host cell shut down“ in FCV-infizierten Zellen kommt (Willcocks et al., 2004). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Spaltung des PABP durch die 3C-ähnliche Protease erfolgt (Kuyumcu-Martinez et al., 2004a). Ähnliches wurde für Mitglieder der Picornaviren gezeigt, bei denen die virale 2A Protease eIF4G spaltet (Gradi et al., 1998; Kräusslich et al., 1987) und die 3C Protease PABP (Kuyumcu-Martinez et al., 2004b), sowie eIF5B (de Breyne S. et al., 2008). Durch diesen Mechanismus der viralen Proteinsynthese, der unabhängig von der „Cap“-gesteuerten Synthese der Zelle und bestimmten Initiationsfaktoren ist, verschafft sich das Virus einen Vorteil gegenüber der Translation der zellulären mRNAs.

1.2.5 Das Kapsid

Das Kapsid ist circa 30-40 nm groß und von ikosaedrischer Symmetrie. Es besteht aus 90 Homodimeren des Hauptkapsidproteins (Prasad et al., 1994; Prasad et al., 1999; Peterson and Studdert, 1970), und nur wenigen Molekülen des kleinen Kapsidproteins VP2 (Sosnovtsev and Green, 2000; Luttermann and Meyers, 2007). Ein charakteristisches Merkmal der Kapsid-Architektur ist, dass auf jeder der 5x und 3x Achsen 32 kelchförmige Vertiefungen zu finden sind (Green et al., 2000). Diese Vertiefungen sind aber nicht bei allen Caliciviren stark ausgeprägt (Clarke and Lambden, 1997). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme des FCV-Kapsids ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

Die Kapsidproteine VP1 und werden ausgehend von der subgenomischen RNA translatiert (Carter et al., 1992; Neill et al., 1991b). Bei den Lago- und Sapoviren kann das Hauptkapsidprotein auch ausgehend von der genomischen RNA durch Prozessierung des Polyproteins synthetisiert werden (Parra et al., 1993; Sibia et al., 1995b). Bei den Vesiviren wird im Gegensatz zu den anderen Caliciviren das VP1 nicht als reifes Protein translatiert, sondern als teil eines Vorläuferproteins, welches vermutlich durch die virale Protease zum Hauptkapsidprotein und „Leader“-Protein prozessiert wird (Sosnovtsev et al., 1998). Dem „Leader“-Protein kommt vielleicht eine Rolle bei der Replikation zu (Chang et al., 2008).

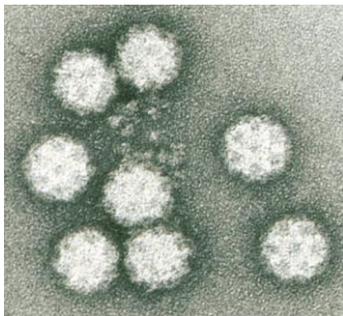


Abbildung 1.4: **FCV-Kapsid**

Elektronenmikroskopische Aufnahme aufgereinigter FCV-Partikel. (Frank Weiland, FLI Tübingen.)

Das Hauptkapsidprotein VP1 weist ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa auf, wohingegen das kleine Kapsidprotein VP2 in der Größe zwischen den verschiedenen Caliciviren variiert. So besitzt das VP2 beim FCV ein Molekulargewicht von circa 12,5 kDa, bei den Noroviren ist es hingegen 23 bis 35 kDa groß (Clarke and Lambden, 1997; Glass et al., 2000; Green et al., 2000). Der große Unterschied der im Kapsid inkorporierten Mengen der beiden Kapsidproteine spiegelt sich auch in der Translationsrate wieder, so wird das kleine Kapsidprotein VP2 im Vergleich zum VP1 mit nur 5-20% Effizienz translatiert (Herbert et al., 1996; Meyers, 2003; Luttermann and Meyers, 2007).

Interessant ist, dass sich aus VP1-Molekülen spontan Virus-ähnliche Partikel („virus like particles“, VLPs) bilden können (Geissler et al., 1999; Laurent et al., 1994; Sibilina et al., 1995a; Wirblich et al., 1996; DiMartino B. et al., 2007). Die VLPs sind hoch immunogen und ähnlich in der Antigenität wie native Viruspartikel (Green et al., 2000). Das kleine Kapsidprotein ist somit zumindest für die Bildung der leeren VLPs nicht essentiell. (Laurent et al., 1994; Meyers et al., 1991; Wirblich et al., 1996).

Die Funktion des VP2 ist bis dato ungeklärt. Die Sequenz der VP2-Proteine der unterschiedlichen Caliciviren ist sehr variabel und zeigt nur ca. 10% Homologie (Clarke and Lambden, 2000). Auf Grund des basischen Charakters des VP2 wurden Interaktionen des kleinen Kapsidproteins mit RNA und sauren Resten im Virion vermutet. Diese Interaktionen könnten eine Rolle bei der Verpackung der RNA in die Viruspartikel spielen (Neill et al., 1991c; Prasad et al., 1999; Wirblich et al., 1996). Beim Norwalk Virus konnte zum Einen eine Interaktion von VP2 mit VP1 nachgewiesen werden (Glass et al., 2003), und zum Anderen gezeigt werden, dass das kleine Kapsidprotein das VP1 vor proteolytischem Abbau schützt und die Stabilität von rekombinanten VLPs erhöht (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). Jedoch konnte keine direkte Interaktion des VP2 mit RNA nachgewiesen werden. VP2 ist essentiell, um infektiöse Viren zu generieren, und kann seine Funktion auch durch Bereitstellung in trans erfüllen. Des Weiteren ist die Sequenz, die für das VP2 kodiert, zum Teil von funktionaler Bedeutung für die Virusreplikation (Sosnovtsev et al., 2005).

1.3 Fragestellung

Der Mechanismus, der zur Translation des kleinen Kapsidproteins führt, ist bislang wenig untersucht. Das resultierende Protein VP2 ist essentiell, ist aber nur in geringer Molekülanzahl im Kapsid enthalten, und wird mit einer geringen Effizienz im Vergleich zum Hauptkapsidprotein (VP1) synthetisiert. Es wird keine extra subgenomische RNA generiert, sondern das VP2 wird ausgehend von der bicistronischen subgenomischen RNA synthetisiert, innerhalb der ORF3, die für VP2 kodiert, mit dem stromauf gelegenen Leseraster für das VP1 überlappt. Diese Punkte führten zu der Frage, welcher spezielle Mechanismus für die Synthese des VP2 genutzt wird. Für das RHDV konnte gezeigt werden, dass es sich um einen Terminations/Reinitiations-Mechanismus handelt (Meyers, 2003), über den die Synthese des VP2 an die des VP1 gekoppelt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen spezifischen Mechanismus beim Felinen Calicivirus aufzuklären.

2.Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Zellen

Für die transiente Expression von Proteinen und für die Kultivierung von Viren wurden eukaryotische Zellkulturen verwendet. Dabei kamen die folgenden Zellen zum Einsatz:

BHK-21 („Baby Hamster Kidney“)

Subklon einer adhärenen Zelllinie, die 1961 aus den Nierenzellen von fünf einen Tag alten Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) gewonnen wurde. Die hier verwendeten Zellen stammen von T. Rümenapf (Universität Gießen).

CRFK (“Crandell Reese Feline Kidney”)

American Type Culture Collection (ATCC CCL 94)

2.1.2 Bakterienstämme

Für die Amplifikation der Plasmide wurden Bakterien der Stämme *E. coli* HB101 und Top 10 F' verwendet.

HB101-Genotyp: supE44, D(mcrC-mrr), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1

Top 10 F'-Genotyp: mcrA, D(mcrBC-hsdRMS-mrr), end A1, recA1, relA1, gyrA96, F80lacZDM15, deoR, nupG, araD139, F(lacI_q, Tn10(Tetr)), galU, DlacX74, galK, D(ara-leu)7697

2.1.3 Viren

FCV 2024 1968 isoliert von R.C. Povey, erhalten von Hoechst Roussel Vet GmbH

Vaccinia-MVA-T7 erhalten von Dr. B Moss (Wyatt et al., 1995)

2.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Western Blot Analysen (WB) und Immunopräzipitationen (IP) verwendet. Die eingesetzten Mengen bzw. Verdünnungen sind jeweils angegeben.

Bezeichnung	Erkennt	aus	Verdünnung	Herkunft
Polyklonale Antikörper				
FR3	FCV-VP1	Kaninchen	1:1000 (WB) 5 µl (IP)	Prof. M. Büttner, BFAV Tübingen
T29	FCV-VP2	Kaninchen	5 µl (IP)	J.O. Thumfart, BFAV; Dr. Schirrmeier, BFAV Insel Riems
αp43	FCV-p43	Kaninchen	5 µl (IP)	J.O. Thumfart, BFAV; Dr. Schirrmeier, BFAV Insel Riems
G1	N ^{Pro}	Kaninchen	5 µl (IP)	R. Stark, H.-J. Thiel
αGFP	GFP	Kaninchen	1:500 (WB)	Santa Cruz, USA
Sekundäre Antikörper				
α-rabbit-PO	Kaninchen-IgG	Ziege	1:10000 (WB)	Dianova, Hamburg

2.3 Enzyme, Proteine, Größenmarker

1 kb Plus DNA Marker	Invitrogen, USA
PageRuler™ prestained protein standard	Fermentas, St. Leon Rot
CIAP	Roche, Mannheim
RNase	Serva, Heidelberg
Trypsin 1-300	ICN-Biochemicals, USA
T4-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
	Roche, Mannheim
	Fermentas, St. Leon Rot
	GE Healthcare, München
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Pfx-Polymerase (Accuprime)	Invitrogen, USA
SAP	Roche, Mannheim
Superfect	Quiagen, Hilden

2.4 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen.

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acridinorange	Serva, Heidelberg
Acrylamid (40%) (29:1)	AppliChem, Darmstadt
Adenin	Sigma, München
Agarose	Gibco, Schottland
Aminosäuren	Sigma, München
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Arginin	Fluka, Buchs
Asparaginsäure	Fluka, Buchs
Bacto-Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson, USA
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, USA
Bacto-Pepton	Becton Dickinson, USA
Bis-Tris	Sigma, München
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Fraktion V)	Roche, Mannheim
CaCl ₂	Riedel-de-Haën, Seeze
Complete Inhibitor	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250 DABCO	Sigma, München
Cystein	Fluka, Buchs
DEPC	Sigma, München
DMEM ohne Cystein, Methionin, Glutamin und Natriumpyruvat	Gibco, USA
dNTPs	Amersham Biosciences, Freiburg
DMSO	Merck, Darmstadt
DOC	Sigma, München
DTT	Roche, Schweiz
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Hoechst, Dortmund
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FCS	Biochrom, Berlin
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, England
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Invitrogen, USA
Galaktose	Serva, Heidelberg
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerol (87%)	Merck, Darmstadt
H ₃ PO ₄	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HCl	Riedel-de-Haën, Seeze
Hefe Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren	Becton Dickinson, USA

HEPES	Merck, Darmstadt
Fischsperma-DNA	Serva, Heidelberg
Isoleucin	Fluka, Buchs
KAc	Riedel-de-Haën, Seeze
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Leucin	Fluka, Buchs
Leupeptin	Biomol, Hamburg
LiAc	Sigma, München
LiCl	Merck, Darmstadt
Luminol	Fluka, Buchs
Lysin	Fluka, Buchs
Magermilchpulver	Neuform, Herrenberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methionin	Fluka, Buchs
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
MnCl ₂	Merck, Darmstadt
MOPS	Serva, Heidelberg
NaAcetat	Serva, Heidelberg
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Merck, Darmstadt
NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Life Technologies, USA
Nonidet P40	Roche, Schweiz
NTPs	peqLab, Erlangen
Orange G	Fluka, Buchs
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs
Pefablock	Biomol, Hamburg
PEG-3350	Sigma, München
Penicillin G	Grünenthal, Stolberg
Pepstatin A	Biomol Hamburg
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phenylalanin	Fluka, Buchs
PMSF	Böhringer, Mannheim
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Prolin	Fluka, Buchs
Raffinose	Serva, Heidelberg
RbCl	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
Serin	Fluka, Buchs
Streptomycin	Hefa Pharma, Werne
Sucrose	Serva, Heidelberg

TEMED	Sigma, München
Threonin	Fluka, Buchs
Tricin	MP Biomedicals, USA
Tris	Invitrogen, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Tyrosin	Fluka, Buchs
Valin	Fluka, Buchs

2.5 Radiochemikalien

³⁵ S-Methionin (1175 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	MP Biomedicals, USA
³⁵ S-Cystein (1075 Ci/mmol, 10m Ci/ml)	MP Biomedicals, USA
¹⁴ C-Molekulargewichtsstandard CFA626	GE Healthcare, München
¹⁴ C-Molekulargewichtsstandard CFA645	GE Healthcare, München

2.6 Sonstige Materialien

Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 50 ml)	Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml u. 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel
Gilson-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Glasperlen (425-600 µm)	Sigma, München
Nitrocellulose BA83	Schleicher & Schuell, Dassel
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Röntgenfilme	Kodak Biomax-MR Kodak, USA
CL-XPosure Filme	Pierce, USA
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml u. 50 ml)	Becton Dickinson, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml u. 30 ml)	Corex, USA
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Beckman, München

2.7 Geräte

ABI-PRISM 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Analysenwaage Satorius	Analytic Satorius, Göttingen
Blotkammer Mini-Trans Blot	Biorad, München
Blotkammer Tankblot	Hoefer, USA
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems, USA

Eraser (für imaging plate)	Raytest, Straubenhardt
Filmkassetten	Agfa, Köln
Fujifilm Phosphorimager Bas-1500	Raytest, Straubenhardt
Fujifilm imaging plate	Raytest, Straubenhardt
Geldokumentationssystem E.A.S.Y	Herolab, Wiesloch
Gelelektrophoresekammer horizontal	Feinmechanik, FLI-Tübingen
Gelelektrophoresekammer vertikal	Feinmechanik, FLI-Tübingen
Gelelektrophoresekammer MIGHTY SMALL II	Hofer, USA
Geltrockner Drygel Sr. SE1160	Hofer, USA
Glasgefäße	Schott, Mainz
Heiz-Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Inkubator B5050	Heraeus, Hanau
Kühlfalle	Bachofer, Reutlingen
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch, Gerlingen
Minifuge 2	Heraeus-Christ, Osterode
Minifuge GL	Heraeus, Hanau
PCR-Gerät Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen
PCR-Gerät Gene Amp 9600	Perkin Elmer, USA
pH-Meter Calimetic	Knick, Berlin
Power-Supply PS500XT	Hofer, USA
Rotor TLA 45	Beckmann, München
Rotor 5310	Heraeus Sepatech, Hanau
Rotor 3350	Heraeus, Hanau
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, UK
Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company, USA
Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, England
Sterilbank LaminAir HB2472	Heraeus, Hanau
Sterilbank	Prettl, Pfullingen
Thermodrucker P93D	Mitsubishi, Japan
Thermomix 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostatic Circulator 2219 Multitemp II	Bromma, Schweden
Transilluminator (254 nm)	Bachofer, Reutlingen
Transilluminator (302 nm) R.	Vetter, Ammerbuch
Ultrazentrifuge TL 100	Beckmann, München
Vakuumpumpe	Edwards, England
Variofuge RF	Heraeus, Hanau
Vortex Vibrofix VF1	Bachofer, Reutlingen
Waage Mettler PM2000	Mettler, Gießen
Wasserbad HAAKE D8	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3	Bachofer, Reutlingen
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

2.8 Verwendete Kits

BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Nucleo-Spin®-Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond®AC-100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond®AC-20 Kit	Macherey-Nagel, Düren
peqGold Trifast™	peqLab, Erlangen
SuperSignalWest Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, USA
Western Blot Signal Enhancer	Pierce, USA

2.9 Verwendete Software

pDraw32 1.1.93	AcaClone Software (pDraw32,)
Tina 2.0	Raytest, Straubenhardt

2.10 Medien, Lösungen und Puffer

Die Lösungen wurden in demineralisiertem Wasser (Millipore-Anlage) angesetzt.

Blockpuffer (Westernblot)	5% (w/v)	Magermilchpulver in PBS-Tween
DNA-Probenpuffer (5×)	0,125% (w/v)	Orange G
	15% (w/v)	Ficoll 400
	5×	TAE
dNTP-Mix (50x)	10 mM	dATP
	10 mM	dCTP
	10 mM	dGTP
	10 mM	dTTP
Entfärbelösung	20% (v/v)	Methanol
	3% (v/v)	Glycerol
“Carrier”-DNA	200 mg	Fischsperma-DNA in 100ml TE (1x)
Coomassie-Stock	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	0,25% (w/v)	Serva Blue G
Fixierlösung	30% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Jagow-Anodenpuffer (10×)	2 M	Tris (pH 8,9)
Jagow-Gelpuffer (3×)	3 M	Tris (pH 8,45)
	0,3% (w/v)	SDS
Jagow-Kathodenpuffer (10×)	1 M	Tris
	1 M	Tricin
	1% (w/v)	SDS
		pH 8,25

2.Material

Lämmli-Puffer	0,25 M	Tris
	1,925 M	Glycin
		pH 8,3
LB-Amp-Medium	100 µg/ml	Ampicillin in LB-Medium
LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto-Yeast-Extrakt
	5 g	NaCl
		auf 1l Wasser
LiAc/0,5xTE	100 mM	LiAc, pH7,5
	5 mM	Tris-HCl, pH7,5
	0,5 mM EDTA	EDTA
LiAc/40% PEG/0,5xTE	100 mM	LiAc, pH7,5
	40% (w/v)	PEG-3350
	10 mM	Tris-HCl, pH7,5
	1 mM	EDTA
Lysispuffer (Hefe)	50 mM	Natriumphosphat, pH7,4
	1 mM	EDTA
	5% (v/v)	Glycerol
	1 mM	PMSF
Markierungsmedium	4 mM	Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
Minipräp-Lösung 1	50 mM	Tris
	10 mM	EDTA
	50 mM	Glucose
		pH 8,0
Minipräp-Lösung 2	0,2 M	NaOH
	1% (v/v)	Triton X-100
Minipräp-Lösung 3	3 M	NaAcetat (pH 4,8)
PBS	0,5 mM	MgCl ₂
	0,9 mM	CaCl ₂
	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	7,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
PBS-A	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	7,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
PBS-Tween	0,01% (v/v)	Tween-20 in PBS
Ponceau-Färbelösung	2,5 g/l	Ponceau S
	40% (v/v)	Methanol
	1,5% (v/v)	Essigsäure

RIP-Lösung 1	1% (v/v)	Triton X-100
	0,1% (w/v)	DOC
	0,1% (w/v)	SDS
	20 mM	Tris
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mg/l	BSA
RIP-Lösung 2	1% (v/v)	pH 7,6
	1% (v/v)	Triton X-100
	0,5% (w/v)	DOC
	0,1% (w/v)	SDS
	20 mM	Tris
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
RIP-Lösung 3		pH 7,6
	0,2% (v/v)	Triton X-100
	20 mM	Tris
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
RIP-Lösung 4		pH 7,6
	0,06% (v/v)	Triton X-100
	6 mM	Tris
	30 mM	NaCl
	0,3 mM	EDTA
RIP-Sucrose-Lösung		pH 7,6
	25% (w/v)	Sucrose
	1% (v/v)	Triton X-100
	0,5% (w/v)	DOC
	0,1% (w/v)	SDS
	20 mM	Tris
	100 mM	NaCl
SD-Medium (ohne Uracil, Histidin, Tryptophan)	1 mM	EDTA
	2 mg/l	BSA
		pH 7,6
	0,67% (w/v)	Hefe Stickstoff-Basis ohne AS
	2% (w/v)	Galaktose
	2% (w/v)	Raffinose
	0,01% (w/v)	Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin
0,005% (w/v)	Asparaginsäure, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin	
(2% [w/v])	(Agar)	

2.Material

SDS-Probenpuffer	62,5 mM 2% (w/v) 10% (v/v) 6 M 5% (v/v) 0,01% (w/v) 0,01% (w/v)	Tris-HCl (pH 6,8) SDS Glycerol Harnstoff β-Mercaptoethanol Bromphenolblau Phenolrot
SDS-PAGE-Sammelgel	0,075% (w/v) 10% (w/v) 0,75 M 0,08% (w/v) 0,09% (w/v)	SDS Acrylamid (29:1) Tris-HCl (pH 8,45) APS TEMED
SDS-PAGE-Trenngel	0,1% (w/v) 8-16% (w/v) 1 M 5,5% 0,05% (w/v) 0,05% (w/v)	SDS Acrylamid (29:1) Tris-HCl (pH 8,45) Glycerol APS TEMED
TAE	40 mM 5 mM 1 mM	Tris Natriumacetat EDTA pH 7,8
TBE	50 mM 50 mM 1 mM	Tris Borsäure EDTA
TE (10×)	100 mM 10 mM	Tris-HCl (pH 7,5) EDTA
TFB I	30 mM 50 mM 10 mM 100 mM	KAc (pH 5.8) MnCl ₂ CaCl ₂ RbCl
TFB II	15% (v/v) 10 mM 75 mM 10 mM 15% (v/v)	Glycerol MOPS CaCl ₂ RbCl Glycerol
Transferpuffer	18% (v/v)	Methanol in Lämmli-puffer
Trypsin	1,25% (w/v) 137 mM 27 mM 4,3 mM 15 mM 0,5 g/l 10 ⁶ U/l	Trypsin NaCl KCl EDTA KH ₂ PO ₄ Streptomycin Penicillin
YB-Medium	10mM 20mM	KCl MgSO ₄ in LB-Medium

YPD-Medium	10 g	Bacto-Yeast-Extrakt
	20 g	Bacto-Pepton
	20 g	D-Glukose
		auf 1l Wasser

2.11 Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung wurden von Metabion (München), Invitrogen (Karlsruhe) oder Biomers (Ulm) bezogen und vom Hersteller frei von Schutzgruppen, entsalzt und lyophilisiert geliefert. Aufgelistet sind die Sequenzen der Oligonukleotide und die Plasmide, zu deren Herstellung sie genutzt wurden.

Name	Plasmid	Sequenz
FCV46F	pCH2	CCTCCTACATGGGGATTCAATTGGCAA
FCV46R	pCH2	TTGCCAATTGAATCCCCATGTAGGAGG
FCV47F	pCH3	TCCTACATGGGAATACAATTGGCAAAGAT
FCV47R	pCH3	ATCTTTGCCAATTGTATTCCCATGTAGGA
CL-	pCH-	
3	11	TTCAATGACTAAATTATAAATTCAATTCTAGGC
4	11	GCCTAGAATTGAATTTATAATTTAGTCATTGAA
5	12	TTCAATGACTAAATTCTGAATTCAATTCTAGGC
6	12	GCCTAGAATTGAATTCAGAATTTAGTCATTGAA
7	13	TTCAATGACTAAATTGTGAATTCAATTCTAGGC
8	13	GCCTAGAATTGAATTCACAATTTAGTCATTGAA
9	14	TTCAATGACTAAATTATGGATTCAATTCTAGGC
10	14	GCCTAGAATTGAATCCATAATTTAGTCATTGAA
11	15	TTCAATGACTAAATTATGTATTCAATTCTAGGC
12	15	GCCTAGAATTGAATACATAATTTAGTCATTGAA
13	16	TTCAATGACTAAATTATGCATTCAATTCTAGGC
14	16	GCCTAGAATTGAATGCATAATTTAGTCATTGAA
15	17	GAGTTCAATGACTAAACTTATGAATTCAATTCTAG
16	17	AGAATTGAATTCATAAGTTTAGTCATTGAACTC
17	18	GAGTTCAATGACTAAATTCATGAATTCAATTCTAGG
18	18	CCTAGAATTGAATTCATGAATTTAGTCATTGAACTC
19	4	TGTGATAGGATCCACCAAGATTGC
20	5	CTTCTCGGATCCGATTCTTTTCGC
21	6	TGTCGGTGGATCCAACGTTGGTAA
22	7	CTACATGGGATCCCAATTGGCAA
23	8	CAATTGGGAATTCACAACAAATAG
24	9	AGCAACGGAATTCGGCGCTTAGG
25	10	CATACACGAATTCAAATTTTTTATGAC
26	19	TAAATTGGGATCCCCTCTTACTGCC
27	20	TCCTCTTGGATCCTCCTACATGGG
28	21	ATTTTCGACATATGGCTGATGATGGG

2.Material

Name	Plasmid	Sequenz
CL- 29	pCH- 22	CTTACTGCCGGATCCATGGGAATTCAA
32f	24-26, 70	CAATTCTACGCTTATTTGATACTGTTAC
32r	24-26, 70	GTAACAGTATCAAATAAGCGTAGAATTG
39f	34	TTGGAGTTTCTCTTATGGGAATTCAATTGG
39r	34	CCAATTGAATTCCCATAAGAGGAAACTCCAA
40f	35	CTTACTGCCTCCTACTTGGCAAAGATTCCGG
40r	35	CCGAATCTTTGCCAAGTAGGAGGCAGTAAG
41f	36	TACATGGGAATTCACGGCTTGCCTCAAAC
41r	36	GTTTGAGGCAAGCCGTTGAATCCCATGTA
42f	37	CAATTGGCAAAGATTAACATTAGGAGTTCA
42r	37	TGAACTCCTAATGTTAATCTTTGCCAATTG
43f	38	GATTCGGCTTGCCTCATCAATGACTAAATTA
43r	38	TAATTTAGTCATTGATGAGGCAAGCCGAATC
44f	39	CAAACATTAGGAGTTTATGAATTCAATTC
44r	39	GAATTGAATTCATAAACTCCTAATGTTTG
45f	40	CTTACTGCCTCCTACGGAATTCAATTGGCA
45r	40	TGCCAATTGAATTCCGTAGGAGGCAGTAAG
46f	41	ACTGCCTCCTACATGATTCAATTGGCAAAG
46r	41	CTTTGCCAATTGAATCATGTAGGAGGCAGT
47f	42	GCCTCCTACATGGGACAATTGGCAAAGATTC
47r	42	GAATCTTTGCCAATTGTCCCATGTAGGAGGC
48f	43	CTCCTACATGGGAATTTTGGCAAAGATTCCGG
48r	43	CCGAATCTTTGCCAAAATTCCCATGTAGGAG
49f	44	CAAACATTAGGAGTATGACTAAATTATGA
49r	44	TCATAAATTTAGTCATACTCCTAATCTTTC
50f	45	AACATTAGGAGTTCAACTAAATTATGAATT
50r	45	AATTCATAATTTAGTTGAACTCCTAATGTT
51f	46	ATTAGGAGTTCAATGAAATTATGAATTCAA
51r	46	TTGAATTCATAATTTCAATTGAACTCCTAAT
52f	47	AGGAGTTCAATGACTTTATGAATTCAATTC
52r	47	GAATTGAATTCATAAAGTCATTGAACTCCT
53f	48	GAGTTCAATGACTAAATGAATTCAATTCTAG
53r	48	CTAGAATTGAATTCATTTAGTCATTGAACTC
57seq	49	CCAACGTTGGTAAATTGACTGCCTCCTACATGG
57rev	49	CCATGTAGGAGGCAGTCAATTTACCAACGTTGG
58f	50	GGAGTTTCTCTTGCCTCCTACATGGG
58r	50	CCCATGTAGGAGGCAAGAGGAAACTCC
59f	51	GAGTTTCTCTTACTTCCTACATGGGAATTC
59r	51	GAATTCCTCATGTAGGAAGTAAGAGGAAACTC
60f	52	GTTTCTCTTACTGCCTACATGGGAATTC
60r	52	GAATTCCTCATGTAGGCAGTAAGAGGAAAC
61f	53	CTCTTACTGCCTCCATGGGAATTC AATTG
61r	53	CAATTGAATTCCTCATGGAGGCAGTAAGAG
62f	54	CGGCTTGCCTCAATTAGGAGTTCAATGAC
62r	54	GTCATTGAACTCCTAATTGAGGCAAGCCG

Name	Plasmid	Sequenz
CL-63f	pCH-55	GGCTTGCCTCAAACAGGAGTTCAATGAC
63r	55	GTCATTGAACTCCTGTTTGAGGCAAGCC
64f	56	GCTTGCCTCAAACATTAGTTCAATGACTAAA
64r	56	TTTAGTCATTGAACTAATGTTTGAGGCAAGC
65f	57	CCTCAAACATTAGGTCAATGACTAAATTA
65r	57	TAATTTAGTCATTGACCTAATGTTTGAGG
66f	58	GACTAAATTATGAATTGTTCAATTCTAGGC
66r	58	GCCTAGAATTGAACAATTCATAATTTAGTC
67f	59	GAAATCTGTTTAAAAATTGTTGATCATGTATC
67r	59	GATACATGATCAACAATTTTTAAACAGATTTT
70	60	TCCTCTTACTggatccTACATGGG
71f	61	TTCAATGACTAAATTCTAAATTCAATTCTAGGC
71r	61	GCCTAGAATTGAATTTAGAATTTAGTCATTGAA
72f	62	TTCAATGACTAAATTTGCAATTCATTCTAGGC
72r	62	GCCTAGAATTGAATTGCAAATTTAGTCATTGAA
73f	63	GCGCTTAGGCGCTGCAATTTAGATCAAC
73r	63	GTTGATCTAAATTGCAGCGCCTAAGCGC
74f	64	CATGGGAATTCAATTGTCAAACATTAGGAGTTC
74r	64	GAACTCCTAATGTTTGACAATTGAATCCCATG
75f	65	CTACATGGGAATTCAAACATTAGGAGTTCAATG
75r	65	CATTGAACTCCTAATGTTTTGAATCCCATGTAG
76f	66	CCTCAAACATTAGGAGTACTAAATTATGAATTC
76r	66	GAATTCATAATTTAGTACTCCTAATGTTTGAGG
77f	67	CATTAGGAGTTCAATGTTATGAATTCATTCTAG
77r	67	CTAGAATTGAATTCATAACATTGAACTCCTAATG
84f	73	GGAATTCAATTGGCAGCCTCAAACATTAGG
84r	73	CCTAATGTTTGAGGCTGCCAATTGAATTCC
85f	74	CTCCTACATGGGAATTATTAGGAGTTCAATG
85r	74	CATTGAACTCCTAATAATTCCCATGTAGGAG
86f	75	GCCTCCTACATGGGAAGGAGTTCAATGACTA
86r	75	TAGTCATTGAACTCCTTCCCATGTAGGAGGC
95f	82	CCTCCTACATGGGCATTCAATTGGCAA
95r	82	TTGCCAATTGAATGCCCATGTAGGAGG
96f	83	TACTGCCTCCTACGTGGGAATTCAATTGG
96r	83	CCAATTGAATTCCCACGTAGGAGGCAGTA
97f	84	TACTGCCTCCTACCTGGGAATTCAATTGG
97r	84	CCAATTGAATTCCCAGGTAGGAGGCAGTA
98f	85	CTGCCTCCTACATGCGAATTCAATTGGC
98r	85	GCCAATTGAATTCGCATGTAGGAGGCAG
99f	86	CTGCCTCCTACATGGTAATTCAATTGGC
99r	86	GCCAATTGAATTACCATGTAGGAGGCAG
100f	87	CTTACTGCCTCCTATATGGGAATTCAATTGG
100r	87	CCAATTGAATTCCCATATAGGAGGCAGTAAG
101f	88	CCTCCTACATGGGACTTCAATTGGCAA
101r	88	TTGCCAATTGAAGTCCCATGTAGGAGG

2.Material

Name	Plasmid	Sequenz
CL-	pCH-	
102f	89	CCTCCTACATGGGAACTCAATTGGCAA
102r	89	TTGCCAATTGAGTTCCCATGTAGGAGG
105f	92	CTTACTGCCTCCTCCATGGGAATTCAATTGG
105r	92	CCAATTGAATTCCCATGGAGGAGGCAGTAAG
106f	93	CTACATGGGAATTCAAGCAAAGATTTCGGC
106r	93	GCCGAATCTTTGCTTGAATTCCCATGTAG
107f	94	CATGGGAATTCAATTGAAGATTTCGGCTTGCC
107r	94	GGCAAGCCGAATCTTCAATTGAATTCCCATG
108f	95	GGAATTCAATTGGCAATTCGGCTTGCCTC
108r	95	GAGGCAAGCCGAATTGCCAATTGAATTCC
109f	96	GAATTCAATTGGCAAAGCGGCTTGCCTCAAAC
109r	96	GTTTGAGGCAAGCCGCTTTGCCAATTGAATTC
110f	97	CAATTGGCAAAGATTCTTGCCTCAAACATTAG
110r	97	CTAATGTTTGAGGCAAGAATCTTTGCCAATTG
111f	98	GGCAAAGATTTCGGGCTCAAACATTAGG
111r	98	CCTAATGTTTGAGGCCCGAATCTTTGCC
112f	99	GCAAAGATTTCGGCTTTCAAACATTAGGAG
112r	99	CTCCTAATGTTTGAAAGCCGAATCTTTGC
113f	100	GATTCGGCTTGCCAACATTAGGAGTTC
113r	100	GAACTCCTAATGTTGGCAAGCCGAATC
114f	90	AACATTAGGAGTTCGACGTCCAGACTATG
114r	90	CATAGTCTGGACGTGCAACTCCTAATGTT
116f	101	TACTGCCTCCTACACGGGAATTCAATTGG
116r	101	CCAATTGAATTCCCGTGTAGGAGGCAGTA
117f	102	CTGCCTCCTACATTGGAATTCAATTGGC
117r	102	GCCAATTGAATTCCAATGTAGGAGGCAG
118f	103	CCTACATGGGAATCCAATTGGCAAAGATTC
118r	103	GAATCTTTGCCAATTGGATTCCCATGTAGG
121f	104	CTCAAACATTSGGAGTTCATGACTAAAT
121r	104	TTAGTCATTGAACTCCSAATGTTTGAGGC
122f	105	CTCAAACATTAMGAGTTCATGACTAAAT
122r	105	TTAGTCATTGAACTCKTAATGTTTGAGGC
123f	106	CTCAAACATTAGMAGTTCATGACTAAAT
123r	106	TTAGTCATTGAACTKCTAATGTTTGAGGC
124f	107	CTCAAACATTAGGKGTTCATGACTAAAT
124r	107	TTAGTCATTGAACMCCTAATGTTTGAGGC
124Gf	107g	CTCAAACATTAGGGGTTCATGACTAAAT
124Gr	107g	TTAGTCATTGAACCCCTAATGTTTGAGGC
125f	108	CTCAAACATTAGGAMTTCATGACTAAAT
125r	108	TTAGTCATTGAAKTCCCTAATGTTTGAGGC
126f	109	CTCAAACATTAGGAGMTCAATGACTAAAT
126r	109	TTAGTCATTGAKCTCCCTAATGTTTGAGGC
129f	110	TTACTGCCTCCTTCATGGGAATTCAATTG
129r	110	AATTGAATTCCCATGAAGGAGGCAGTAAG
130f	111	CCTCTTACTGCCTCCRACATGGGAATTC

Name	Plasmid	Sequenz
CL-	pCH-	
130r	111	GAATTCCCATGTYGGAGGCAGTAAGAGG
131f	112	CCTACATGGGAATTRAATTGGCAAAG
131r	112	CTTTGCCAATTYAATTCCCATGTAGG
132f	114	CCTCTTACTGCCTKCTACATGGGAATTC
132r	114	GAATTCCCATGTAGMAGGCAGTAAGAGG
133f	113	CCTCTTACTGCCTCKTACATGGGAATTC
133r	113	GAATTCCCATGTAMGAGGCAGTAAGAGG
132Gf	114g	CCTCTTACTGCCTGCTACATGGGAATTC
132Gr	114g	GAATTCCCATGTAGCAGGCAGTAAGAGG
133Tf	113u	CCTCTTACTGCCTCTTACATGGGAATTC
133Tr	113u	GAATTCCCATGTAAGAGGCAGTAAGAGG
169f	138	CCTACATGGGAATAAAATTGGCAAAGATTC
169r	138	GAATCTTTGCCAATTTTATTCCCATGTAGG
170f	139	CCTACATGGGAATAACATTGGCAAAGATTC
170r	139	GAATCTTTGCCAATGTTATTCCCATGTAGG
171f	140	CCTACATGGGAATAACGTTGGCAAAGATTC
171r	140	GAATCTTTGCCAACGTTATTCCCATGTAGG
CL-		
146	pYF21A (cMyc- Tag Region1)	TTCAGAAATCAATTTTTGTTTCGAGGTACCCAG
147	pYF21A (cMyc- Tag Region 2)	TTTTCCCTGGGTCACAAATCTTCTTCAGAAATC
134f	pYF21H	CTGCCTCCTACATTAATAAATCAATTGGC
134r	pYF21H	GCCAATTGATTTTTTAATGTAGGAGGCAG
148f	pYF126	CTGCCTCCTACATCCCAATTCAATTGGC
148r	pYF126	GCCAATTGAATTGGGATGTAGGAGGCAG
93f	pNY1	CGGGTGGTGTATTATCCCATGACCCACTCGG
93r	pNY1	CCGAGTGGGTCATGGGAATAACACCACCCG
150f	pNY2	CGGGTGGTGTATTATGGGATGACCCACTCGG
150r	pNY2	CCGAGTGGGTCATCCCAATAACACCACCCG

2.12 Verwendete Plasmide

2.12.1 Käuflich erworbene Plasmide

pCITE 2a (+) Novagen, Merck, Darmstadt
 pYES 2 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.12.2 Plasmide aus eigener Herstellung

Zur Untersuchung des Mechanismus' der VP2-Translation und zur Detektion essentieller Sequenzregionen wurde eine Reihe von Expressionsplasmiden, ausgehend von Vektor pCH1 hergestellt (Abbildung 2.1).

Die Plasmide wurden durch Kombination der verschiedenen Klonierungsmethoden gewonnen, so z.B. durch gezielte PCR gestützte Mutagenese, durch Amplifikation mit Oligonukleotiden mit Restriktions-Erkennungsequenzen, Spaltung mit den entsprechenden Enzymen und anschließende Ligation in einen passenden Vektor oder durch Kombination von DNA Fragmenten aus zwei oder mehr Plasmiden, die mit passenden Enzymen geschnitten worden waren.

Die Tabellen listen die Mutationen innerhalb der einzelnen cDNA Konstrukte auf. Innerhalb der Nukleinsäuresequenzen sind die ausgetauschten Basen hervorgehoben oder die Position der Deletionen durch einen Schrägstrich angezeigt.

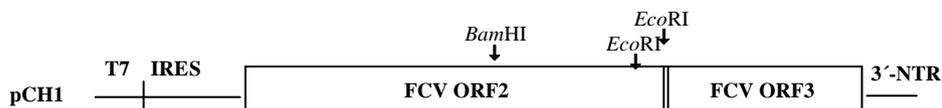


Abbildung 2.1: **Konstrukt pCH1**

Ausschnitt aus dem pCH1 Konstrukt, mit dem T7 Promotor-Bereich, der IRES-Region aus EMCV, und den beiden überlappenden Leserastern für die Kapsidproteine mit anschließender nicht-translatierter Region.

Plasmide basierend auf pCH1

Plasmid	Funktion	Nukleinsäuresequenz
pCH2	Einzelsubstitution in Motiv 1	CATGGGAT <u>T</u> TTC
pCH3	<i>EcoRI</i> -Deletion, Einzelsubstitution stromab Motiv 1	GGGAAT <u>A</u> C
pCH4	ORF2-Deletion, Nt 1204 bis 1515 (492 Nt bleiben)	GGATCC/ACCAAGAT
pCH5	ORF2-Deletion, Nt 1204 bis 1809 (198 Nt bleiben)	GGATCC/GATTCTTT
pCH6	ORF2-Deletion, Nt 1204 bis 1902 (105 Nt bleiben)	GGATCC/AACGTTGG
pCH7	ORF2-Deletion, Nt 1204 bis 1950 (57 Nt bleiben)	GGATCC/CAATTGGC
pCH8	ORF3-Deletion, Nt 9 bis 53 (Δ 45 Nt)	GAATTC/ACAACAA
pCH9	ORF3-Deletion, Nt 9 bis 101 (Δ 93 Nt)	GAATTC/GGCGCTT
pCH10	ORF3-Deletion, Nt 9 bis 257 (Δ 249 Nt)	GAATTC/AAATTTT
pCH11	Einzelsubstitution Start ORF3	ATA <u>A</u>
pCH12	Einzelsubstitution Start ORF3	<u>C</u> TG
pCH13	Einzelsubstitution Start ORF3	<u>G</u> TG
pCH14	Einzelsubstitution Stopp ORF2	TGG <u>—</u>
pCH15	Einzelsubstitution Stopp ORF2	TGT <u>—</u>
pCH16	Einzelsubstitution Stopp ORF2	TGC <u>—</u>
pCH17	Insertion 3'-ORF2 (Rasterfusion)	AAAC <u>C</u> TTATGA
pCH18	Insertion 3'-ORF2 (Rasterfusion)	AAATT <u>C</u> ATGA
pCH19	ORF2-Deletion, Nt 1204 bis 1923 (84 Nt bleiben)	GGATCC/CCTCTTAC
pCH20	ORF2-Deletion, Nt 1204 bis 1936 (72 Nt bleiben)	GGATCC/TCCTACAT
pCH21	Deletion des „Leader“-Proteins	ATG/GCTGATGAT
pCH22	ORF2-Deletion, Nt 1204 bis 1939 (66 Nt bleiben)	GGATCC/ATGGGAAT

Plasmid	Funktion	Nukleinsäuresequenz
pCH24	3 Stopps im ORF2 Raster mutiert	T <u>G</u> G, T <u>A</u> C, T <u>A</u> T
pCH25	3 Stopps im ORF2 Raster mutiert	T <u>G</u> T, T <u>A</u> C, T <u>A</u> T
pCH26	3 Stopps im ORF2 Raster mutiert	T <u>G</u> C, T <u>A</u> C, T <u>A</u> T
pCH34	12-Nt-Deletion -78 bis -67	CCTCTT/ATGGGA
pCH35	12-Nt-Deletion -66 bis -55	TCCTAC/TTGGCA
pCH36	12-Nt-Deletion -54 bis -43	ATTCAA/CGGCTT
pCH37	12-Nt-Deletion -42 bis -31	AAGATT/AACATT
pCH38	12-Nt-Deletion -30 bis -19	GCCTCA/TCAATG
pCH39	12-Nt-Deletion -18 bis -7	AGGAGT/TTATGA
pCH40	3-Nt-Deletion -66 bis -64	TCCTAC/GGAATT
pCH41	3-Nt-Deletion -63 bis -61	TACATG/ATTCAA
pCH42	3-Nt-Deletion -60 bis -58	ATGGGA/CAATTG
pCH43	3-Nt-Deletion -57 bis -55	GGAATT/TTGGCA
pCH44	3-Nt-Deletion -18 bis -16	AGGAGT/ATGACT
pCH45	3-Nt-Deletion -15 bis -13	AGTTCA/ACTAAA
pCH46	3-Nt-Deletion -12 bis -10	TCAATG/AAATTA
pCH47	3-Nt-Deletion -9 bis -7	ATGACT/TTATGA
pCH48	3-Nt-Deletion -6 bis -4	ACTAAA/TGAAAT
pCH49	12-Nt-Deletion -90 bis -79	AAATTG/TGAAAT
pCH50	3-Nt-Deletion -78 bis -76	CCTCTT/GCCTCC
pCH51	3-Nt-Deletion -75 bis -73	CTTACT/TCCTAC
pCH52	3-Nt-Deletion -72 bis -70	ACTGCC/TACATG
pCH53	3-Nt-Deletion -69 bis -67	GCCTCC/ATGGGA
pCH54	3-Nt-Deletion -30 bis -28	GCCTCA/ATTAGG
pCH55	3-Nt-Deletion -27 bis -25	TCAAAC/AGGAGT
pCH56	3-Nt-Deletion -24 bis -22	AACATT/AGTTCA
pCH57	3-Nt-Deletion -21 bis -19	ATTAGG/TCAATG
pCH58	Cys-Insertion 5'-ORF3	AUGAAU <u>UGU</u> UCA
pCH59	Cys-Insertion 3'-ORF3	AAU <u>UGU</u> UGA
pCH60	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1939 (69 Nt bleiben)	GGATCC/TACATGGG
pCH61	2-Nt-Substitution Start ORF3	<u>CTA</u>
pCH62	3-Nt-Substitution Start ORF3	<u>TGC</u>
pCH63	Substitution des 2. Met im ORF3 zu Cys	CGC <u>TG</u> CAAT
pCH64	18-Nt-Deletion -51 bis -34	CAATTG/TCAAAC
pCH65	24-Nt-Deletion -54 bis -31	ATTCAA/AACATT
pCH66	6-Nt-Deletion -18 bis -13	AGGAGT/ACTAAA
pCH67	6-Nt-Deletion -12 bis -7	TCAATG/TTATGA
pCH70	Folge Stopps im ORF2 Raster	T <u>A</u> C, T <u>A</u> T
pCH72	4-Nt-Insertion in <i>Bg/III</i> Restriktionsschnittstelle	TTAGAT <u>TCGA</u> TCTAT
pCH73	12-Nt-Deletion -48 bis -37	TTGGCA/GCCTCA
pCH74	30-Nt Deletion -57 bis -28	GGAATT/ATTAGG
pCH75	36-Nt Deletion -60 bis -25	ATGGGA/AGGAGT
pCH82	Einzelsubstitution in Motiv 1	CATGGG <u>C</u> ATTC
pCH83	Einzelsubstitution in Motiv 1	C <u>G</u> TGGGAATTC
pCH84	Einzelsubstitution in Motiv 1	C <u>C</u> TGGGAATTC
pCH85	Einzelsubstitution in Motiv 1	CATG <u>C</u> GAAATTC

Plasmid	Funktion	Nukleinsäuresequenz
pCH86	Einzelsubstitution in Motiv 1	CATGG <u>T</u> AATTC
pCH87	Einzelsubstitution in Motiv 1	<u>T</u> ATGGGAATTC
pCH88	Einzelsubstitution in Motiv 1	CATGGGA <u>C</u> TTC
pCH89	Einzelsubstitution in Motiv 1	CATGGGA <u>A</u> CTC
pCH90	Region zwischen Motiv 2 und Start ORF3	T <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u>
pCH92	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CTCCT <u>C</u>
pCH93	3-Nt-Deletion -54 bis -52	ATTCAA/GCAAAG
pCH94	3-Nt-Deletion -51 bis -49	CAATTG/AAGATT
pCH95	3-Nt-Deletion -48 bis -46	TTGGCA/ATTCGG
pCH96	3-Nt-Deletion -45 bis -43	GCAAAG/CGGCTT
pCH97	3-Nt-Deletion -42 bis -40	AAGATT/CTTGCC
pCH98	3-Nt-Deletion -39 bis -37	ATTCGG/GCCTCA
pCH99	3-Nt-Deletion -36 bis -34	CGGCTT/TCAAAC
pCH100	3-Nt-Deletion -33 bis -31	CTTGCC/AACATT
pCH101	Einzelsubstitution in Motiv 1	C <u>A</u> CGGGAATTC
pCH102	Einzelsubstitution in Motiv 1	CAT <u>T</u> GGAATTC
pCH103	Einzelsubstitution stromab von Motiv 1	CATGGGAAT <u>C</u> C
pCH104c	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>C</u> GGAGT
pCH104g	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>G</u> GGAGT
pCH105a	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> AGAGT
pCH105c	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>C</u> GAGT
pCH106a	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> AGT
pCH106c	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> AGT
pCH107u	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> GT
pCH107g	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> GT
pCH108c	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> T
pCH108a	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> T
pCH109c	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u>
pCH109a	Einzelsubstitution in Motiv 2	T <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u>
pCH110	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CTCCT <u>T</u>
pCH111g	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CTCC <u>G</u> A
pCH111a	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CTCC <u>A</u> A
pCH112a	Einzelsubstitution stromab von Motiv 1	CATGGGAAT <u>T</u> A
pCH112g	Einzelsubstitution stromab von Motiv 1	CATGGGAAT <u>T</u> <u>G</u>
pCH113u	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CTC <u>T</u> TA
pCH113g	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CTC <u>G</u> TA
pCH114u	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CT <u>T</u> CTA
pCH114g	Einzelsubstitution in Motiv 2*	CT <u>G</u> CTA
pCH138	Verlängerung des Motivs 1 um 2 Nt	CATGGGAAT <u>AAAA</u>
pCH139	Verlängerung des Motivs 1 um 3 Nt	CATGGGAAT <u>AACA</u>
pCH140	Verlängerung des Motivs 1 um 4 Nt	CATGGGAAT <u>AACG</u>

Das Konstrukt pCnC1 (Abbildung 2.2) basiert auf dem pCH1 Plasmid. An den ORF3 ist hierbei das Gen, welches für das CSFV („classical swine fever virus“) N^{Pro} kodiert, anfusioniert. Für die Verkürzungen innerhalb der ORF3 Region (pCnC8-10) wurde die *EcoRI* Restriktionsschnittstelle nach dem ORF3 Start genutzt, daher wurde die *EcoRI* Restriktionsschnittstelle ca. 60 Nt stromauf durch Einzelsubstitution zerstört (pCnC3).

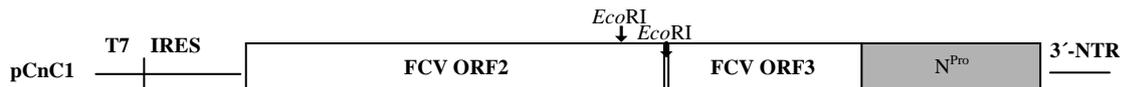


Abbildung 2.2: **Konstrukt pCnC1**

Ausschnitt aus dem pCnC1 Konstrukt, mit dem T7 Promotor-Bereich, der IRES-Region aus EMCV, und zwei überlappenden Leserastern. Das erste Leseraster (ORF2) kodiert für das VP1. Das zweite Leseraster besteht aus der VP2-kodierenden Sequenz und dem 3'-terminal anfusionierten N^{Pro}-Gen.

Plasmide basierend auf pCnC1

Plasmid	Funktion	Nukleinsäuresequenz
pCnC3 (=b)	<i>EcoRI</i> -Deletion, Einzelsubstitution stromab Motiv 1	GGGAAT <u>A</u> C
pCnC8 (b)	ORF3-Deletion Nt 9 bis 53 (Δ45 Nt)	GAATTC/ <u>ACAACAA</u>
pCnC9 (b)	ORF3-Deletion Nt 9 bis 101 (Δ93 Nt)	GAATTC/ <u>GGCGCTT</u>
pCnC10 (b)	ORF3-Deletion Nt 9 bis 257 (Δ249 Nt)	GAATTC/ <u>AAATTTT</u>
pCnC11	Einzelsubstitution Start ORF3	<u>ATA</u>
pCnC12	Einzelsubstitution Start ORF3	<u>CTG</u>
pCnC13	Einzelsubstitution Start ORF3	<u>GTG</u>
pCnC61	2 Nt-Substitution Start ORF3	<u>CTA</u>
pCnC62	3 Nt-Substitution Start ORF3	<u>TGC</u>
pCnC63	Substitution des 2. Met im ORF3 zu Cys	CGC <u>TGCAAT</u>
pCnC3	Deletion der gesamten 3'-NTR	

pCnC1 basiert auf dem pCH1 Konstrukt, mit einer Substitution des 5'-terminalen Bereiches des ORF2 durch das N^{Pro}-Gen.

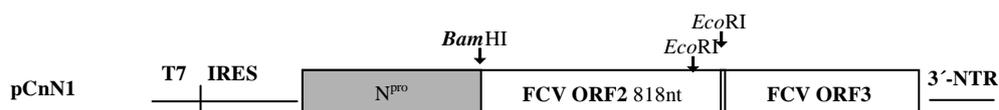


Abbildung 2.3: **Konstrukt pCnC1**

Ausschnitt aus dem pCnC1 Konstrukt, mit dem T7 Promotor-Bereich, der IRES-Region aus EMCV, und zwei überlappenden Leserastern. Das erste Leseraster kodiert für den 3'-terminalen Bereich des VP1-Proteins. Der 5'-terminale Bereich wurde durch das Gen für das N^{Pro}-Protein ersetzt. Das zweite Leseraster kodiert für das VP2 (ORF3).

Plasmide basierend auf pCnN1

Plasmid	Funktion	Nukleinsäuresequenz
pCnN3	<i>EcoRI</i> -Deletion, Einzelsubstitution stromab Motiv 1	GGGAAT <u>A</u> C
pCnN19	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1923 (84 Nt bleiben)	GGATCC/CCTCTTACT
pCnN20	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1936 (72 Nt bleiben)	GGATCC/TCCTACATG
pCnN60	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1939 (69 Nt bleiben)	GGATCC/TACATGGG
pCnN22	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1939 (66 Nt bleiben)	GGATCC/ATGGGAATT

Die Reporterkonstrukte pCnNgfp basieren auf dem pCnN3 Konstrukt. Im Gegensatz zum pCnN3 ist das zweite Leseraster fast vollständig durch das Gen, welches für GFP kodiert, ersetzt.

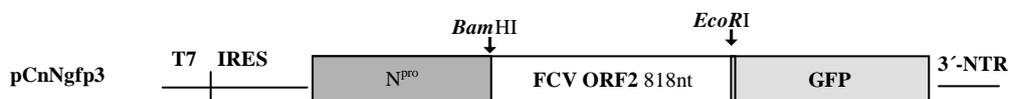


Abbildung 2.4: **Konstrukt pCnNgfp3**

Ausschnitt aus dem pCnN1 Konstrukt, mit dem T7 Promotor-Bereich, der IRES-Region aus EMCV, und zwei überlappenden Leserastern. Das erste Leseraster kodiert für das N^{Pro}/VP1-Fusionsprotein, während sich das zweite Leseraster aus den ersten 8 Nukleotiden des ORF2 und dem GFP-Gen zusammensetzt.

Plasmide basierend auf pCnNgfp3

Plasmid	Funktion	Nukleinsäuresequenz
pCnNgfp20	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1936 (72 Nt bleiben)	GGATCC/TCCTACAT
pCnNgfp60	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1939 (69 Nt bleiben)	GGATCC/TACATGGG
pCnNgfp22	ORF2-Deletion Nt 1204 bis 1939 (66 Nt bleiben)	GGATCC/ATGGGAAT

Das Konstrukt pYF21A basiert auf dem Hefe-Expressionsvektor pYES 2 (Invitrogen) und beinhaltet einen Hefe Galaktose-Promotor, dem zwei überlappende Leseraster angeschlossen sind. Das erste Leseraster kodiert für das VP1-Protein, ohne das „Leader“-Protein. Das zweite Leseraster setzt sich aus den ersten 8 Nukleotiden des ORF3, dem GFP-Gen und einem 3'-terminalen cMyc-Tag zusammen.



Abbildung 2.5: **Konstrukt pYF21A**

Ausschnitt aus dem pYF21A Konstrukt, mit dem Galaktose-Promotor, und den zwei überlappenden Leserastern für das VP1 und das VP2/GFPmyc-Fusionsprotein.

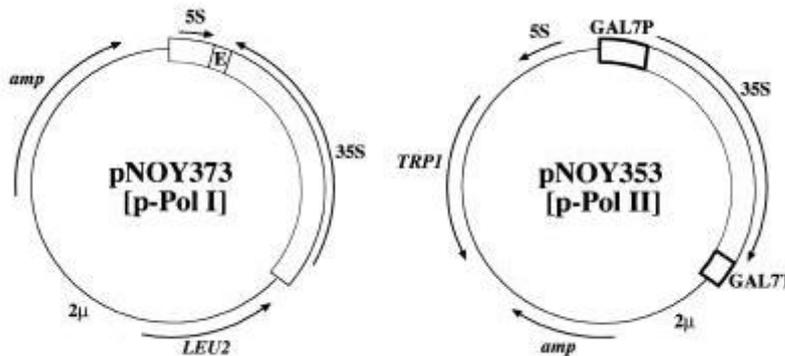
Plasmide basierend auf pYF21A

Plasmid	Funktion
pYF21H	Substitutionen im Motiv 1
pYF126	Substitutionen im Motiv 1
pYF72	4 Nt Insertion in <i>Bgl</i> III Restriktionsschnittstelle

Nukleinsäuresequenz

CATTAAAAA
 CATCCCAAT
 TTAGATTCGATCTAT

Die 18S rRNA kodierenden Plasmide pNOY373 und pNOY353 wurden von M. Nomura (Universität von Kalifornien, in Irvine, Irvine, CA) erhalten. pNOY373 ist im Hefestamm NOY908 enthalten (Wai et al., 2000). Da beim Stamm NOY908 die chromosomalen rDNA Loci deletiert sind, sichert das Konstrukt pNOY373 das Überleben dieses Stammes durch die Bereitstellung der rRNA-Gene. Das Konstrukt pNOY353 wurde für das Einbringen von veränderten 18S rRNA Sequenzen in Hefezellen verwendet.



aus (Wai et al., 2000)

Abbildung 2.6: Konstrukte pNOY373 und pNOY353

Schematische Übersicht der 35S (18S) rRNA kodierenden Plasmide pNOY373 und pNOY373.

Plasmide basierend auf pNOY353

Plasmid	Veränderte Region/"Funktion"
pNY1	Substitutionen in Helix 26
pNY2	Substitutionen in Helix 26

Nukleinsäuresequenz

GTCCCTTA
 GTGGGTTA

3. Methoden

3.1 Nukleinsäure-basierte Methoden

3.1.1 Agarosegelelektrophorese

DNA-Lösungen wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem entsprechenden Größenmarker auf 0,8–3,0%igen TAE-Agarosegelen bei 80-120 V aufgetrennt. Die Auftrennung wurde zur Bestimmung der Fragmentgrößen, der Konzentration und der Vollständigkeit einer Restriktionsenzymsspaltung, sowie zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten genutzt. Die Detektion erfolgte durch das dem Gel und Laufpuffer (1xTAE) zugegebene Ethidiumbromid (0,1 mg /ml) bei einerWellenlänge von 254 nm oder 302nm.

3.1.2 Aufreinigung von DNA

Durch Agarosegelelektrophorese gereinigte DNA-Fragmente wurden mit dem Nucleo-Spin®-Extract II Kit von Macherey-Nagel aus dem Gel nach Anweisung des Herstellers eluiert. Mit demselben Kit wurden auch Produkte der PCR-Reaktionen nach Restriktionsenzymsspaltung und Minipräparationen von Plasmid-DNA vor der Sequenzierung aufgereinigt.

3.1.3 Restriktionsenzymsspaltung

Restriktionsenzymsspaltungen wurden eingesetzt um zu überprüfen, ob DNA-Minipräparationen nach der Transformation eines Ligationsansatzes oder DNA-Midipräparationen nach einer Retransformation das gewünschte Plasmid enthielten. Zusätzlich wurde DNA mit Restriktionsenzymen für Klonierungen geschnitten. Restriktionsenzyme wurden nach Angabe des Herstellers mit dem entsprechenden Puffer in Konzentrationen von 2–40 U/Ansatz eingesetzt und bei der empfohlenen Temperatur 0,5–2 h inkubiert. Die Größen der entstandenen Fragmente und die Vollständigkeit der Reaktion wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.1.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Selbstligation von geschnittenen Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste mit Hilfe von CIAP („calf intestinal alkaline phosphatase“) entfernt. Die linearisierte DNA (0,5-2 µg) wurde mit 10x CIAP Puffer bis zu 1x Konzentration und 0,5 µl CIAP versetzt und 15-30 min bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten zur Herstellung neuer Plasmide

Die Ligation von verschiedenen DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Für die Ligation wurde generell ein Überschuss des Inserts zum Vektorfragment eingesetzt (2–5:1) und die Reaktion gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt. Ligationsansätze wurden entweder 13–20 h bei 16 °C oder 2–4 h bei 20–22 °C inkubiert, bevor sie zur Transformation kompetenter *E. coli* verwendet wurden.

3.1.6 Sequenzierung

Die Sequenz neu etablierter Konstrukte wurde mit PCR-gestützter Sequenzierung überprüft. Dazu wurde das BigDye® Terminator v.3.1 bzw. 1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Die Sequenzierreaktionen wurden gemäß der Anleitung des Kits angesetzt und im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden die Proben im ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer in Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

3.1.7 PCR

DNA-Fragmente wurden für Klonierungszwecke und vor Sequenzierreaktionen mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikation der zu sequenzierenden Bereiche wurde für Konstrukte mit der Gesamt-cDNA genutzt, da diese in Bakterien nur zu geringen Kopienanzahlen vermehrt werden und die Sequenzierreaktion an den großen Plasmiden schlechter abläuft. Die PCR-Reaktion wurde nach dem folgenden Grundprotokoll durchgeführt:

Amplifikation von Genabschnitten			PCR-gestützte Mutagenese		
95°C	3 min		95°C	3 min	
95°C	30-60 s		95°C	45 s	
50–65°C	30-60 s	30×	50–65°C	45 s	16×
72°C	45–90 s		68°C	6–12 min	
72°C	3 min		68°C	10 min	

Dabei wurde die Annealingtemperatur jeweils den benutzten Oligonukleotiden angepasst, in dem die Schmelztemperatur des zur amplifizierenden DNA komplementären Anteils des Oligonukleotids berechnet wurde. Die Elongationstemperatur wurde an die Temperaturangaben des Herstellers der Polymerase und die Elongationszeit an die Länge des Amplifikates (1 min/1 kb, Mutagenese: 2 min/1 kb) angepasst. Vor der Transformation von kompetenten *E. coli* mit DNA-Proben aus PCR-gestützter Mutagenese wurde die ursprüngliche DNA durch die Zugabe von *DpnI* gespalten.

3.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

200–400 ml YB-Medium wurden mit 2–4 ml einer *E. coli*-Kultur angeimpft und das Wachstum der Bakterien photometrisch bei 600 nm in regelmäßigen Abständen überprüft. Bei einer OD_{600} von 0,4–0,5 wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bei 5000 rpm (Minifuge 2, Rotor 3350) und 4 °C für 5 min zentrifugiert und anschließend in 20–40 ml (10 ml/100 ml Kulturmedium) TFB I aufgenommen. Sie wurden erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und in 8–16 ml (4 ml/100 ml eingesetztem Kulturmedium) TFB II resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots von 50 µl oder 200 µl bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung in den Transformationen (siehe 3.2.2) eingefroren.

3.2.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

10 µl Ligationsansatz oder 0,05–1 µg Plasmid-DNA in 0,5–1 µl Wasser wurden zu 50 µl frisch auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben, kurz gemischt und 15–45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42 °C für 2 min einem Hitzeschock unterzogen, 2 min auf Eis gekühlt und mit 200 µl YB-Medium versetzt. Die Zellen wurden 30–60 min bei 37 °C inkubiert und danach auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Um zu überprüfen, ob die Bakterien das gewünschte Plasmid enthielten, wurden die Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und damit 5 ml LB-Amp-Medium angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert und danach die Plasmide mit der in 3.2.3 beschriebenen Methode isoliert.

3.2.3 DNA-Präparation

Zu Testzwecken wurde DNA aus kleinen Bakterienkulturen mit einer Variante der alkalischen Lyse isoliert. 1,5 ml einer 5 ml LB-Amp-Kultur, die über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert worden war, wurden bei 1500×g für 5 min pelletiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden mit 100 µl MP-Lösung 1 versetzt und durch 3 min schütteln resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl MP-Lösung 2 und 5 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Proteine und die vernetzte langkettige genomische DNA durch Zusatz von 150 µl MP-Lösung 3 und 10 minütige Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugation bei 16000×g für 10 min pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 400 µl Isopropanol aus dem Überstand gefällt und bei 16000×g für 10 min pelletiert. Anschließend wurde die DNA mit 200 µl Isopropanol gewaschen, in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. Für die Präparation größerer Mengen sauberer DNA wurde das Nucleobond®AC-100 Kit oder für kleinere Maßstäbe AC-20 (Macherey-Nagel) eingesetzt. Dazu wurden 15–100 ml LB-Amp-Medium mit 25–100 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur angeimpft und 12–16 h bei 37 °C im Infors-Schüttler inkubiert. Aus dieser Kultur wurde die DNA nach dem Hersteller-Protokoll für „High Copy“

Plasmide isoliert. Die DNA-Konzentration der Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte bei 280 nm und 260 nm bestimmt, um ein Maß für die Reinheit der DNA-Präparation zu erhalten.

3.3 Zellkulturtechniken

3.3.1 Kultivierung der Zellen

Die in dieser Arbeit benutzten Zellen wurden routinemäßig in 10 cm Zellkulturschalen mit DMEM(+)-Medium bei 37 °C und 7% CO₂ gehalten. Die Zellen wurden alle 3–4 Tage gemäß ihrem Wachstum vereinzelt und umgesetzt. Dazu wurden sie zweimal mit Trypsin gewaschen und ohne Trypsin oder Medium 3 min bei 37 °C inkubiert, bis sie sich vom Boden der Schale gelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen erneut in Medium aufgenommen und von einer 10 cm Schale auf 2–3 neuen 10 cm Schalen wieder ausgesät. Für Proteinexpressionsexperimente wurden die Zellen jeweils am Vortag in 3 cm Zellkulturschalen ausgesät. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben von den Schalen gelöst und von einer 10 cm Schale auf 20–35 3 cm Schalen erneut ausgesät

3.3.2 Infektion von Zellen mit FCV

Für Infektionsversuche wurden die Zellen jeweils am Vortag frisch ausgesät. Vor der Infektion wurden die Zellen mit DMEM(–) gewaschen und anschließend Virus in DMEM(–) zugegeben. Nach 4–6 h Inkubation (37 °C, 7% CO₂) wurde das Medium gewechselt und DMEM(+) zugegeben. Die Zellen wurden erneut inkubiert und nach 16–24 h oder bei beginnendem CPE für Experimente eingesetzt.

3.3.3 Transiente Expression von Proteinen durch Vaccinia MVA T7

Proteine wurden transient in BHK-21-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden am Vortag in 3 cm Petrischalen eingesät, so dass sie am Tag der Transfektion ca. 80% konfluent waren. Die Zellen wurden mit DMEM(–) gewaschen und mit Vaccinia-MVA-T7 mit einer m.o.i von 5 in 500 µl Medium ohne FCS infiziert. Nach einer Stunde Infektionszeit bei 37 °C und 7% CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 µg DNA mit 75 µl DMEM(–), 10 µl Superfect und 600 µl DMEM(+) versetzt, um die gewünschten Expressionsplasmide in die Zellen zu transfizieren. Für eine erfolgreiche Transfektion wurden die Zellen 4 h mit dem Transfektionsmedium inkubiert und anschließend mit Markierungsmedium gewaschen, bevor sie eine Stunde zur Depletion von Cystein oder Methionin mit Markierungsmedium inkubiert wurden. Nach abermaligem Waschen mit Markierungsmedium wurden die Zellen für 14–16 h mit 500 µl Markierungsmedium mit 350 µCi ³⁵S -Methionin oder 580 µCi ³⁵S -Cystein bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert.

3.4 Arbeiten mit Hefen

3.4.1 LiAc Transformation

Hefen vom Stamm NOY908 (Wai et al., 2000) wurden über Nacht bis zu einer $oD_{600} > 1,5$ in 50 ml YPD Medium bei 30 °C unter Schütteln bei 250 rpm vermehrt. Die Übernachtskultur wurde mit YPD Medium auf eine oD_{600} von 0,2-0,3 eingestellt und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert bis zu einer oD_{600} von 0,4-0,6. Nach Zentrifugation der Hefen (50 ml) mit $1200\times g$ bei Raumtemperatur über 5 min wurden die Hefen in 40 ml sterilem TE-Puffer resuspendiert. Sie wurden dann bei $1200\times g$ für 5 min zentrifugiert und in 1,5-2 ml LiAc/0,5 \times TE resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Gemisch aus 100 μ l dieser Suspension, 1 μ g Plasmid-DNA und 0,1 mg „Carrier“-DNA wurde 600 μ l LiAc/40%PEG/1 \times TE zugefügt und 30 min bei 30 °C unter schwachem Schütteln inkubiert. Danach wurden 70 μ l DMSO zugegeben, gut vermischt, und die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C von 7-15 min ausgesetzt, und anschließend auf Eis für 2 min inkubiert. Die Hefen wurden 10 s bei 14000 rpm zentrifugiert, in 500 μ l 1 \times TE-Puffer aufgenommen und auf Mangelmediumagarplatten (SD-Agarplatten) bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert.

Auf Grund der Resistenzgene in den transformierten Plasmiden und dem Genom des Hefestammes NOY908 konnte auf Tryptophan, Uracil und Histidin selektiert werden. Über pNOY353 und dessen Derivate wird das Tryptophan produziert und über die pYES 2 basierten Konstrukte das Uracil. Der Mangel an Histidin sichert den Erhalt der chromosomalen rRNA Deletion.

3.4.2 Expression von Proteinen im Hefesystem

Die auf SD-Agarplatten gewachsenen Hefen wurden in flüssigem SD-Medium über Nacht bei 30 °C unter Schütteln bei 250 rpm angezogen. Die Übernachtskultur wurde mit SD-Medium auf eine oD_{600} von 0,2-0,3 eingestellt und bei 30°C unter Schütteln 4-8 h inkubiert. Anschließend wurde die oD_{600} bestimmt, die Hefen in mit Eis gefüllte Zentrifugenbecher überführt und mit $1200\times g$ bei 4 °C 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem H₂O resuspendiert und 5 min mit $1200\times g$ bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Hefen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 Isolierung der Gesamtproteine aus Säuger-Zellen

Die Gesamtproteine wurden aus transient exprimierenden Zellen oder Virus-infizierten Zellen gewonnen. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und bei -70 °C schockgefroren. Die Zellen wurden mit 500 µl RIP-Lösung 1 von der Petrischale gelöst und lysiert. Die Proben wurden mit 50 µl 10% SDS versetzt, 10 min bei 95 °C erhitzt und auf Eis gekühlt. Die Proben wurden anschließend 20 s beschallt und bei 45000 rpm für eine Stunde zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Für den Einsatz der denaturierten Proben in der Radioimmunopräzipitation, wurden sie durch Zugabe des 4fachen Volumens RIP-Lösung 1 verdünnt, um die Denaturierung der Antikörper zu verhindern.

3.5.2 Isolierung der Gesamtproteine aus Hefe-Zellen

Die eingefrorenen Hefezellen wurden für die Lyse mit Lysepuffer und Glasperlen (425-600 µm) versetzt, und 10 min bei 4 °C stark geschüttelt. Das Volumen des Puffers wurde so bestimmt, dass eine OD_{600} von 10/ml eingestellt wurde. Das Volumen der Glasperlen wurde dem des Puffers gleichgesetzt. Die Proben wurden mit 14000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Überstände wurden bis zur Auftrennung durch SDS-PAGE auf -20 °C gelagert.

3.5.3 Immunopräzipitation

Für den quantitativen Nachweis von Proteinen nach Expression oder Infektion, wurden diese durch Einsatz von spezifischen Antikörpern angereichert und nachgewiesen. Für die Immunopräzipitation wurden Proteine, die während ihrer Expression metabolisch radioaktiv markiert worden waren (siehe 3.3.3), eingesetzt. Dazu wurden alle zellulären Proteine in Lösung gebracht und aufgereinigt (siehe 3.5.1). Von den Proteinen wurden jeweils 100-1000 µl der gewonnenen Proben-Menge von insgesamt 2550 µl eingesetzt und mit den in 2.2 angegebenen Mengen versetzt. Antikörper und Probe wurden gemischt und je eine Stunde erst bei 37 °C und dann bei 4 °C inkubiert, bevor die an die Antikörper gebundenen Proteine durch Zugabe von fixiertem *Staph. a* [*Staphylococcus aureus* (Kessler, 1981)] gefällt wurden. Nach der Zugabe von *Staph. a* wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei mehrfach gevortext. Danach wurden die Proben mindestens 16 h bei 4 °C inkubiert, bevor sie weiter aufgereinigt wurden. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut gevortext und anschließend mit 300–500 µl RIP-Sucrose-Lösung unterschichtet. Die Aggregate aus Zielprotein, Antikörper und *Staph. a* wurden dann bei 1500×g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde für eine weitere Präzipitation eingesetzt oder entsorgt und die Proben in 700 µl RIP-Lösung 2 gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschritt des pelletierten Materials mit 700 µl RIP-Lösung 3, bevor die Proben in 10 µl RIP-Lösung 4 resuspendiert wurden. Durch Zugabe von 40 µl SDS-Probenpuffer und Inkubation für 5 min

bei 95 °C wurden die Proteine denaturiert und die Aggregate somit aufgelöst. *Staph. a* wurde dann bei 6200×g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und später durch SDS-PAGE aufgetrennt.

3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Experimente wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt. Dabei werden die Proteine zuerst im Sammelgel konzentriert und danach im Trenngel gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Zur Trennung wurden Gele mit den Maßen 160 mm × 140 mm × 1,5 mm eingesetzt. Trenngel und Sammelgel (Zusammensetzung siehe 2.10) wurden jeweils vor dem Gießen frisch angesetzt und entgast. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Das Trenngel wurde zuerst gegossen, bis ca. $\frac{3}{4}$ der Endhöhe erreicht waren und dann vorsichtig mit H₂O überschichtet, welches nach der Polymerisation wieder entfernt wurde. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde das Trenngel zweimal gewaschen, dann wurde das Sammelgel gegossen und der Kamm mit den Probenaschen eingesteckt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, wurden die Taschen zweimal mit H₂O und zweimal mit Jagow-Kathodenpuffer gewaschen. Die Proben wurden aufgetragen und bei 45–90 V für 16–20 h aufgetrennt.

Die Gele radioaktiv markierter Proben wurden anschließend in Fixierlösung mit Coomassie-Stock-Lösung (ca. 15 ml/1 l) für eine Stunde gefärbt und fixiert und dann 3 h in Entfärbelösung entfärbt. Danach wurden sie 2,5 h getrocknet, wobei sie die ersten beiden Stunden noch auf 65 °C geheizt wurden. Die getrockneten Gele wurden entweder 3-7 Tage auf einen Röntgenfilm oder über Nacht auf einer Imaging-Platte des PhosphoImagers gelegt. Für Western Blots wurden die Gele vor dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Membranen für 15–30 min in Transferpuffer äquilibriert.

3.5.5 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer mit 4 °C kaltem Wasser gekühlten Transferapparatur in Transferpuffer bei 70-100 V für 60-90 min aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

3.5.6 Immunodetektion der Proteine im Western Blot

Die Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für den Nachweis der VP2/GFPmyc-Fusionsproteine wurden die Membranen zunächst nach Angabe des Herstellers mit den Lösungen des Western Blot Signal Enhancer Kits (Pierce, USA) inkubiert. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran nach dem Transfer wurden die Membranen zuerst für 1–2 h in Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurden für das nachzuweisende Protein spezifische Antikörper in

PBS-Tween oder Blockpuffer auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dabei wurden die in 2.2 angegebenen Verdünnungen verwendet. Die Membranen wurden viermal für 15 min mit PBS-Tween gewaschen, bevor sie mit dem sekundären Antikörper für 1–2 h bei RT inkubiert wurden. Die sekundären Antikörper waren direkt mit Meerettich-Peroxidase gekoppelt, die in alkalischer Lösung mit Wasserstoffperoxid Luminol oxidieren kann, was zu einer Emission von Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda=428\text{nm}$ führt. Für diese Reaktion wurden das „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ (Pierce, USA) genutzt. Die beiden Lösungen des Kits wurden in jeweils gleichen Mengen gemischt, zum Teil mit PBS verdünnt (ca. 1:3) auf die Membran gegeben und diese für 1 min im Dunkeln inkubiert. Die Lichtemission wurde mit C-XPosurefilmen (Pierce, USA) detektiert.

4. Ergebnisse

4.1 Synthese der Kapsidproteine im transienten System

Als Grundlage für eine effiziente Bearbeitung der Fragestellung wurde zunächst untersucht, ob und unter welchen Bedingungen sich ein transientes System zur Expression der Kapsidproteine und zur Untersuchung des Mechanismus der VP2-Synthese eignet. Als Ausgangsplasmid wurde das Konstrukt pCH1 generiert, welches auf dem pCITE2a -Vektor basiert, und somit einen T7-Promotor sowie die IRES des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) beinhaltet. Diesen funktionalen Regionen schließen sich im pCH1-Konstrukt die zwei überlappenden offenen Leseraster ORF2 und ORF3 des FCV an, welche für die beiden Kapsidproteine kodieren (Abbildung 4.1).

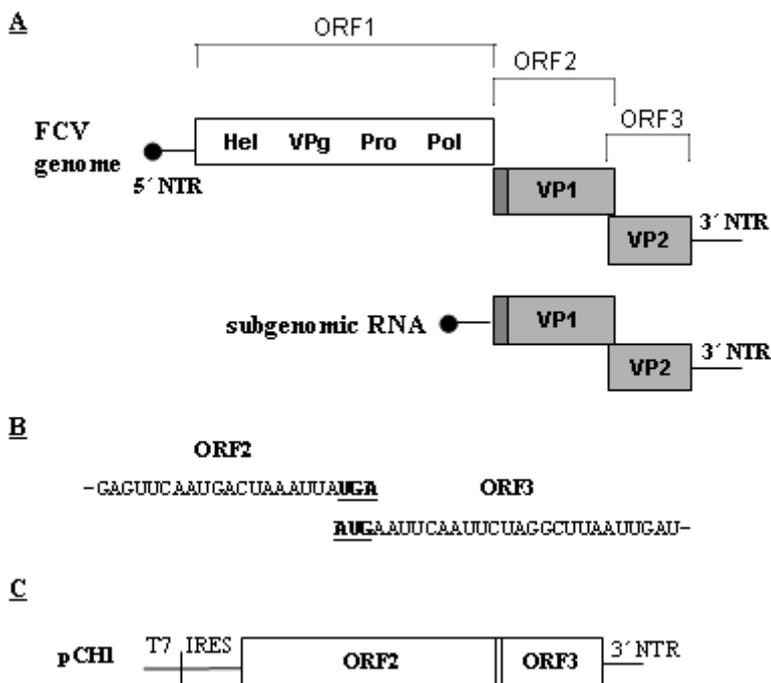


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des FCV-Genoms und des pCH1-Konstruktes

(A) Schematische Darstellung der genomischen und subgenomischen RNA des felinen Caliciviruses. Die Leseraster sind nicht proportional zu ihrer Größe wiedergegeben. Die Strukturproteine sind grau unterlegt, das am 5'-Ende kovalent gebundene VPg ist als Punkt dargestellt und die nicht translatierten Regionen als Strich. Das „Leaderprotein“ des VP1 ist dunkelgrau unterlegt. (B) Sequenzbereich der überlappenden Region von ORF2 und ORF3. (C) Ausschnitt aus dem pCH1 Konstrukt, mit dem T7 Promotor-Bereich, der IRES-Region des EMCV, und den beiden überlappenden Leserastern für die Kapsidproteine mit anschließender nicht translaterter Region.

4.1.1 Nachweis der Kapsidproteine

Für die transiente Expression der Kapsidproteine wurden Zellen mit Vaccinia-MVA-T7 infiziert, welches die T7-Polymerase zur Verfügung stellt. Anschließend wurden die Zellen mit dem pCH1-Konstrukt transfiziert, und die Proteine mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Nach der Zell-Lyse wurden die Kapsidproteine mit spezifischen Antiseren gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Um zu überprüfen, ob sich die für dieses System adaptierten BHK („baby hamster kidney“) –Zellen oder die aus dem natürlichen Wirt des FCV stammenden CRFK („Crandall Reese feline kidney“)–Zellen besser zur Untersuchung der Kapsidprotein-Synthese eignen, wurden zunächst beide Zelllinien parallel verwendet.

Bei beiden Zelltypen konnte die Synthese der beiden Kapsidproteine nachgewiesen werden (Abbildung 4.2:A;B). Eine Quantifizierung der Proteinmengen mittels Phosphorimager wies bei beiden Zelllinien ein vergleichbares Verhältnis von VP1 zu VP2 auf (circa 20:1). Jedoch zeigten die BHK-Zellen im Vergleich zu den CRFK-Zellen eine höhere Expression rate für die Kapsidproteine.

Als Kontrolle der Kapsidprotein-Synthese dienten FCV-infizierte CRFK-Zellen. Die VP2-Proteine aus infizierten Zellen komigrierten in der SDS-PAGE mit denen aus dem transienten System erhaltenen Proteinen (Abbildung 4.2:C). Das Mengenverhältnis VP1 zu VP2 bei infizierten Zellen entsprach mit ca. 18:1 in etwa dem im transienten System ermittelten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression der beiden Kapsidproteine unabhängig von weiteren Virusproteinen ist und sich das Vaccinia- MVA-T7-basierte System zum Nachweis der Kapsidproteine eignet. Da die BHK-Zellen ebenso wie die CRFK-Zellen eine Translation der Kapsidproteine zeigten, und die BHK eine höhere Expression aufwiesen, wurden im Weiteren BHK-Zellen zur Untersuchung verschiedener Mutanten des pCH1 verwendet.

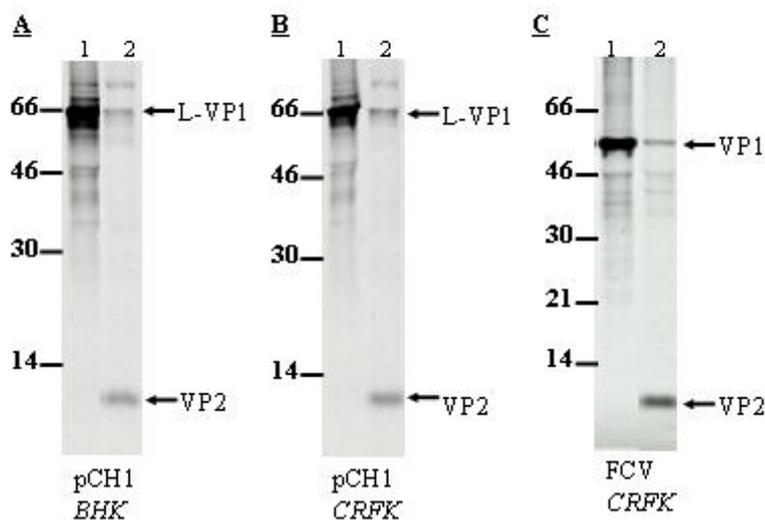


Abbildung 4.2: **Detektion der Kapsidproteine nach transienter Expression oder Infektion mit FCV**

Nach Transfektion von Vaccinia-MVA-T7 infizierten BHK-Zellen (A) oder CRFK-Zellen (B) mit dem Ausgangsplasmid pCH1, bzw. Infektion von CRFK-Zellen mit FCV (C) wurden die Kapsidproteine VP1 (1) und VP2 (2) mit spezifischen Seren gefällt. Nach der Auftrennung in SDS-PAGE wurden die Proteine mittels

Autoradiographie detektiert. Links neben den Gelausschnitten sind die Größen der Markerproteinbanden in kDa angegeben und rechts sind über Pfeile die Kapsidproteine angezeigt. L-VP1: „Leader“-VP1-Protein

4.1.2 Das Hauptkapsidprotein liegt nach Expression im transienten System als Vorläuferprotein L-VP1 vor

Bei den Vesiviren wird das Hauptkapsidprotein zunächst als Vorläuferprotein exprimiert, welches dann durch eine Protease in „Leader“-Protein und reifes Kapsidprotein gespalten wird. Das „Leader“-VP1-Proprotein des FCV hat ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 73 kDa und das reife Hauptkapsidprotein (VP1) von ca. 60 kDa. Das Hauptkapsidprotein konnte nach der Expression im transienten System, sowohl bei Verwendung der Wirtszellen CRFK als auch der BHK-Zellen, ausschließlich als Leader-Fusionsprotein detektiert werden (Abbildung 4.2:A,B). Im Vergleich dazu konnte nach Infektion von CRFK-Zellen mit dem Virus FCV fast ausschließlich das reife Kapsidprotein nachgewiesen werden (Abbildung 4.2:C). Die Spaltung des Vorläuferproteins zu „Leader“-Protein und reifem VP1-Protein wird somit über eine virale Protease vermittelt. Entsprechende Daten wurden für das FCV bereits publiziert (Sosnovtsev et al., 1998).

4.1.3 VP2 zeigt ein abweichendes Laufverhalten in der SDS-PAGE

Das kleine Kapsidprotein befindet sich, abweichend vom berechneten Molekulargewicht von 12,5 kDa, nach Auftrennung im SDS-Gel auf Höhe eines Markerproteins mit einem Molekulargewicht von circa 8 kDa. Für die Überprüfung, ob das Protein schneller als für seine Größe erwartet läuft, oder ein Teil des VP2 nach der Translation abgespalten wird, wurde ausgenutzt, dass dieses Protein Methionin jedoch kein Cystein als ³⁵S-radioaktiv markierbare Aminosäure beinhaltet. Es wurden zwei Mutanten generiert, bei denen zum Einen am N-Terminus zwischen der 2. und 3. Aminosäure des VP2 (Plasmid pCH58), zum Anderen am C-Terminus als letzte Aminosäure (Plasmid pCH59) ein Cystein eingefügt wurde (Abbildung 4.3:A). Die im transienten System exprimierten Proteine wurden mit ³⁵S-Cystein und in einem Parallelansatz mit ³⁵S-Methionin markiert. Wie zu erwarten ist das VP2-Protein ausgehend vom Wildtyp-Konstrukt nur mit der ³⁵S-Methionin-Markierung nachweisbar, jedoch nicht mit der ³⁵S-Cystein-Markierung (Abbildung 4.3:B). Da die VP2-Proteine ausgehend von den beiden Mutanten sowohl nach ³⁵S-Methionin als auch nach ³⁵S-Cystein-Markierung detektierbar waren (Abbildung 4.3:B), kann ausgeschlossen werden, dass das im Gel beobachtete Laufverhalten auf proteolytische Prozessierung zurückzuführen ist. Es könnte sein, dass das kleine Kapsidprotein auch nach der Behandlung mit SDS eine kompakte Struktur beibehält und dadurch im Gel schneller als erwartet läuft.

A

pCHI : -AUGAAUUCAAUUCUAGGCUUAAUUGAU-----UUAUCAAUUCUGUUUAAAAUUGA
pCH58 : -AUGAAUUGUUCAAUUCUAGGCUUAAUUGAU-----UUAUCAAUUCUGUUUAAAAUUGA
pCH59 : -AUGAAUUCAAUUCUAGGCUUAAUUGAU-----UUAUCAAUUCUGUUUAAAAUUGUUGA

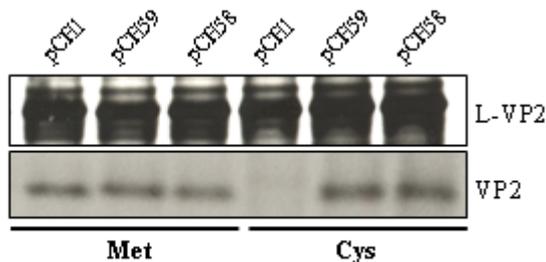
B

Abbildung 4.3: Es erfolgt keine proteolytische Prozessierung des VP2 nach der Translation

In (A) ist die Insertion eines Cysteinkodons innerhalb des ORF3 der Konstrukte pCH58 und pCH59 angezeigt. Zur Orientierung dient die pCHI Sequenz mit dem markierten Start- und Stoppkodon des ORF3. B zeigt die ausgehend von diesen Konstrukten erhaltenen Kapsidproteine nach Immunpräzipitation und SDS-PAGE.

4.1.4 Präzipitationsverhalten des VP1-Proteins

Da das VP1-Protein in geringen Mengen auch über das VP2-spezifische Antiserum gefällt wird (siehe Abbildung 4.2), wurde untersucht, ob dies auf eine Kreuzreaktivität des VP2-Antiserums zurückzuführen ist, oder das VP1-Protein unter den verwendeten Reaktionsbedingungen immer zu einem gewissen Anteil präzipitiert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden Proben eines CRFK-Zell-Lysats nach Infektion mit FCV untersucht. Dazu wurde das Lysat ohne Zugabe von Antiserum oder *Staphylococcus aureus* (*Staph. a*), nach Zugabe von *Staph. a* ohne Antiserum, oder von *Staph. a* und verschiedenen nicht für VP1-spezifischen Antiseren gemäß des Immunpräzipitations-Protokolls behandelt. Es zeigte sich, dass in allen Fällen eine geringe Menge an VP1 gefällt wurde (Abbildung 4.4). Im Vergleich zur Fällung mit dem VP1-spezifischen Serum wurden weniger als 1% des Proteins präzipitiert. Es lässt sich eine leicht höhere Menge an VP1 detektieren, wenn dem Ansatz ein Serum hinzugefügt wurde. Die beobachteten Effekte deuten darauf hin, dass das VP1-Protein vermutlich Aggregate bildet, die bei Zentrifugation sedimentieren und, dass diese Sedimentation durch das Vorhandensein von Antikörpern begünstigt wird.

In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob das VP1 durch die Immunpräzipitation quantitativ gefällt werden kann. Dazu wurde mit dem Überstand der ersten Immunpräzipitation des VP1 eine weitere VP1-spezifische Fällung durchgeführt. Der Überstand der zweiten Fällung wurde einer weiteren Antikörper-Behandlung unterzogen. In diesen Experimenten wurde festgestellt, dass zwei Fällungen für die quantitative Bestimmung der VP1-Synthese notwendig sind.

Bei den weiteren Versuchen diente das VP1 als Standard für die Transfektionseffizienz zur Normierung der Menge an exprimiertem VP2. Die Quantifizierung der präzipitierten Proteine erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers. Um die Menge an translatiertem VP2 in den verschiedenen Konstrukten unabhängig von Variationen in der Transfektionseffizienz zu

vergleichen, wurde jeweils die Menge des VP2 auf die Menge des exprimierten VP1 normiert. Die Normierung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Expression VP2} = \frac{(\text{Signalintensität VP2/Anzahl Methionine VP2})}{(\text{Signalintensität VP1/Anzahl Methionine VP1})}$$

Diese Methode der Normierung mittels des internen Standards „VP1“ war zulässig, da die in den verschiedenen Konstrukten vorgenommenen Veränderungen die für die VP1-Expression erforderlichen Kontrollstrukturen nicht betrafen und so die VP1-Expressionsrate in allen Fällen Wildtypniveau haben sollte.

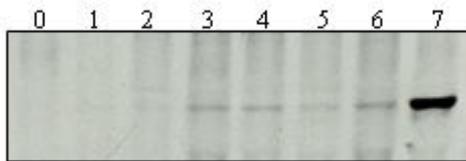


Abbildung 4.4: **Präzipitationsverhalten des VP1-Proteins**

Präzipitation des VP1-Proteins nach Infektion mit FCV. VP1 wurde über Zentrifugation (1), über *Staph. a* ohne Serum (2), mit Präimmunisierungsserum vom VP2-Antiserum (3), mit Präimmunisierungsserum vom VP1-Antiserum (4), mit dem VP2-Antiserum (5), mit einem p43-Antiserum (6) sowie mit dem VP1-spezifischen Antiserum (7) präzipitiert. Für die Fällung mit dem spezifischen Serum wurde im Vergleich zu den anderen Proben nur 1/10 des Volumens eingesetzt. Spur 0 zeigt die Präzipitation von nicht infizierten Zellen mit dem VP1-spezifischen Serum.

4.2 Bedeutung des AUG als Startkodon des ORF3 für den Mechanismus der VP2-Translation

Für die meisten Mechanismen der Translationsinitiation ist ein AUG als Startkodon essentiell oder wird zumindest bevorzugt. Es gibt jedoch auch Nachweise der Nutzung von alternativen Startkodonen. Daher wurde untersucht, welche Bedeutung dem AUG bei der Initiation der VP2-Synthese zukommt.

4.2.1 Ein AUG als Startkodon ist nicht essentiell

Um die Rolle des AUG für die VP2-Expression zu analysieren, wurde dieses Kodon ausgehend vom Konstrukt pCH1 mutiert. Zum Einen wurde das Start-AUG über Einzelsubstitutionen zu AUA, CUG oder GUG verändert, und zum Anderen über Doppel- bzw. Dreifach-Substitution zu CUA oder UGC. Die entsprechenden Plasmide wurden im transienten System in BHK-Zellen bezüglich der VP2-Expression getestet. Die resultierende Autoradiographie ist in Abbildung 4.5:A zu sehen. Bis auf die UGC-Variante zeigten alle untersuchten Startkodon-Mutanten VP2-Expression, die im Vergleich zum Wildtyp allerdings reduziert scheinen. Die Quantifizierung der Proteine ist in diesem Fall nicht einfach möglich, da durch die Veränderung des Startkodons nicht sicher ist, ob das entsprechende VP2-Protein mit einem Methionin oder der von der veränderten Sequenz kodierten Aminosäure beginnt. Je

nachdem wie die Translationsinitiation erfolgt, kann das Protein, trotz verändertem Startkodon mit einer Start-tRNA, und damit mit Methionin initiiert werden, oder die Translationsinitiation ist in diesem Fall unabhängig von der Start-t-RNA und es wird die dem kodierten tRNA Tripletts entsprechende Aminosäure verwendet. Der Unterschied ist für die Quantifizierung essentiell, da die Normierung auf die Anzahl der enthaltenen markierbaren Aminosäuren erfolgt und das Protein somit entweder zwei oder nur ein Methionin enthält. Um die Effekte auf die VP2-Synthese quantitativ untersuchen zu können, wurden die pCnC-Konstrukte generiert, die neben den Austausch im Startkodon an das 3'-Ende der für das VP2-kodierenden Region das N^{Pro}-Gen des Virus der klassischen Schweinepest als Reportersequenz fusioniert haben (Abbildung 4.5:B). Das VP2-N^{Pro}-Fusionsprotein, welches ausgehend von diesen Konstrukten synthetisiert wird, enthält 7 (bei dem UGC-Konstrukt möglicherweise 8) Cysteine zur radioaktiven Markierung. Ausgehend von diesen Konstrukten konnte nach Markierung mit ³⁵S-Cystein von allen fünf Mutanten das Fusionsprotein VP2-N^{Pro} nachgewiesen werden (Abbildung 4.5:C links). Die Einzelsubstitutions-Konstrukte zeigten Translationseffizienzen von 47% bis 57% im Vergleich zum AUG-WT-Konstrukt. Die Doppelsubstitution führte zu 35% Translationseffizienz und selbst der komplette Austausch des Tripletts durch UGC resultierte in einer Effizienz der VP2-Expression von 12% (Abbildung 4.5:D links). Somit ist ein AUG als Startkodon nicht essentiell für die Reinitiation zur VP2-Translation.

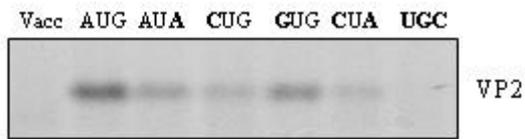
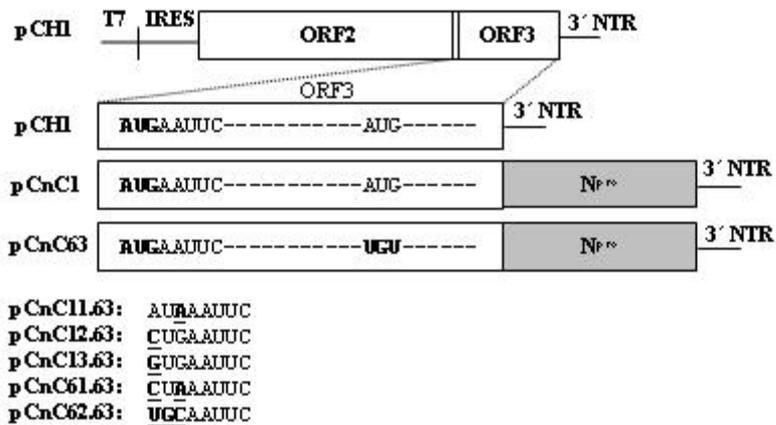
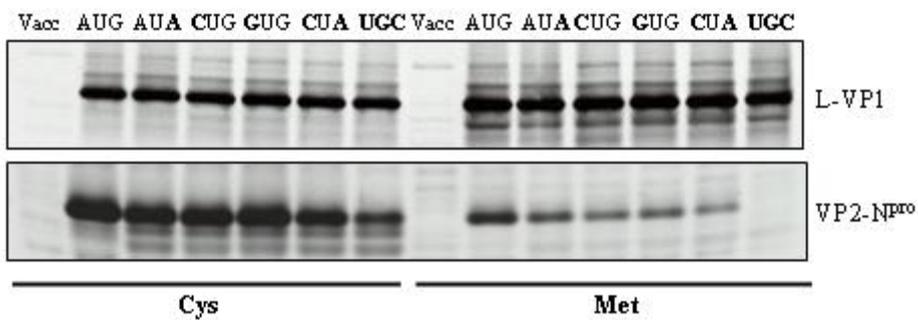
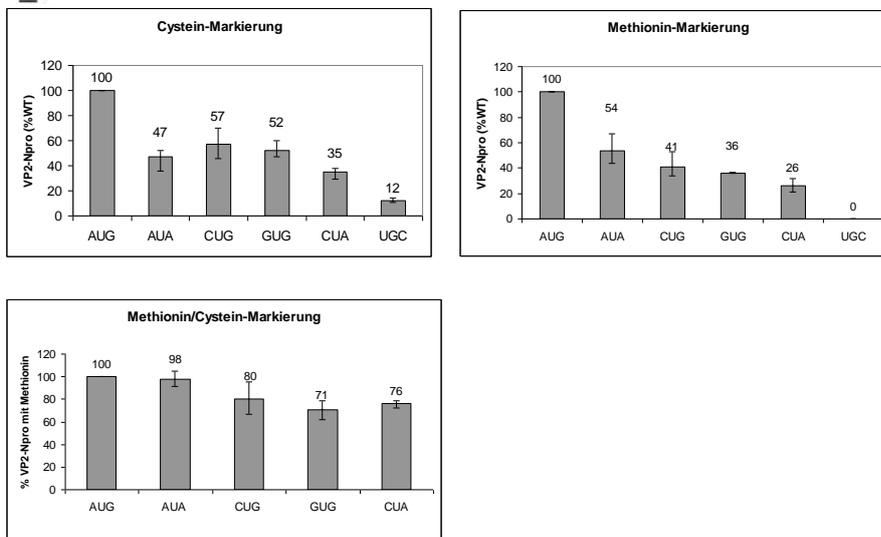
A**B****C****D**

Abbildung 4.5: Abhängigkeit der VP2-Translation vom AUG-Startkodon

A zeigt die Autoradiographie für das VP2 nach Transfektion von BHK-Zellen mit pCH-Konstrukten mit mutiertem Startkodon des ORF3. Die veränderten Startkodone sind jeweils über der entsprechenden Spur angegeben. Als Negativkontrolle diente die Infektion von Zellen mit Vaccinia-Virus-MVA-T7 ohne Plasmidtransfektion (Vacc). In B sind schematisch die pCnC-Konstrukte mit Fusion der N^{Pro}-kodierenden Sequenz an das ORF3 Leseraster, sowie die Mutation des internen Methioninkodons (Kodon #39 des VP2) im Vergleich zum pCH1 dargestellt. Des Weiteren sind die verschiedenen Mutationen im Startkodon angegeben (fett und unterstrichen). (C) Detektion der Kapsidproteine ausgehend von pCnC-basierenden Startkodon-Mutanten nach Markierung mit ³⁵S-Cystein (linker Teil) oder Methionin (rechter Teil). (D) Statistische Auswertung der VP2-Translationseffizienz nach Cystein-Markierung (links) bzw. Methionin-Markierung (rechts), relativ zur VP1-Menge als Standard für die Transfektionseffizienz. Im Diagramm darunter ist dargestellt, welcher Anteil der ausgehend von den Startkodonmutanten exprimierten Proteine mit Methionin beginnt.

4.2.2 Die VP2-Proteine, die ausgehend von einem veränderten Startkodon translatiert werden, beginnen zumeist weiterhin mit Methionin

Um zu analysieren, ob das Fusionsprotein VP2-N^{Pro} mit Methionin oder der vom veränderten Triplet kodierten Aminosäure beginnt, wurde das zweite, interne Methionin des VP2 gegen ein Cystein ausgetauscht (Abbildung 4.5:B). Das resultierende VP2-N^{Pro}-Fusionsprotein enthält kein internes Methionin, so dass nach ³⁵S-Methionin Markierung nur die Fusionsproteine detektierbar sind, die mit einem Methionin beginnen. Bei der Analyse der Expression ausgehend von diesen Konstrukten, konnte das Fusionsprotein VP2-N^{Pro} bei allen Mutanten bis auf das von der Dreifachsubstitution resultierende nachgewiesen werden (Abbildung 4.5:C rechts). Der Vergleich der Ergebnisse der Cystein- und Methionin-Markierung zeigt, dass ein Großteil der Proteine (71% bis 98%) trotz Einzel- oder Doppelsubstitution des Start-Triplets mit einem Methionin beginnen (Abbildung 4.5:D unten). Dass das VP2-N^{Pro}-Fusionsprotein ausgehend von der UGC-Variante nach Methionin-Markierung nicht nachweisbar ist, kann auf die generell niedrige Translationsrate von circa 12% (gemessen nach Cystein-Markierung) zurückzuführen sein, so dass es bei der Methionin Markierung in diesem System unter die Nachweisgrenze fällt. Obwohl die Synthese des VP2 wie gezeigt unabhängig von einem AUG als Startkodon ist, wird die Initiation zumindest hauptsächlich durch einen Initiator-tRNA^{Met}-abhängigen Mechanismus gesteuert.

4.3 Die VP2-Expression ist abhängig von der Translation des stromauf gelegenen Rasters (VP1)

Ausgehend von der Hypothese, dass das kleine Kapsidprotein beim FCV ebenso wie beim verwandten RHDV (Meyers, 2003) mittels eines Terminations/Reinitiations-Mechanismus translatiert wird, sollte die Translation des VP1 für die Expression des VP2 essentiell sein. Um dies zu untersuchen, wurde ein Konstrukt generiert, welches einen Rasterwechsel in der ORF2 Sequenz enthält. Dieser Rasterwechsel wurde über die Restriktion der BgIII-Erkennungssequenz an Position 1732-1737 des ORF2, anschließendes Auffüllen des entstandenen 5'-Überhangs mittels Klenowfragment und Religation generiert (Abbildung 4.6:A). Bei diesem Konstrukt pCH72 kommt es durch die Insertion der vier Nukleotide zu

einem Rasterwechsel, der zu einem Abbruch der VP1-Synthese 210 Nukleotide vor dem ursprünglichen Stopp führt. Somit ist hier der Transfer von Ribosomen über die Translation des VP1 hin zum Start des VP2 blockiert. Nach Expression dieses Plasmids in BHK-Zellen ist wie erwartet ein verkürztes VP1-Protein detektierbar. Es lässt sich jedoch kein VP2 nachweisen (Abbildung 4.6:B). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Ribosom durch Translation des ORF2 an die Initiationsstelle des ORF3 herangeführt werden muss, damit VP2 exprimiert werden kann.

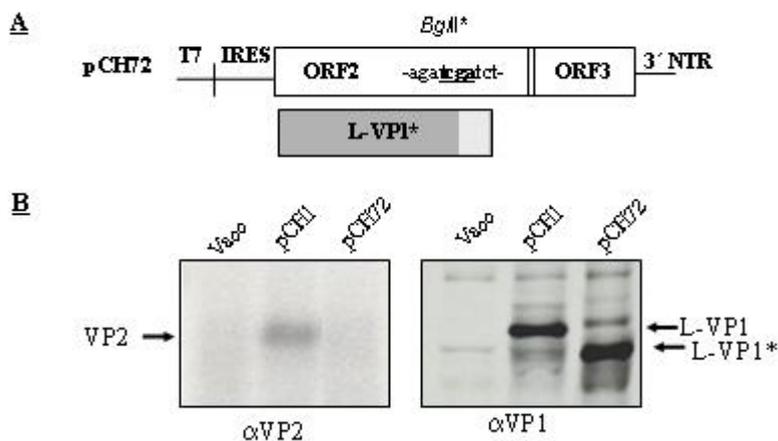


Abbildung 4.6: **Abhängigkeit der VP2-Expression von der Translation des VP1**

(A) Schematische Darstellung des Konstruktes pCH72 mit 4 Nukleotid-Insertion (fett und unterstrichen) über Restriktion und anschließendes Auffüllen der *BglII* Restriktionsschnittstelle an Position 1732-1737 des ORF2. Diese Insertion von 4 Nukleotiden führt zum Rasterwechsel und dadurch zum Abbruch der VP1-Translation 210 Nukleotide vor dem ursprünglichen Stopp. Das von diesem Konstrukt kodierte Protein L-VP1* mit durch den Rasterwechsel verändertem C-Terminus ist unter der Skizzierung des Konstruktes dargestellt. (B) Kapsidprotein-Nachweis nach Immunopräzipitation und SDS-PAGE.

4.4 Bedeutung des Terminationssignals des ORF2 für die Translation des ORF3

Für den klassischen Terminations/Reinitiations-Mechanismus ist das Stoppen der Translation des ersten Leserasters essentiell für den Start der Expression des stromab kodierten Proteins. Daher wurde im Weiteren analysiert, ob für die Initiation der VP2-Synthese das Ribosom lediglich zum Startkodon des VP2 gelangen muss, oder ob hier tatsächlich eine Termination der VP1-Translation erfolgen muss, damit es zur Initiation kommen kann.

4.4.1 Die Termination der VP1-Translation ist erforderlich für die Synthese des VP2

Um die Rolle des Terminationssignals zu untersuchen, wurde über die Fusion der beiden Leseraster ORF2 und ORF3 die Termination der VP1-Synthese an das 3'-Ende des ORF3

verschoben. Dies wurde durch Insertion eines Nukleotids kurz vor der Start/Stopregion erreicht. Bei diesen Konstrukten liegt damit das Terminationssignal weit entfernt vom Start für das VP2 und die ORF3 Sequenz bleibt unverändert. Es wurden zwei Konstrukte generiert, mit Insertion eines Cytosins, sechs (pCH17) bzw. vier (pCH18) Nukleotide vor dem ORF2 Stopp (Abbildung 4.7:A). Nach der Expression ausgehend von diesen Konstrukten wurden Immunopräzipitationen mit Antiseren sowohl gegen VP1 als auch gegen VP2 durchgeführt. Mit beiden Antiseren wurde das Fusionsprotein L-VP1-VP2 gefällt. Eine unabhängige Expression des VP2-Proteins konnte aber nicht detektiert werden (Abbildung 4.7:B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die VP2-Synthese nicht nur von der Translation des ORF2 abhängig ist, sondern ebenfalls auf die regelgerechte Termination des VP1 angewiesen zu sein scheint.

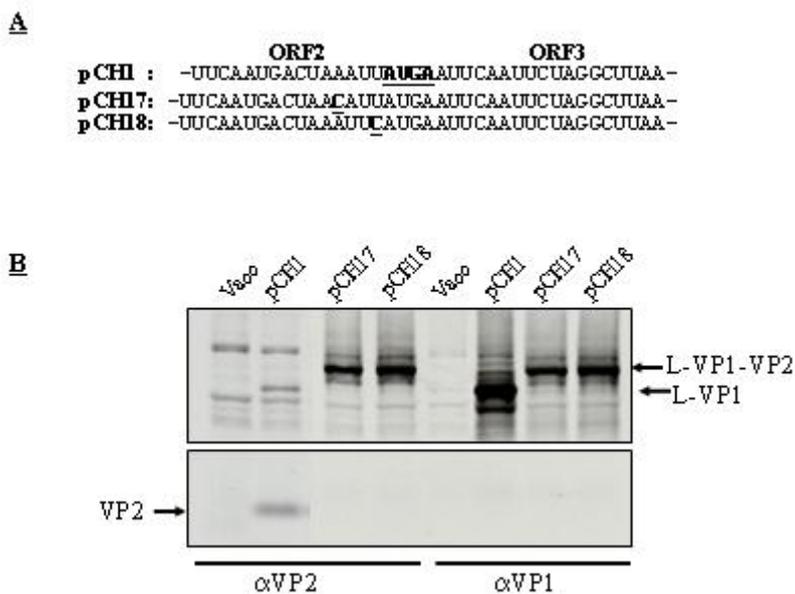


Abbildung 4.7: Ein Terminationssignal ist essentiell für die VP2-Synthese

(A) Partielle Sequenz der Fusionskonstrukte pCH17 und pCH18, bei denen die beiden Kapsidprotein-Leseraster durch Einfügen eines Nukleotids (fett und unterstrichen) verknüpft sind. Im Vergleich ist die Wildtypsequenz angegeben, mit dem überlappenden Stopp- und Startkodon markiert durch Unterstrich und fette Schrift. (B) Detektion der Kapsid- und Fusionsproteine.

4.4.2 Die Nähe des Terminationssignals des ORF2 zum ORF3 Start ist unabdingbar für die Reinitiation

Die zuvor beschriebenen Fusionskonstrukte haben gezeigt, dass eine Verlegung des Terminationssignals für die ORF2 Translation in weitere Entfernung vom ORF3 Start die VP2-Synthese blockiert. Um die Rolle des ursprünglichen Terminationssignals genauer zu untersuchen, wurde das Stoppkodon UGA durch Substitution zu UGU, UGC, oder UGG mutiert (pCH14-16, Abbildung 4.8:A). Ähnliche Experimente beim RHDV haben gezeigt, dass die Mutation des Stoppkodons eine Verringerung der VP2-Translation zur Folge hat. Im Gegensatz dazu führt die Deletion des Terminationssignals beim FCV nur zu einer geringen Verminderung der VP2-Expression auf Effizienzen von 73% bis 91% im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt (pCH14-16, Abbildung 4.8:B,C). Es befinden sich jedoch zwei weitere Terminationssignale im Leseraster des ORF2 des FCV, die nur 10 bis 12 Nukleotide bzw. 16 bis 18 Nukleotide in 3'-Richtung hinter dem ursprünglichen Stopp liegen. Da diese sich in geringer Entfernung vom VP2-Start befinden, ist es wahrscheinlich, dass sie die Funktion des ursprünglichen Terminationssignals übernehmen können. Die Termination durch die folgenden Stoppkodone könnte also die Ursache dafür sein, dass die Eliminierung des ursprünglichen Stopp-Signals keinen wesentlichen Einfluss auf die Rate der VP2-Synthese zeigt. Um dies zu überprüfen und eine Kompensation durch die folgenden Stoppkodone zu verhindern, wurden Konstrukte erstellt, bei denen diese zwei folgenden Terminationssignale zusätzlich zum ursprünglichen Stoppkodon eliminiert wurden (pCH24-pCH26, Abbildung 4.8:A). Ausgehend von diesen Dreifachmutanten konnte keine VP2-Synthese nachgewiesen werden (pCH24-pCH26, Abbildung 4.8:B,C). Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf die Veränderung der stromab gelegenen Sequenz zurückzuführen ist, wurde zusätzlich eine Mutante ohne die zwei folgenden Terminationssignale, aber mit dem ursprünglichen Stoppkodon untersucht. Dieses Konstrukt zeigte eine deutliche VP2-Expression (pCH70, Abbildung 4.8), die jedoch im Vergleich zum Wildtyp auf 42% reduziert war. Das vollständige Ausbleiben der VP2-Synthese in der Dreifach-Stopp-Mutante, ist also nicht auf das Entfernen der zwei zusätzlichen Terminationssignale zurückzuführen, auch wenn der Sequenzkontext in dieser Region eine gewisse Rolle spielt. Somit spricht alles dafür, dass das Entfernen von Terminationssignalen in der unmittelbaren Umgebung des VP1-Startsignals zum Verlust der VP2-Synthese führt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen mit veränderten Terminationssignalen zeigen, dass beim FCV ein Terminationssignal in der Nähe des Startkodons des kleinen Kapsidproteins essentiell für dessen Expression ist.

A

pCH1 : -ACUAAAUAUGAAAUCAAUUCUAGGCCUAAUUC-
pCH4 : -ACUAAAUAUGGAAUCAAUUCUAGGCCUAAUUC-
pCH5 : -ACUAAAUAUGUAAUCAAUUCUAGGCCUAAUUC-
pCH6 : -ACUAAAUAUGCAAUCAAUUCUAGGCCUAAUUC-
pCH24 : -ACUAAAUAUGGAAUCAAUUCUACGCCUAAUUC-
pCH25 : -ACUAAAUAUGUAAUCAAUUCUACGCCUAAUUC-
pCH26 : -ACUAAAUAUGCAAUCAAUUCUACGCCUAAUUC-
pCH70 : -ACUAAAUAUGAAAUCAAUUCUACGCCUAAUUC-

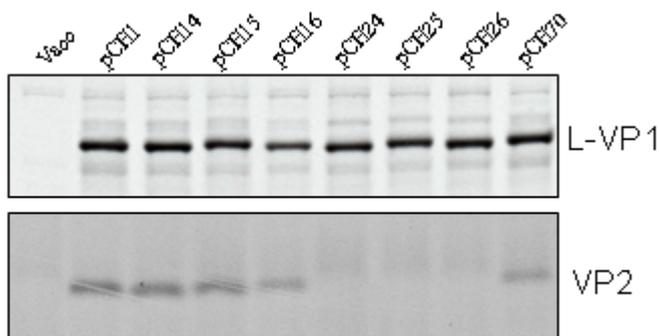
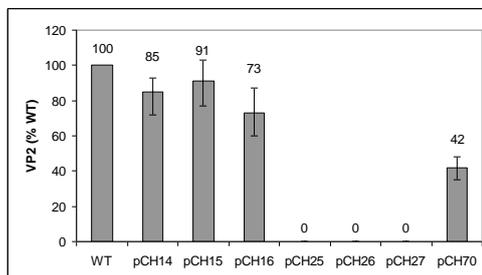
B**C**

Abbildung 4.8: Die relative Nähe des Stoppkodons des ORF2 zum Startkodon des ORF3 ist entscheidend für dessen Translation

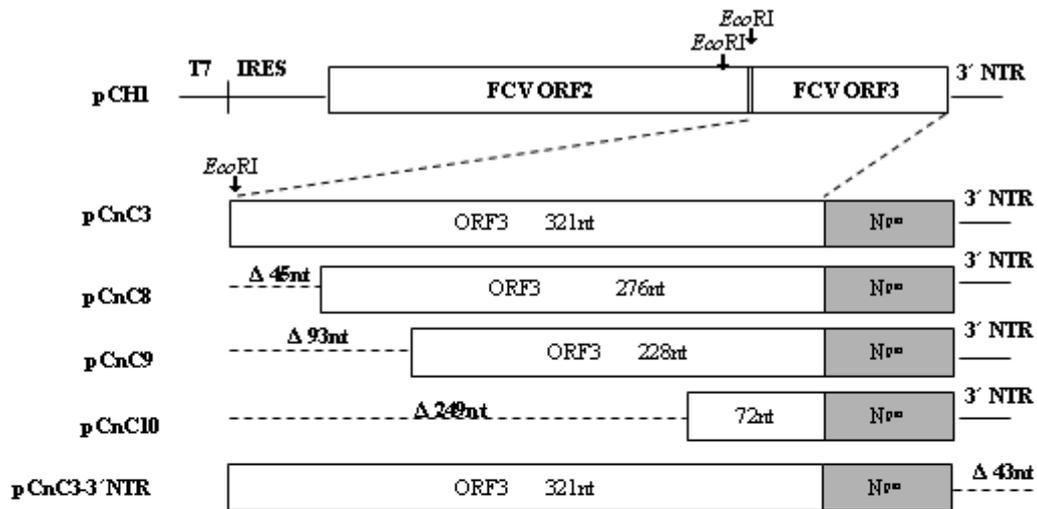
(A) Lokalisierung der Stoppkodone im Leseraster des ORF2 in der Nähe des ORF3 Startkodons, markiert durch einen Unterstrich. Analog dazu sind die Sequenzen der Konstrukte mit Mutationen innerhalb der Stoppkodone in fett dargestellt. (B) Nachweis der Kapsidproteine. (C) Quantifizierung der VP2-Translationseffizienz.

4.5 Die von der Start/Stopregion in 3'-Richtung gelegene Sequenz ist nicht essentiell für die Translation des VP2

Neben der Start/Stopregion könnten dazu benachbarte Sequenzen eine Rolle für den Translationsmechanismus spielen. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst unterschiedliche Deletionen stromab von der Start/Stopregion, im 5'-terminalen Bereich der ORF3 kodierenden Sequenz, eingeführt. Es wurden drei Konstrukte generiert, die ausgehend von der *EcoRI*- Schnittstelle am 5'-Ende des ORF3 Deletionen von 45, 93 und 249 Nukleotiden in den VP2-kodierenden Bereich tragen. Die Deletionen von 93 und 249 Nukleotiden führten dazu, dass die kodierten VP2-Proteine nicht mehr detektiert werden konnten, da diese stark verkürzten Proteine vermutlich von dem verwendeten VP2-spezifischen Antiserum nicht mehr erkannt werden. Für eine vergleichbare Analyse aller ORF3 Deletionskonstrukte wurden deshalb ebenfalls VP2-N^{Pro}-Fusionsprotein kodierende Plasmide erstellt. Diese enthalten im Anschluß an die ORF3-Sequenz im gleichen Raster die Sequenz, die für N^{Pro} aus CSFV („classical swine fever virus“) kodiert (Abbildung 4.9:A). Ausgehend von diesen Konstrukten konnten die VP2-N^{Pro}-Fusionsproteine für alle drei unterschiedlichen Deletionen nachgewiesen werden (Abbildung 4.9:B). Die Analysen der verschiedenen Deletionsmutanten in der ORF3-Sequenz wiesen keinen einheitlichen Trend auf. So zeigten die Deletionen von 45 und 249 Nukleotiden eine Erhöhung der Translationseffizienz für das Fusionsprotein im Vergleich zum entsprechenden Konstrukt pCnC1 mit der gesamten ORF3/N^{Pro}-Sequenz, wohingegen die Deletion von 93 Nukleotiden zu einer Verringerung führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Sequenz des ORF3, die sich der Start/Stopregion anschließt, nicht essentiell für die Translation des von ORF3 kodierten Proteins ist. Die sehr unterschiedlichen Effekte, die verschiedene Deletionen auf die Translation haben, zeigen jedoch auch, dass es Einflüsse durch die stromab gelegene Sequenz gibt.

Des Weiteren wurde getestet, ob die 3'-NTR Region eine Rolle für die VP2-Translation spielt. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt ausgehend vom pCnC3 erstellt, bei dem diese Region komplett deletiert wurde. Die VP2-Translationseffizienz, die für diese Mutante ermittelt wurde, weicht kaum vom Wildtyplevel ab. Somit kommt auch dieser Region zumindest keine wichtige Funktion bei dem Mechanismus der VP2-Translation zu.

A



B

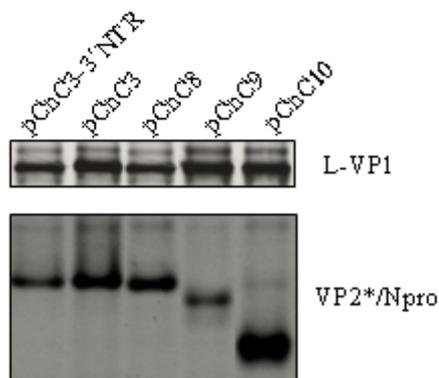


Abbildung 4.9: Bedeutung der in 3'-Richtung vom ORF3 Start gelegenen Sequenzen

(A) Schematische Darstellung der pCnC-Konstrukte, mit Deletionen innerhalb des ORF3 und Fusion des Gens für N^{Pro} an die ORF3 Sequenz. Die in der Wildtypsequenz an Position -61 relativ zum 3'-Ende des ORF2 lokalisierte *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle wurde im Konstrukt pCnC3 durch Mutation deletiert, um die stromab der Start/Stoppstelle lokalisierte *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle für die Generierung der Deletionsmutanten zu ermöglichen. Die Deletionen beginnen demnach jeweils nach Nukleotid 8 des ORF3. Des Weiteren ist das Konstrukt pCnC3-3'-NTR dargestellt, welches die komplette ORF3 Sequenz beinhaltet, jedoch eine Deletion der gesamten 3'-terminalen nicht translatierten Region (3'-NTR) (B) Detektion der unterschiedlichen VP2/N^{Pro}-Fusionsproteine sowie der L-VP1-Proteine.

4.6 Die vor der Start/Stopregion gelegene Sequenz ist essentiell für die Translation des VP2

Für das verwandte RHD-Virus wurde gezeigt, dass für die Translation des kleinen Kapsidproteins eine vor der Start/Stopregion gelegene Sequenz essentiell ist (Meyers, 2003). Daraus ergab sich die Frage, ob beim FCV ein vergleichbarer Mechanismus vorliegt und Regionen im ORF2 hier ebenfalls eine Rolle für die VP2-Translation spielen.

4.6.1 Eine Sequenz von circa 70 Nukleotiden stromauf von der Start/Stopregion ist essentiell für die VP2-Expression

Um die Rolle von stromauf gelegenen Sequenzen zu überprüfen, wurden verschiedene Konstrukte generiert, die Deletionen in der 3'-Region des ORF2 enthalten. In einem ersten Satz von Konstrukten wurden Deletionen unterschiedlicher Länge eingeführt, die ausgehend von der an Position 1198 bis 1203 der ORF2-Sequenz gelegenen *Bam*HI-Erkennungssequenz generiert wurden. Somit blieben bei dieser Konstruktsreihe die ersten 1203 Nukleotide des ORF2 5'-Endes erhalten (Abbildung 4.10:A). Die sich anschließenden Deletionen umfassten 312, 606, 699, 720 oder 747 Nukleotide, so dass entsprechend 492, 198, 105, 84 oder 57 Nukleotide des ORF2 3'-Endes erhalten blieben. Eine Synthese des VP2-Proteins konnte nur für die Konstrukte der Serie nachgewiesen werden, die mehr als 57 Nukleotide der 3'-terminalen Sequenz enthalten (Abbildung 4.10:A). Diese Ergebnisse zeigen, dass Teile der ORF2 Sequenz für die ORF3 Translation unabdingbar und die letzten 57 Nukleotide der Sequenz nicht ausreichend sind.

Um die essentielle Region genauer einzugrenzen, wurde ein weiterer Satz von Deletionsmutanten generiert (pCnN). Bei diesen Konstrukten wurden die am 5'-Ende des ORF2 gelegenen 1203 Nukleotide durch das CSFV N^{Pro}-Gen ersetzt, da die Präzipitation mittels des VP1-spezifischen Serums durch die Verkürzung erschwert wurde. Die Fällungen der N^{Pro}/VP1-Proteine erfolgten ausgehend von den pCnN-Konstrukten via Antiseren, die spezifisch für das N^{Pro}-Protein sind. Zur Eingrenzung der essentiellen Region wurden bei dieser Konstruktsreihe hinter der N^{Pro}-Sequenz noch 84, 72, 69 oder 66 Nukleotide vom 3'-Ende des ORF2 erhalten (Abbildung 4.10:B). Konstrukte mit mindestens 72 Nukleotiden des ORF2 3'-Endes zeigten kaum verminderte VP2-Expression mit 75% bis 78% im Vergleich zum pCnN1-Konstrukt, welches die 818 Nukleotide ausgehend von der *Bam*HI-Schnittstelle des ORF2 3'-Endes beinhaltet. Wenn lediglich 69 Nukleotide vorhanden waren, sank die Translationseffizienz auf 30% und eine weitere Reduktion um 3 Basen auf 66 Nukleotide des ORF2 3'-Endes führte zu einem Verlust der VP2-Synthese (Abbildung 4.10:C,D). Zusammen genommen zeigen diese Ergebnisse, dass das FCV für die Synthese des minoren Kapsidproteins über Termination/Reinitiation eine stromauf vom Start gelegene essentielle Region von circa 70 Nukleotiden benötigt. Diese Besonderheit zu den allgemeinen Anforderungen an Terminations/Reinitiations-Mechanismen findet sich auch beim verwandten RHDV. Diese Region wurde daher analog zur entsprechenden Sequenz beim RHDV als „termination upstream ribosomal binding site“ (TURBS) bezeichnet. Die Namensgebung ergibt sich aus der Hypothese, dass eine Funktion dieser essentiellen Region darin bestehen könnte, das Ribosom nach der Termination der VP1-Translation festzuhalten.

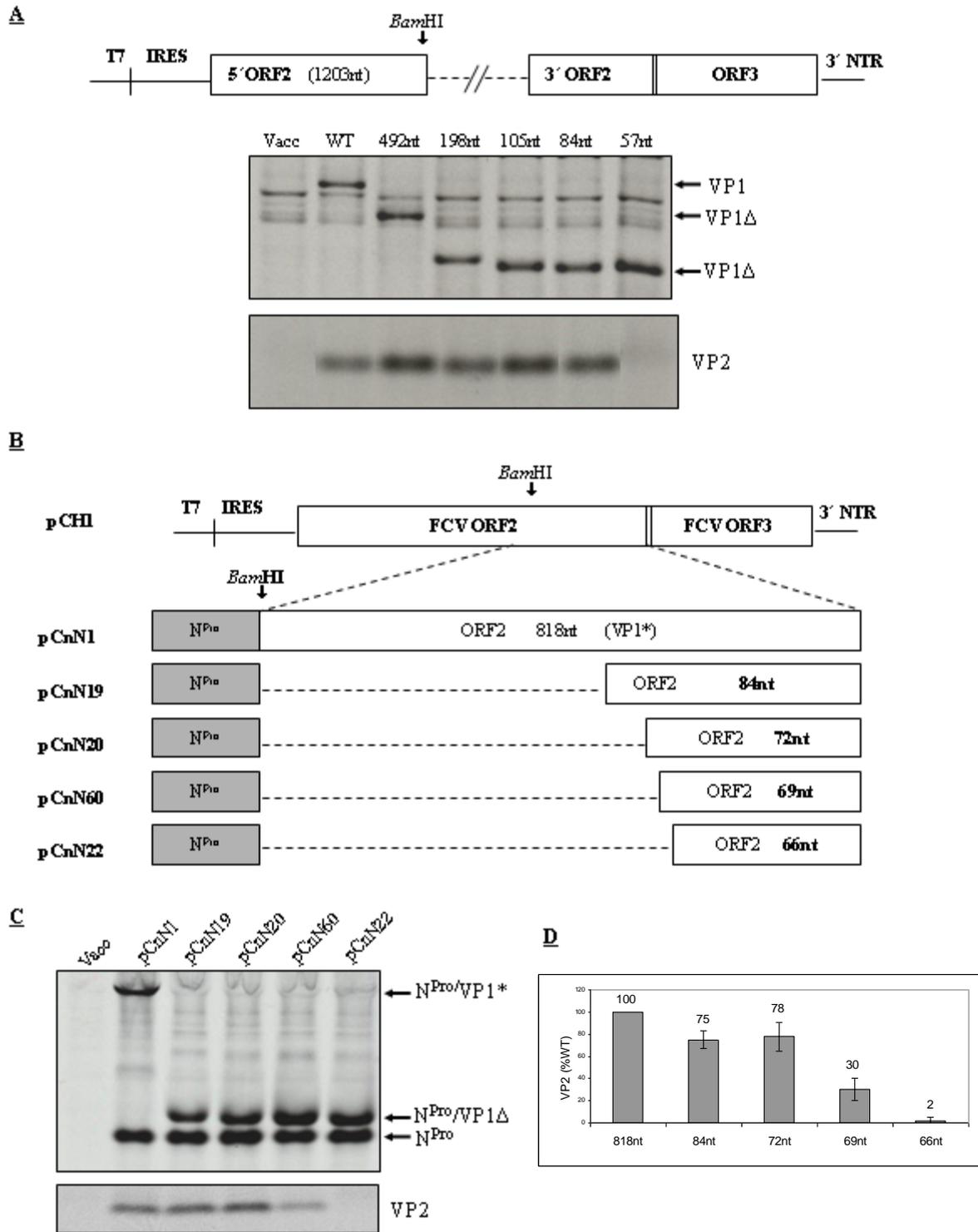


Abbildung 4.10: Circa 70 Nukleotide stromauf von der Start/Stopregion sind essentiell für die VP2-Translation

In A ist die Lokalisation der eingeführten Deletionen im ORF2 des pCHI Konstruktes gekennzeichnet. Darunter sind die Ergebnisse der Autoradiographie nach Expression und Präzipitation der Proteine ausgehend von dieser Konstrukterserie gezeigt, wobei über den entsprechenden Spuren die Anzahl der Nukleotide angegeben ist, die vom 3'-Ende des ORF2 erhalten blieben. (B) Überblick über die Deletionen innerhalb des 3'-terminalen

Bereiches des ORF2 der pCnN-Konstrukte, mit einer Substitution des 5'-terminalen Bereichs des ORF2 durch das N^{Pro}-Gen. (C) Detektion der ausgehend von den in B aufgeführten Konstrukten exprimierten Proteine. Durch die Autoproteaseaktivität des N^{Pro}-Proteins sind sowohl die N^{Pro}/VP1-Fusionsproteine als auch das abgespaltene N^{Pro}-Protein nachweisbar. Ebenso konnte das minore Kapsidprotein ausgehend von den meisten Mutanten detektiert werden. (D) Quantifizierung der Menge an exprimiertem VP2 relativ zu den von der N^{Pro} /ORF2-Sequenz translatierten Proteinen.

4.6.2 Die TURBS-Region allein vermittelt die Reinitiation nach Termination

Im Weiteren wurde getestet, ob die TURBS-Region alleine eine Reinitiation nach Termination vermitteln kann oder weitere Elemente notwendig sind. Zu diesem Zweck wurde die TURBS-Region des FCV zwischen zwei Reportergene inseriert. Bei den resultierenden pCnNgfp-Konstrukten ist als erstes Leseraster das N^{Pro}-Gen aus CSFV enthalten, und als stromab gelegenes Leseraster das Gen, welches für GFP („green fluorescent protein“) kodiert (Abbildung 4.11:A). Diese beiden Leseraster überlappen mittels der zwischengeschalteten TURBS-Region. Bei dem Kontrollkonstrukt pCnNgfp3 wurden 818 Nukleotide des FCV ORF2 inseriert, und bei weiteren Konstrukten wurden 72, 69 oder 66 Nukleotide des ORF2 3'-Endes an das N^{Pro}-Gen fusioniert. Diese Konstrukte, die die TURBS-Region enthalten, zeigten eine Translation des zweiten Leserasters (GFP) (Abbildung 4.11:B). Die Translationseffizienz der verschiedenen Konstrukte ist vergleichbar mit den Ergebnissen, die für die unter 4.6.1 beschriebenen Deletionsmutanten erhalten wurden (Abbildung 4.11:C, 4.10:D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die TURBS-Region mit circa 70 Nukleotiden alle Elemente enthält, die eine Reinitiation nach Termination vermitteln können.

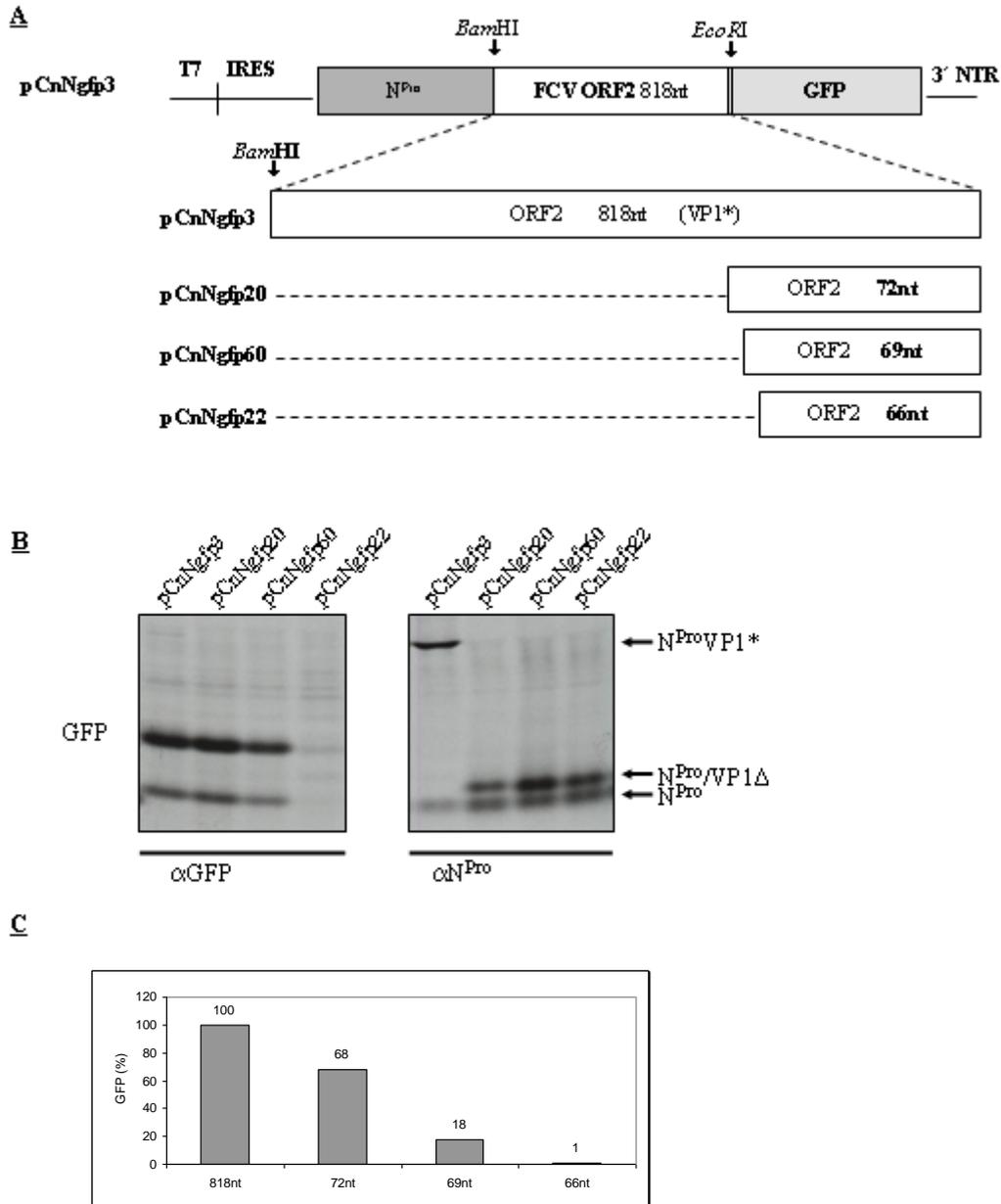


Abbildung 4.11: Die TURBS-Region allein kann eine Reinitiation vermitteln

In A ist eine schematische Übersicht über die pCnNgfp-Konstrukte gegeben. Als Ausgangsplasmid diente das Konstrukt pCnNgfp3, bei dem die in der Wildtypsequenz an Position -61 relativ zum 3'-Ende des ORF2 lokalisierte *EcoRI* Restriktionsschnittstelle durch Mutation deletiert wurde, um die stromab der Start/Stoppstelle lokalisierte *EcoRI* Restriktionsschnittstelle für Fusion des GFP-Gens zu nutzen. Somit enthalten diese Konstrukte zwei Reportergene. Das erste Leseraster kodiert für N^{Pro} und das zweite Leseraster für GFP. Es blieben ausgehend von der FCV-RNA verschiedene lange Fragmente aus der TURBS-Region erhalten, sowie die überlappende Start/Stoppreion und die ersten 8 Nukleotide des ORF3. (B) Detektion des N^{Pro}- bzw. GFP-Proteins. GFP unterliegt zum Teil einer Prozessierung in den Zellen, so dass 2 Banden durch das GFP spezifische Serum detektiert wurden. (C) Quantifizierung der Synthese des GFP- Proteins im Verhältnis zum N^{Pro}-Protein. Das Konstrukt mit 818 Nukleotiden des ORF2 wurde als 100% gesetzt.

4.7 Charakterisierung der TURBS-Region

Die vorab beschriebenen Ergebnisse definieren die 3'-terminalen ca. 70 Nukleotide des ORF2 als TURBS. Das Signal für die Reinitiation könnte entweder ein kontinuierliches Element darstellen oder aus mehreren individuellen Oligonukleotid-Sequenzen bestehen, welche durch für die Reinitiation nicht essentielle Regionen voneinander getrennt sind. Im Weiteren sollte analysiert werden, aus welchen funktionalen Elementen sich die TURBS zusammensetzt.

4.7.1 Zwei Regionen innerhalb der TURBS sind unabdingbar für die VP2-Synthese

Um zu unterscheiden, ob die TURBS ein einzelnes Element darstellt oder sich aus mehreren Elementen zusammensetzt, wurde eine Serie von Konstrukten generiert, bei denen an verschiedenen Positionen innerhalb der letzten 90 Nukleotide des ORF2 12 Nukleotide deletiert wurden (Abbildung 4.12:A). Im Gegensatz zu einer Deletion von 12 Nukleotiden stromauf der TURBS (pCH49) zeigten alle Deletionsmutanten dieser Serie verminderte VP2-Expressionslevel (Abbildung 4.12:B,C). Zwei der 12-Nukleotid-Deletionen in der Mitte der TURBS (Nukleotide -54 bis -31 vor dem ORF2 3'-Ende) zeigten Translationseffizienzen von 44% bis 52% des Wildtyplevels, wohingegen die benachbarten Deletionen stromauf und stromab dieser zentralen Region zu fast völligem Verlust der VP2-Expression führten (Nukleotide -78 bis -55, und -30 bis -7). Es lassen sich auf Grund der Ergebnisse, die mit den 12-Nukleotid-Deletionen erhalten wurden, also zwei Regionen von 24 Nukleotiden innerhalb der TURBS detektieren, die essentiell für die VP2-Synthese sind.

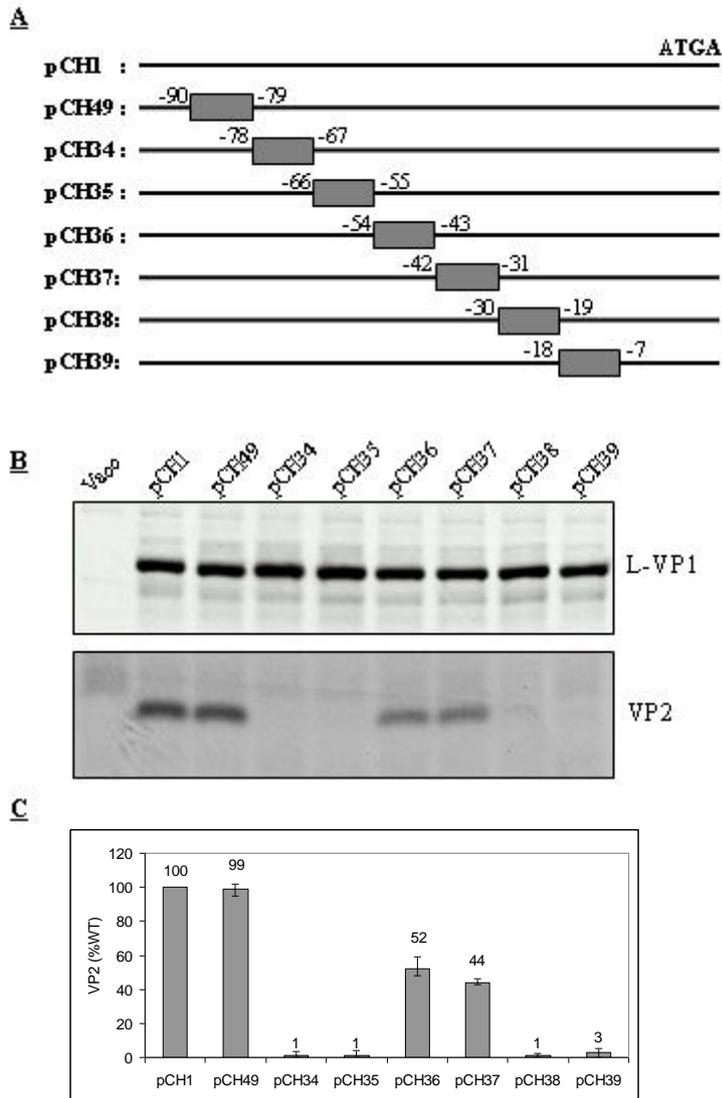


Abbildung 4.12: 12-Nukleotid-Deletionen innerhalb der TURBS

(A) Übersicht über die Positionen der 12-Nukleotid-Deletionen innerhalb der 3'-terminalen Region des ORF2. In B ist die Detektion der Kapsidproteine dargestellt, und in C die entsprechende Quantifizierung der VP2-Translation. Die Werte wurden wie zuvor beschrieben mittels der Resultate für L-VP1 normiert und beim Wildtypkonstrukt pCH1 auf 100% gesetzt.

Um diese beiden essentiellen, jeweils 24 Nukleotide umfassenden, Regionen weiter einzugrenzen, wurde ein Satz von Konstrukten mit 3-Nukleotid-Deletionen innerhalb dieser beiden Bereiche erstellt (Abbildung 4.13:A). Bei Betrachtung der 3-Nukleotid-Deletionen, die innerhalb der ersten essentiellen Region liegen (Nukleotid -55 bis -75), zeigten sich deutliche Unterschiede in der Translationseffizienz des VP2 (Abbildung 4.13:B, C links). Die beiden äußeren Deletionen in dieser Region hatten kaum einen Effekt auf die VP2-Synthese (91% bzw. 81%). Die meisten Deletionen innerhalb der Region führten zu einer Translationseffizienz, die nur circa die Hälfte des Wildtypniveaus erreicht. Besonders auffällig war allerdings der Effekt, der durch die beiden benachbarten 3-Nukleotid-Deletionen in den Bereichen -66 bis -64 (pCH40) und -63 bis -61 (pCH41) entstand, da es hier zu einem

4. Ergebnisse

fast vollständigen Verlust der VP2-Synthese kam. Auch die benachbarte 3-Nukleotid-Deletion von -69 bis -67 (pCH53) zeigte noch einen deutlichen Effekt mit einer Translationseffizienz von nur 22% im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 4.13:B, C links). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Motiv aus 6 Nukleotiden in diesem Bereich unabdingbar für die VP2-Synthese ist, während die angrenzenden Bereiche zwar wichtig aber nicht essentiell sind.

Innerhalb der zweiten essentiellen Region von Nukleotid -30 bis -7 hatten die ersten beiden 3-Nukleotid-Deletionen (pCH54, pCH55) keinen negativen Einfluss auf die ORF3 Translation (Abbildung 4.13:B, C rechts). 3-Nukleotid-Deletionen innerhalb der Region -18 bis -4 reduzierten die VP2-Synthese auf Werte von 43% bis 63%. Auch in dieser Region zeigten zwei Deletionsmutanten eine drastische Reduktion der ORF3 Translation auf 7% bzw. 11% (Nukleotide -24 bis -22 bzw. -21 bis -19). Somit konnten 2 Motive von je 6 Nukleotiden innerhalb der TURBS identifiziert werden, die absolut essentiell für die ORF3 Translation sind (Motiv 1: Nukleotide -66 bis -61, und Motiv 2: -24 bis -19).

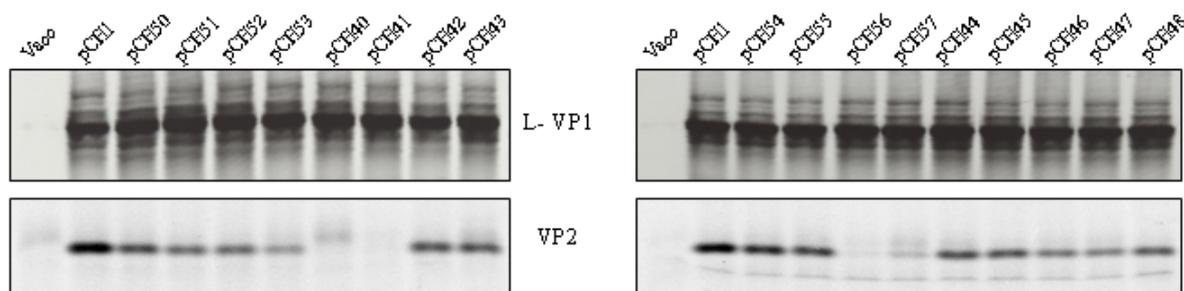
A

-80 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10 -1
 -UUACUGCCUCCUACAUGGGAAUUCAAUUGGCAAAGAUUCGGCUUGCCUCAAACAUUAGGAGUUCAAUGACUAAAUUUAUGA-

pCH1 : -CUUACUGCCUCCUACAUGGGAAUUCAAUUGGCAA-
pCH50 : -CUU GCCUCCUACAUGGGAAUUCAAUUGGCAA-
pCH51 : -CUUACU UCCUACAUGGGAAUUCAAUUGGCAA-
pCH52 : -CUUACUGCC UACAUGGGAAUUCAAUUGGCAA-
pCH53 : -CUUACUGCCUCC AUGGGAAUUCAAUUGGCAA-
pCH40 : -CUUACUGCCUCCUAC GGAAUUCAAUUGGCAA-
pCH41 : -CUUACUGCCUCCUACAUG AUUCAAUUGGCAA-
pCH42 : -CUUACUGCCUCCUACAUGGA CAUUGGCAA-
pCH43 : -CUUACUGCCUCCUACAUGGGAAU UUGGCAA-

pCH1 : -UGCCUCAAACAUUAGGAGUUCAAUGACUAAAUUUAUGA-
pCH54 : -UGCCUCA AUUAGGAGUUCAAUGACUAAAUUUAUGA-
pCH55 : -UGCCUCAAA C AGGAGUUCAAUGACUAAAUUUAUGA-
pCH56 : -UGCCUCAAA CAU AGUUCAAUGACUAAAUUUAUGA-
pCH57 : -UGCCUCAAA CAU UAGG UCA AUGACUAAAUUUAUGA-
pCH44 : -UGCCUCAAA CAU UAGGAGU AUGACUAAAUUUAUGA-
pCH45 : -UGCCUCAAA CAU UAGGAGU UCA ACUAAAUUUAUGA-
pCH46 : -UGCCUCAAA CAU UAGGAGU UCA AUG AAAUUUAUGA-
pCH47 : -UGCCUCAAA CAU UAGGAGU UCA AUG CU AAAUUUAUGA-
pCH48 : -UGCCUCAAA CAU UAGGAGU UCA AUG CU AAA UGA-

B



C

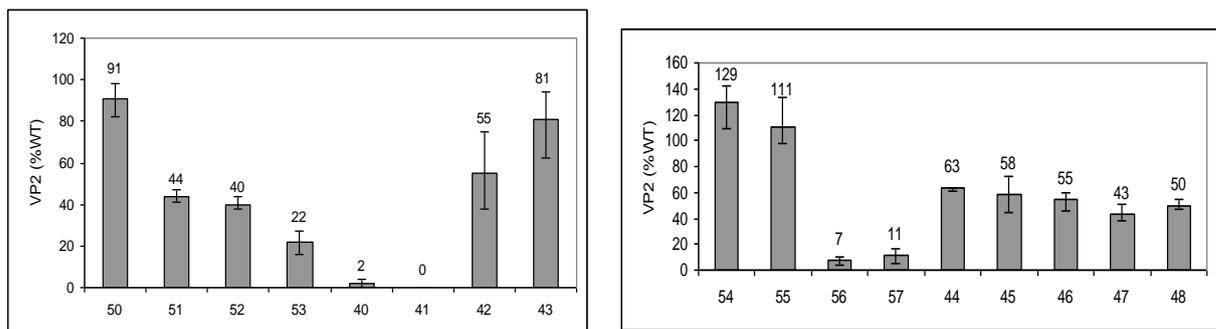


Abbildung 4.13: Detektion von 2 essentiellen Motiven innerhalb der „TURBS“ mittels 3 Nukleotid Deletionen

(A) Im oberen Bereich sind die letzten 80 Nukleotide des ORF2 dargestellt, innerhalb derer die beiden essentiellen Bereiche von je 24 Nukleotiden, welche durch die 12-Nukleotid-Deletionen bestimmt wurden, hervorgehoben sind. Die Start/Stoppreion ist durch Unterstrich markiert. Darunter sind die Positionen der 3-Nukleotid-Deletionen für diese beiden Bereiche gezeigt. (B,C) Auf der linken Seite sind die Ergebnisse zu den 3-Nukleotid-Deletionen der Region von Nukleotid -78 bis -67 dargestellt, auf der rechten Seite die Ergebnisse zur Region von Nukleotid -30 bis -7. In den Diagrammen sind auf der X-Achse die Nummern der pCH-Konstrukte angegeben.

4.7.2 Der Abstand zwischen den beiden essentiellen Motiven kann variiert werden

Deletionen, die die beiden neu entdeckten Motive betrafen, führten zum fast vollständigen Erliegen der VP2-Synthese. Der Bereich zwischen den beiden Motiven ist dagegen nicht essentiell, da 12-Nukleotid-Deletionen in diesem Abschnitt noch ca. die Hälfte der Translationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp zeigten (siehe Abbildung 4.12). Mit weiteren Deletionsmutanten wurde die Rolle, die der Abstand zwischen den beiden essentiellen Motiven in der TURBS spielt, untersucht. Dazu wurden in dieser Region mittig 12, 18, 24, 30 und 36 Nukleotide deletiert (Abbildung 4.14:A). Die verschiedenen Deletionen hatten keinen einheitlichen Effekt auf die Translationseffizienz des ORF3. So führte die Deletion von 36 Nukleotiden (pCH75) nahezu zum Verlust der ORF3 Translation, wohingegen bei den kleineren Deletionen in allen Fällen VP2-Expression nachweisbar war (Abbildung 4.14:B, C). Die Deletionen von 12 Nukleotiden bzw. von 18 Nukleotiden führten zu Translationseffizienzen von 27% bzw. 58% im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletionen von 24 Nukleotiden und von 30 Nukleotiden zeigten dagegen nur eine geringe oder keine Verminderung der VP2-Synthese. Die Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass ein definierter Abstand zwischen den beiden Motiven für ihre Funktion im Rahmen der Reinitiation nicht essentiell ist. Lediglich das Konstrukt, das beide Motive direkt aneinanderfügt, zeigt kaum VP2-Synthese. Ein Vergleich der Translationseffizienzen der drei Konstrukte mit 12-Nukleotid-Deletionen pCH73 (Abbildung 4.14), pCH36 und pCH37 (Abbildung 4.12) zeigte außerdem, dass nicht die Größe der Deletion, sondern die Lage innerhalb der Sequenz eine Rolle spielt, da die Translationseffizienzen hier je nach Lage von 27% bis 52% variieren. Somit ist weder die Sequenz an sich noch der Abstand zwischen den beiden Motiven von Bedeutung, sondern es müssen vermutlich bestimmte Anforderungen an die Sekundärstruktur erfüllt werden.

4. Ergebnisse

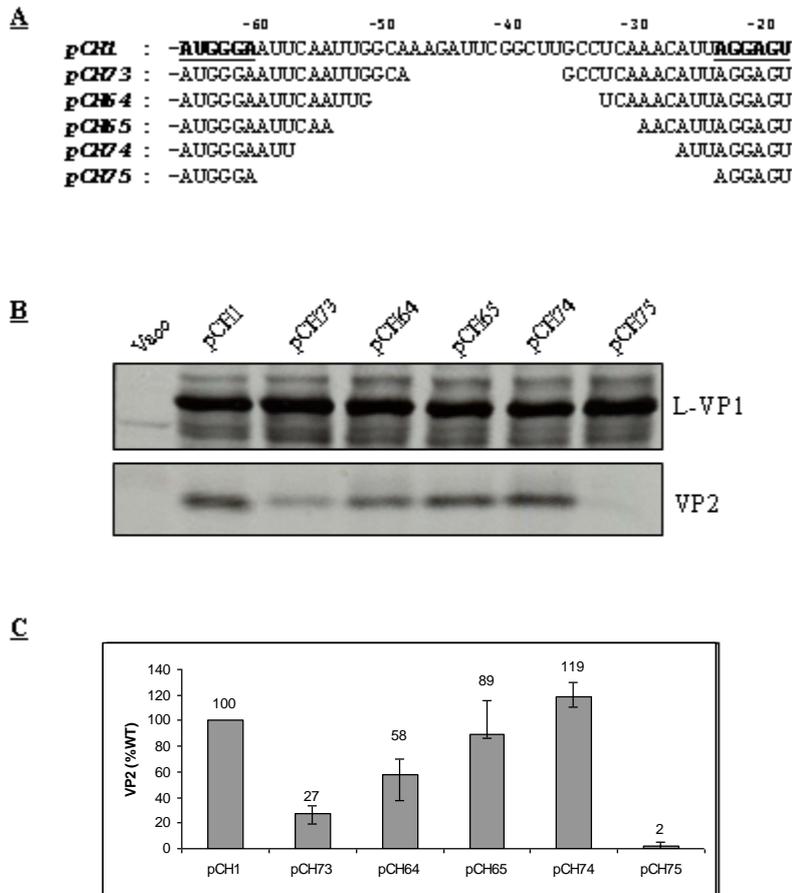


Abbildung 4.14: **Die Sequenz zwischen den beiden essentiellen Motiven definiert keinen bestimmten Abstand**

(A) Dargestellt ist die Sequenz zwischen den beiden Motiven, welche in der WT-Sequenz hervorgehoben sind. Darunter ist die Lokalisation der Deletionen in diesem Bereich dargestellt. (B) SDS-PAGE der synthetisierten Kapsidproteine. (C) Diagramm der statistischen Auswertung der Kapsidproteinsynthese ausgehend von den unter A angegebenen Deletionsmutanten.

Um Sequenzen zwischen den beiden Motiven zu detektieren, die an einer möglichen Sekundärstrukturausbildung beteiligt sind, wurden in diesem Bereich ebenfalls 3-Nukleotid-Deletionen eingeführt (Abbildung 4.15:A). Die meisten dieser Deletionen führten nur zu einer geringen Verminderung der VP2-Translation auf Werte zwischen 82% und 96%. Nur zwei Deletionen zeigten einen deutlichen Effekt und damit recht geringe Translationseffizienzen von 14% (pCH94, Nukleotide -51 bis -49) bzw. 17% (pCH99, Nukleotide -36 bis -34). Diese beiden Deletionen sind jeweils in 5'-Richtung von 3 Nukleotiden flankiert, deren Deletion zu einer Verminderung der VP2-Expressionsrate um circa 50% führten (Abbildung 4.15:B,C). Die Sequenzen Nt -52 bis Nt -46 und Nt -39 bis Nt -34 sind komplementär. Zwischen diesen beiden Bereichen könnte es somit zur Ausbildung von spezifischen Sekundärstrukturen kommen.

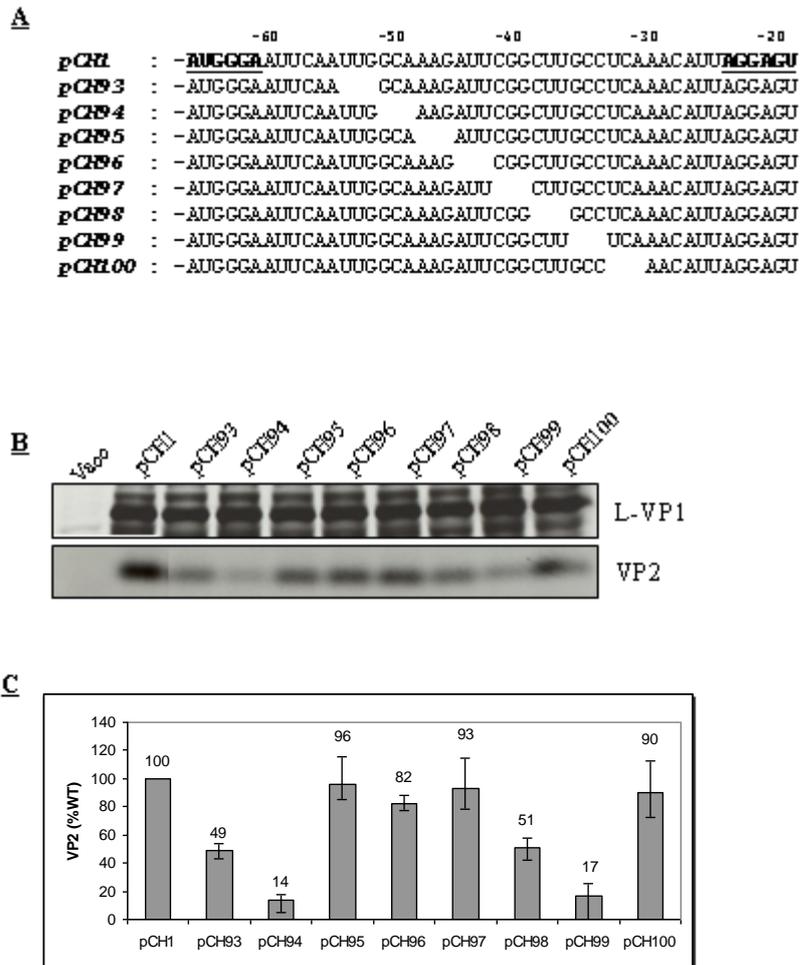


Abbildung 4.15: **3-Nukleotid-Deletionen zwischen den Motiven**

(A) Überblick über die 3-Nukleotid-Deletionen zwischen den beiden essentiellen Motiven in der 3'-terminalen Region des ORF2. In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die beiden essentiellen Motive markiert. (B) Detektion der Kapsidproteine. (C) Auswertung der Synthese-Effizienz des VP2-Proteins der Deletionsmutanten.

4.7.3 Charakterisierung des Motivs 1

Die Identifizierung der beiden Motive führte zu der Frage, welche Funktion sie für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus spielen. Sequenzvergleichsstudien ergaben, dass eine Sequenz von neun Nukleotiden, die das als essentiell bestimmte Hexamer des Motivs 1 (AUGGGA) enthalten, perfekt komplementär zu einer Region in der 18S rRNA von Säugern ist. Diese komplementäre Region ist in der Helix 26 an Position 1114 bis 1121 innerhalb der 18S rRNA Maussequenz lokalisiert (Abbildung 4.16). Zusätzlich zeigten weitere Sequenzvergleiche, dass das Pentamer UGGGA des Motivs 1 innerhalb der RNA der Caliciviren konserviert ist, und sich jeweils stromauf vom Start des für das minore Kapsidprotein kodierenden 3'-ORFs befindet.

Im 5'-Bereich der putativen Binderegion, an Position -67, wirkte sich der Austausch von Cytosin zu Uracil nur geringfügig auf die VP2-Expression aus (pCH87, 87%). Dieser Austausch würde eine Bindung an das Guanin der 18S rRNA zulassen. Ein anderer Austausch an dieser Position, der die mögliche Bindung an die 18S rRNA verhindern würde, ist nicht durchführbar, da hierdurch ein Terminationssignal generiert würde, welches zum vorzeitigen Abbruch der ORF2 Translation führen würde.

Um die mögliche Bindung des Motivs an die 18S rRNA zu überprüfen, wurde an zwei Positionen des Motivs, an denen sich in der ursprünglichen Sequenz ein Adenin befindet, neben dem Austausch gegen Cytosin ebenfalls ein Austausch gegen Guanin vorgenommen. Dieser Austausch gegen Guanin würde eine Bindung an ein Uracil innerhalb der 18S rRNA weiterhin ermöglichen. An den Positionen -66 und -61 an denen die zwei Austausche vorgenommen wurden, war deutlich ein Unterschied zwischen Ermöglichen der Bindung an die 18S rRNA und deren Verhinderung festzustellen. An Position -66 lag die Translationseffizienz bei Ermöglichen der Bindung durch Einbau des Guanin mit 77% (pCH83) wesentlich höher als nach Einbau eines Cytosins mit lediglich 9% (pCH84). Auch an der zweiten Position -61 führte die Substitution zum Guanin (pCH2) zu einer fast doppelt so hohen Translationseffizienz im Vergleich zum Austausch gegen Cytosin (pCH82). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine Funktion des Motivs 1 die Bindung an die 18S rRNA ist, da Einzelaustausche innerhalb der putativen Binderegion eine deutliche Verminderung der ORF3 Translationseffizienz zur Folge hatten, und die Erhaltung der möglichen Bindung an einer Position zu wesentlich höheren Effizienzen führte als das Verhindern.

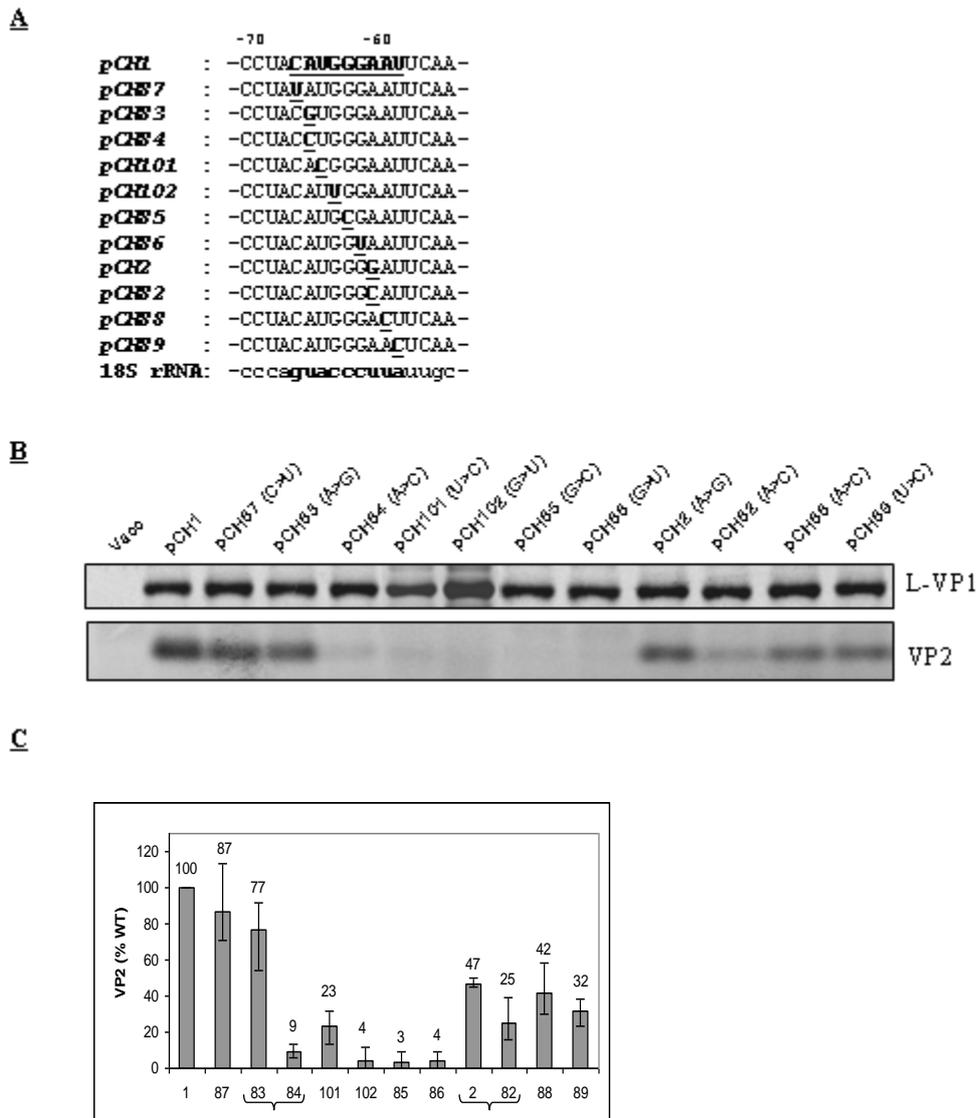


Abbildung 4.17: **Einzelsubstitutionen innerhalb des Motivs 1**

(A) Angegeben ist der Sequenzbereich, der das Motiv 1 (in fett hervorgehoben) enthält. Bei den verschiedenen Mutanten sind die vorgenommenen Einzelsubstitutionen in fett und unterstrichen markiert. Unter den Sequenzen der Mutanten ist die Sequenz der 18S rRNA in 3'-5'-Orientierung angegeben, und die zum Motiv 1 komplementäre Region ist fett markiert. (B) Nachweis der Kapsidproteine. Über den Gelausschnitten sind jeweils sowohl der Konstruktname als auch die Substitution angegeben. (C) Auswertung der Translationseffizienzen für das VP2-Protein. An der X-Achse sind die Nummern der jeweiligen Konstrukte angegeben. 2 Konstrukte mit Substitutionen an derselben Position sind durch eine geschweifte Klammer verbunden.

Um zu untersuchen, ob flankierende Sequenzen des Motivs 1 wichtig für die VP2-Synthese sind und eine Verlängerung der hybridisierenden Region zwischen FCV und 18S rRNA einen Einfluss auf die Reinitiation hat, wurden Substitutionen innerhalb der sich in 3'-Richtung an das Motiv anschließenden Sequenz eingeführt. An Position -58 könnte ein Austausch A für U (pCH3) zu einer A-U Paarung zwischen FCV-RNA und 18S rRNA führen, während C für U (pCH103) keinen Einfluss auf die vorhergesagte Interaktion hätte (Abbildung 4.18:A). Der

Austausch C für U führt mit 75% zu einer leichten Reduktion der VP2-Synthese, dagegen resultiert der Austausch A für U, der eine mögliche Paarung erlaubt, in einer Steigerung der VP2-Expression auf 138% im Vergleich zum Wildtyp. An Position -57 wurden zwei Substitutionen durchgeführt (A oder G für C, pCH112a oder 112g), die beide eine weitere Paarung erlauben würden, die aber vom Rest der Heteroduplex durch ein Nukleotid getrennt wäre. Diese beiden Mutationen führten zu einem VP2-Translationslevel nahe dem Wildtypniveau (113% bzw. 108%, Abbildung 4.18:B, C). Eine kontinuierliche Verlängerung der möglichen hybridisierenden Region um 2, 3 oder 4 Nukleotide (pCH138-140) führte zur Reduktion der VP2-Synthese auf 87%, 81% bzw. 52%. Somit resultiert nur die Verlängerung der hybridisierenden Region um 1 Nukleotid in einer Steigerung der Translationsrate für das VP2, während weitere Verlängerungen zu einer Reduktion führen.

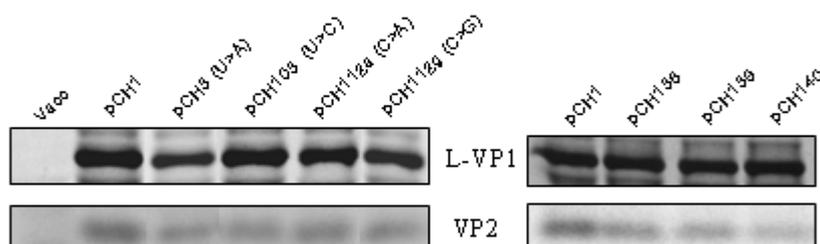
A

```

      -70      -60
pCH1   : -CCUACCAUGGGAUCAA-
pCH3   : -CCUACCAUGGGAUCAA-
pCH103 : -CCUACCAUGGGAUCAA-
pCH112a : -CCUACCAUGGGAUAAA-
pCH112g : -CCUACCAUGGGAUAAA-
pCH138 : -CCUACCAUGGGAUAAA-
pCH139 : -CCUACCAUGGGAUAAA-
pCH140 : -CCUACCAUGGGAUAAA-
18S rRNA: -cccaguuacccuuuuuuguc-

```

B



C

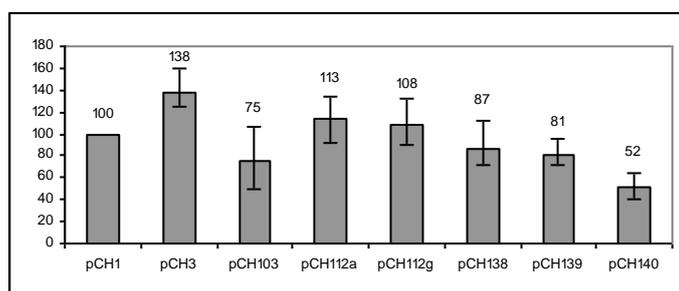


Abbildung 4.18: **Substitutionen stromab des Motivs 1**

(A) Angegeben ist der Sequenzbereich, der das Motiv 1 (in fett hervorgehoben) enthält. Bei den verschiedenen Mutanten sind die vorgenommenen Substitutionen in fett und unterstrichen markiert. Unter den Sequenzen der Mutanten ist die Sequenz der 18S rRNA in 3'-5'-Orientierung angegeben, und die zum Motiv 1 komplementäre Region ist in fett markiert. (B) Nachweis der Kapsidproteine. Links sind die Ergebnisse zu den Einzelsubstitutionen und rechts zu den Mehrfachsubstitutionen angegeben. (C) Auswertung der Translationseffizienzen für das VP2-Protein. 2 Konstrukte mit Substitutionen an derselben Position sind durch eine geschweifte Klammer gekennzeichnet.

4.7.4 Nachweis der Interaktion zwischen Motiv 1 des FCV und der 18S rRNA im Hefesystem

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur Charakterisierung des ersten Motivs des FCV unterstützen die Vermutung, dass die Funktion des Motivs 1 bei der Reinitiation in der Interaktion mit der 18S rRNA, einem Bestandteil der kleinen Untereinheit der Ribosomen, begründet liegt. Im für diese Versuche verwendeten Vaccinia-MVA-basierten Expressions-System konnte nur einer der möglichen Interaktionspartner, das Motiv 1 des FCV, mutiert werden. Um die Interaktion der beiden Regionen eindeutig nachzuweisen, wurde ein System gewählt, in dem neben der FCV-Sequenz auch die Sequenz der 18S rRNA verändert werden konnte. Für diese Analysen wurde der Hefestamm NOY908 benutzt (Wai et al., 2000), bei dem die Gene für die rRNA aus der chromosomalen DNA deletiert wurden. Dieser Stamm trägt ein Plasmid pNOY373, von welchem ausgehend die rRNA bereitgestellt wird, so dass der Stamm ohne dieses Plasmid nicht lebensfähig ist. Via Transformation kann ein weiteres für die 18S rRNA kodierendes Plasmid pNOY353 zugefügt werden und über dieses Plasmid können in der Hefe mutierte 18S rRNA Sequenzen exprimiert und in die Ribosomen eingeführt werden. Neben den pNOY353-basierten Konstrukten wurden Plasmide eingebracht, welche auf dem Hefe-Expressionsplasmid pYES (Invitrogen) basieren und zwei überlappende Leseraster enthalten, die im Aufbau der subgenomischen mRNA des FCV entsprechen. Das erste Leseraster kodiert für das Hauptkapsidprotein ohne die „Leader“-Sequenz, und enthält somit die TURBS-Region. Das zweite Leseraster startet mit den ersten 8 Nukleotiden des ORF3, und daran fusioniert folgt das Gen, kodierend für das besser zu detektierende GFP, mit einem 3'-terminalen cMyc-Tag (pYF21A, Abbildung 4.19:A). Ausgehend von den beiden Grundkonstrukten pYF21A und pNOY353 wurden verschiedene Mutanten mit Substitutionen im FCV-Motiv 1 bzw. in dem komplementären Bereich der 18S rRNA erstellt (Abbildung 4.19:A).

Da sich der Bereich der Säuger-18S rRNA, welcher komplementär zum Motiv 1 des FCV ist, um vier Nukleotide von der Hefe-Sequenz unterscheidet, wurde unter anderem untersucht, wie sich ein Angleichen dieser Sequenzen über Substitution von 4 Nukleotiden, auf Seiten des Motivs 1 (pYF21H) oder auch der Hefe-18S rRNA (pNY1) auf die Expression des VP2/GFPmyc auswirkt. Zu bemerken ist jedoch, dass zwei der vier sich zwischen Hefe- und Säugersequenz unterscheidenden Nukleotide dennoch zur möglichen Interaktion zwischen 18S rRNA und FCV-Sequenz beitragen können, da es hier zu einer G-U-Paarung kommen kann (Abbildung 4.19:B). Zu berücksichtigen ist bei diesem System, dass durch Einbringen des Plasmids pNOY353 in die Hefezellen zunächst alle Ribosomen die Hefe-18S rRNA beinhalten. Nach Expression der mutierten Sequenz, ausgehend von Plasmid pNY1 oder pNY2, trägt immer nur ein geringer Prozentsatz der Ribosomen die Mutation, während der größte Anteil der Ribosomen weiterhin die vom Plasmid pNOY373 kodierte Wildtyp-Hefe-18S rRNA beinhaltet (Dresios et al., 2006).

Untersucht wurden unterschiedliche Kombinationen der beiden möglichen Interaktionspartner, die in Abbildung 4.19:B dargestellt sind. Nach der Expression der Proteine im Hefe-System, wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das VP1-Protein sowie das GFP im Westernblot nachgewiesen.

Zunächst wurde die Effizienz der VP2/GFPmyc Synthese in Zellen untersucht, welche mit der Kombination der Plasmide pYF21A (FCV-Motiv 1) und pNOY353 (Hefe-18S rRNA) transfiziert wurden, die beide die entsprechenden Wildtypsequenzen beinhalten. Die Analyse der ausgehend von pYF21A translatierten Proteine zeigte eine schwache Expression des zweiten Leserasters (VP2/GFPmyc, Abbildung 4.19:C). Dies bedeutet, dass vermutlich eine

Interaktion über die 7 komplementären Nukleotide ausreichend war, um eine geringe Reinitiationsrate zu erlauben. Um die Interaktion zu verbessern und die in Säugern vermutete Hybridisierung zu erreichen, wurde in einer weiteren Analyse das Plasmid pNY1 neben dem Motiv 1 Wildtyp-Konstrukt (pYF21A) eingesetzt. In pNY1 ist die Helix 26 Sequenz der Hefe 18S rRNA an 4 Positionen verändert, um die Sequenz der Säuger 18S rRNA in der vermutlichen Bindungsstelle zu generieren, und somit eine Interaktion über alle 9 Nukleotide zu ermöglichen (Abbildung 4.19:B). Für diese Kombination zeigte sich eine deutlich stärkere VP2/GFPmyc Expression als bei der Kombination pYF21A und pNOY353 (Abbildung 4.19:C). Somit führt die Hybridisierung über 9 Nukleotide zu ein deutlich höheren Effizienz der VP2/GFP-Synthese als eine Interaktion über 7 Nukleotide.

Um zu analysieren, ob weniger als 7 komplementäre Basen zu einem Verlust der VP2/GFPmyc Synthese führen, wurden im Plasmid pYF21A die 3 Guanine im Kern des Motivs 1 gegen 3 Cytosine ausgetauscht (pYF126). Dieses mutierte Motiv 1 könnte nur über 5 komplementäre Nukleotide mit der Hefe 18S rRNA interagieren (Abbildung 4.19:B). Dennoch führte die Kombination pYF126/pNOY353 weiterhin zu einer schwachen VP2/GFPmyc Synthese (Abbildung 4.19:C). Ein Angleichen der entsprechenden Region innerhalb der 18S rRNA (pNY2) an die veränderte Motiv 1 Sequenz in pYF126 steigerte die VP2/GFPmyc Expression aber deutlich (Abbildung 4.19:C). Somit stellen reziproke Substitutionen in den komplementären Regionen der FCV-RNA und der 18S rRNA die effiziente Translation des zweiten Leserasters wieder her.

In den zuvor beschriebenen Analysen enthielt nur ein kleiner Anteil der Ribosomen die mutierte 18S rRNA, während der Hauptanteil die Wildtyp-Hefe-18S rRNA trug (wie bereits erläutert). Um die Expression des zweiten Leserasters zu steigern und die Interaktion zwischen der mRNA and der rRNA zu bestätigen, wurde das Motiv 1 an 4 Positionen mutiert (pYF21H), so dass diese Sequenz komplementär zur Hefe 18S rRNA war (Abbildung 4.19:B). Hierbei sollten alle Ribosomen der transfizierten Hefezellen in der Lage sein mit der mutierten FCV-mRNA-Sequenz zu interagieren. Bei dieser Kombination pYF21H/pNOY353 war eine sehr deutliche VP2/GFPmyc Synthese zu beobachten, die den Level, der bei der Kombination pYF21A/pNY1 erreicht wurde, bei weitem übertraf (Abbildung 4.19:D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion zwischen der Helix 26 der 18S rRNA und dem Bereich -67 bis -59 vor dem Stopp des ORF2 des FCV einen wesentlichen Einfluss auf die Translationsrate des zweiten Leserasters hat. So ist die größte Effizienz für die VP2/GFPmyc Synthese zu verzeichnen, wenn alle Hefe-Wildtyp-Ribosomen über die 9 Nukleotide umfassende Bindung an die mutierte Motiv 1 Sequenz interagieren können. Allein durch den Unterschied von 4 Nukleotiden zwischen mutierter Motiv 1 Sequenz und dem Wildtyp-Motiv 1 sinkt die Translationseffizienz stark. Dagegen erhöht sich diese Rate wieder, wenn neben dem Wildtyp Motiv 1 die mutierte über 9 Nukleotide komplementäre Region in der 18S rRNA vorliegt. Dieser Effekt fällt im Vergleich zu Wildtyp-Hefe-18S rRNA/komplementäre „Motiv 1“-Region jedoch schwächer aus, da hier nur ein geringer Anteil der Ribosomen die Mutation trägt, und dementsprechend auch nur dieser Anteil zur Interaktion fähig ist.

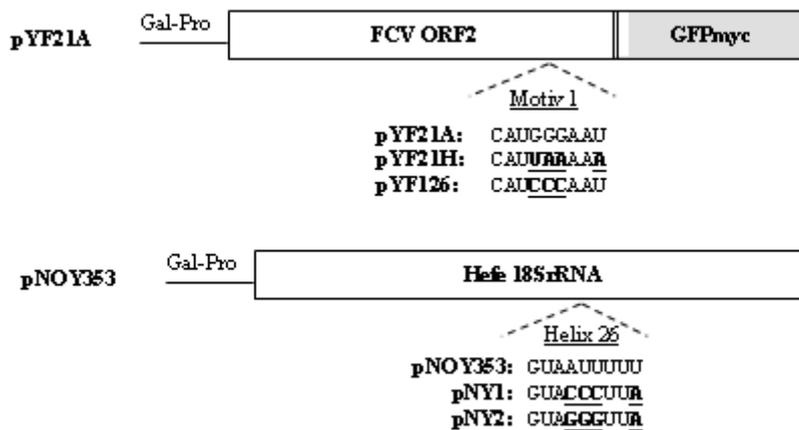
Um auszuschließen, dass der bei möglicher Interaktion von 5 bzw. 7 Nukleotiden beobachtete Basislevel an VP2/GFPmyc-Expression im Hefesystem auf Grund anderer Mechanismen als Translations-Termination/Reinitiation entsteht, wurde die Translation des VP1 innerhalb des Motiv 1 Wildtypkonstruktes pYF21A, wie unter 4.3 für das Säugersystem beschrieben, 210 Nukleotide vor dem eigentlichen Stopp terminiert (pYF72). Wenn dieses Konstrukt neben dem pNY1-Plasmid in die Hefe verbracht wurde, konnte keine VP2/GFPmyc-Synthese beobachtet werden (Abbildung 4.19:E). Damit gilt auch in diesem System, dass die

Expression des zweiten Leserasters von der vollständigen Translation des ersten Leserasters abhängt.

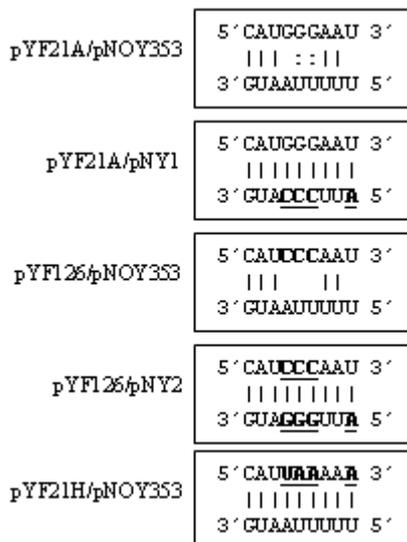
Somit folgt die Translation des zweiten Leserasters in der Hefe dem gleichen Mechanismus wie im Säugersystem, jedoch scheint im Hefesystem ein sehr geringes Basislevel immer vorhanden zu sein, auch wenn nur eine geringe Zahl an Paarungen mit der 18S rRNA möglich ist.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse deutlich, dass die Interaktion zwischen dem Motiv 1 und der Helix 26 der 18S rRNA eine bedeutende Rolle für die Reinitiation zur Translation des stromab gelegenen Leserasters spielen.

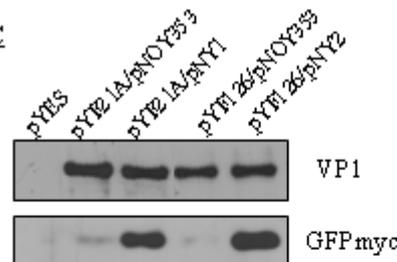
A



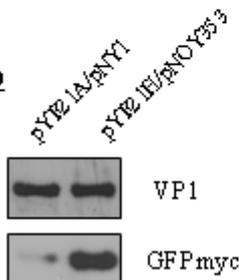
B



C



D



E

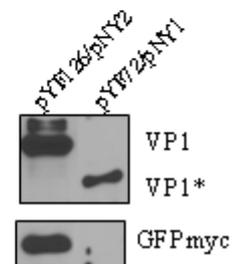


Abbildung 4.19: **Interaktion zwischen 18S rRNA und Motiv 1 im Hefesystem**

(A) Übersicht über die im Hefesystem verwendeten Konstrukte. Im oberen Bereich ist das Konstrukt pYF21A dargestellt, ein Hefe-Expressionsplasmid, welches als stromauf gelegenes Leseraster den ORF2 aus FCV enthält, jedoch ohne die Sequenz, die für das „Leader“-Protein kodiert. Als zweiten, überlappenden Frame enthält dieses Konstrukt das Gen für GFP, mit einem 3'-terminalen cMyc-Tag. In diesem Leseraster blieben die ersten 8

Nukleotide des ORF3 erhalten. Das Motiv 1 ist angegeben und die Mutationen der abgeleiteten Konstrukte pYF21H und pYF126 sind in fett und unterstrichen hervorgehoben. Im unteren Bereich ist das Plasmid pNOY353 gezeigt, welches für die 18S rRNA der Hefe kodiert. Als Sequenz angezeigt ist der Ausschnitt aus der Helix 26 und die Mutationen der abgeleiteten Plasmide pNY1 und pNY2 in diesem Bereich sind markiert. (B) Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen zwischen der Region des Motivs 1 des FCV (jeweils obere Sequenz) und der Helix 26 der 18SrRNA (untere Sequenz) bei unterschiedlichen Kombinationen von Konstrukten. Die Austausche bezüglich der Wildtyp-FCV bzw. Hefe 18S rRNA Sequenz sind hervorgehoben. (C-E) Detektion der in der Hefe exprimierten Proteine VP1 und GFP mittels Westernblot. In D ist eine wesentlich kürzere Exponierung für die GFP Detektion gezeigt als in C. (E) Das Konstrukt pYF72 basiert auf dem Plasmid pYF21A und enthält eine Insertion an der *Bgl*/II Restriktionsschnittstelle entsprechend dem Konstrukt pCH72 (siehe Abbildung 4.6), die zum Rasterwechsel und dadurch zum Abbruch der VP1-Translation 210 Nukleotide vor dem ursprünglichen Stopp führt.
Gal-Pro: Hefe Galaktose-Promotor;

4.7.5 Motiv 2 positioniert das Ribosom relativ zum ORF3 Start

Um zu untersuchen welche Funktion dem Motiv 2 (Nukleotide -24 bis -19) zukommt, wurde wiederum das Vaccinia-MVA-basierte System genutzt. Zunächst wurde analysiert, ob der Abstand zwischen dem Motiv 2 und der Start/Stopregion entscheidend für die VP2-Translation ist. Zu diesem Zweck wurden zwei Mutanten mit 6-Nukleotid-Deletionen von Nukleotid -18 bis -13 und Nukleotid -12 bis -7 generiert (Abbildung 4.20:A). Beide Deletionen führten zu einer starken Reduktion der Translationseffizienz auf weniger als 10% des Wildtypniveaus (Abbildung 4.20:B,C). Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Region als Abstandhalter zwischen Motiv 2 und dem ORF3-Start dient, zumal 3-Nukleotid-Deletionen in diesem Bereich an allen Positionen zu einer Reduktion der VP2-Expression führten (auf 43% bis 63%, siehe Abbildung 4.13). Um zu verifizieren, dass es sich hierbei tatsächlich um einen Effekt handelt, der auf der Verkürzung des Abstandes beruht und nicht auf der Veränderung der Sequenz, wurde ein Konstrukt (pCH90) erstellt und untersucht, bei dem der Abstand erhalten bleibt, jedoch die Sequenz stark verändert ist (Abbildung 4.20:A). Wie für die prognostizierte Funktion als Abstandhalter erwartet, hatte die Veränderung der Sequenz kaum einen Einfluss auf die ORF3 Translation, die mit einer Effizienz von 92% nah dem Wildtyplevel blieb. Somit ist zwischen Motiv 2 und dem Start des ORF3 nicht die Sequenz sondern der Abstand entscheidend. Daher könnte das Motiv 2 eine Rolle bei der Positionierung des Ribosoms spielen.

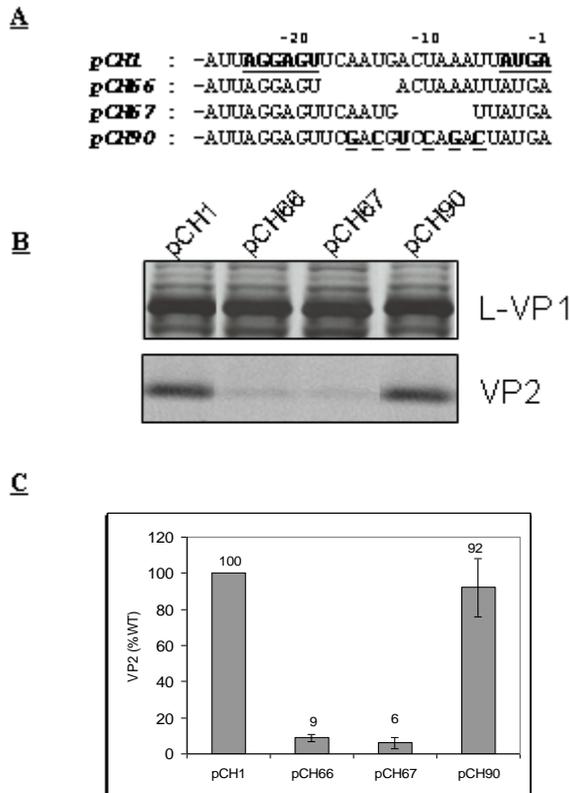


Abbildung 4.20: **Bedeutung der Sequenz zwischen Motiv 2 und dem Startkodon des ORF3**

(A) Angegeben ist die Sequenz von Motiv 2 bis zu dem Start des ORF3 (beides in fett und unterstrichen) und die zwei Mutanten pCH66 und pCH67 mit 6-Nukleotid-Deletionen in diesem Bereich, sowie pCH90 mit 6 Substitutionen an den angegebenen Positionen (fett und unterstrichen). (B) Nachweis der präzipitierten Kapsidproteine nach der SDS-PAGE. (C) Quantifizierung der erhaltenen Kapsidproteinmengen.

4.7.6 Charakterisierung des Motivs 2

Um den essentiellen Bereich des Motivs 2 genauer zu bestimmen, wurden Konstrukte mit verschiedenen Einzelsubstitutionen innerhalb dieses Hexamers generiert (Abbildung 4.21:A). Den stärksten Effekt auf die Translationseffizienz des VP2 zeigten die Substitutionen der Guanine (Nukleotid -23 und -22, pCH105, pCH106), bei denen Austausch zu Adenin oder Cytosin eine Reduktion auf 5% bis 10% des Wildtyplevels zur Folge hatten (Abbildung 4.21:B,C). Die Substitutionen des Guanins an Position -20 (pCH108) führten zu einer mildereren jedoch ebenfalls sehr deutlichen Reduktion auf 31% bis 49%. Hingegen zeigten Austausche des Uracils an Position -19 (pCH109) ca. Wildtyplevel bei der VP2-Synthese, so dass die essentielle Region vermutlich bereits bei Position -20 endet. Die weiteren Substitutionen an Position -24 und -21 wiesen je nach eingesetzter Base unterschiedliche Effekte auf. So führte der Austausch des Adenins (Nukleotid -24, pCH104) gegen Guanin zu einer wesentlich geringeren Reduktion der VP2-Expression (88% Effizienz des Wildtyplevels) als der Austausch des fraglichen Adenins gegen Cytosin (Verminderung auf

47%). An Position -21 (pCH107) war dieser Unterschied in der Effizienz noch deutlicher zu sehen. Wenn an dieser Stelle das Adenin zu Guanin mutiert wurde, hatte dies mit einer Verringerung um lediglich 7% kaum Auswirkung auf die Translationseffizienz, hingegen führte der Austausch gegen Uracil zu einer Verringerung um 74%. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion des Motivs 2 mit einer Nukleinsäure hin, da in diesem Falle die Adenine mit Uracil interagieren würden, und der Austausch des Adenins gegen Guanin weiterhin eine Bindung in Form einer G-U-Paarung zulassen würde, während die Einführung von Cytosin bzw. Uracil an dieser Stelle die Paarung verhindern würde.

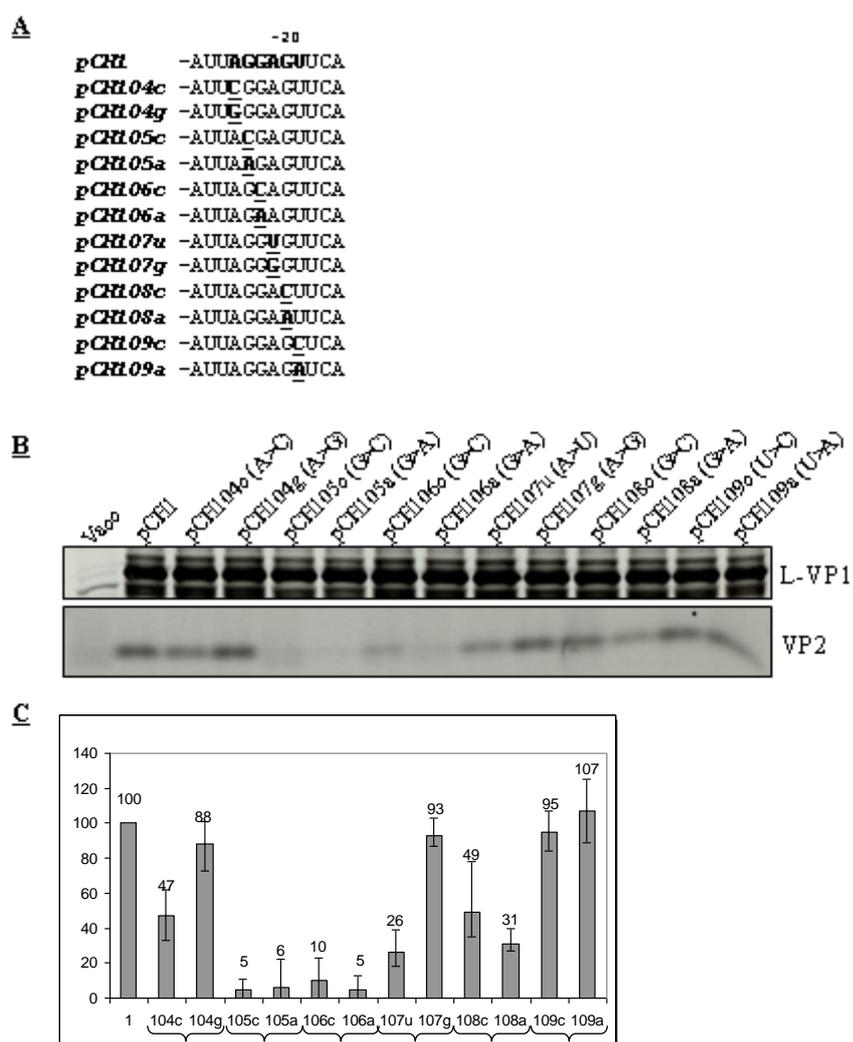


Abbildung 4.21: **Einzelsubstitutionen innerhalb des Motivs 2**

(A) Dargestellt ist die Sequenz um das Motivs 2 (in fett) und darunter die jeweiligen Einzelsubstitutionen (fett und unterstrichen) innerhalb des Hexamers. (B) Nachweis der Kapsidproteine. (C) Auswertung der Ergebnisse zu den Mengen der synthetisierten Kapsidproteine. An der X-Achse sind die Nummern der jeweiligen Konstrukte angegeben. Mutanten mit unterschiedlichen Mutationen an einer Position sind durch eine geschweifte Klammer verbunden.

4.7.7 Motiv 2 ist komplementär zu einer Region, die dem Motiv 1 vorgelagert ist

Da das Motiv 2 innerhalb der Caliciviren nicht konserviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die oben vorgeschlagene mögliche Interaktion mit einer Nukleinsäure in „cis“ stattfindet. Daher wurde nach einer Region innerhalb der FCV-RNA gesucht, die komplementär zum Motiv 2 ist. Solch eine Region findet sich unmittelbar vor dem Motiv 1, und umfasst die Nukleotide -73 bis -68 (Abbildung 4.22:A). Um die Wichtigkeit dieser Sequenz und die mögliche Interaktion der komplementären Regionen zu bestätigen, wurden unterschiedliche Einzelsubstitutionen in der zum Motiv 2 komplementären Region (Motiv 2*) eingeführt.

Zunächst wurden an Position -68 und -69 je zwei unterschiedliche Substitutionen eingeführt (Abbildung 4.22:A). An Position -68 führte der Austausch des Adenins gegen Uracil oder Cytosin zu einer Reduktion der VP2-Expression auf circa 55% (Abbildung 4.22:B,C). Eine ähnliche Verminderung auf ca. 50% zeigte die Substitution des Uracils gegen Adenin an Position -69. Der Austausch dieses Uracils gegen Guanin führte zu einer weiteren Reduktion der VP2-Synthese auf 7% im Vergleich zur Wildtyp-Syntheseeffizienz. Diese reduzierenden Effekte der Einzelsubstitutionen im Motiv 2* auf die VP2-Synthese zeigen die Bedeutung dieser Region für die Translation des ORF3.

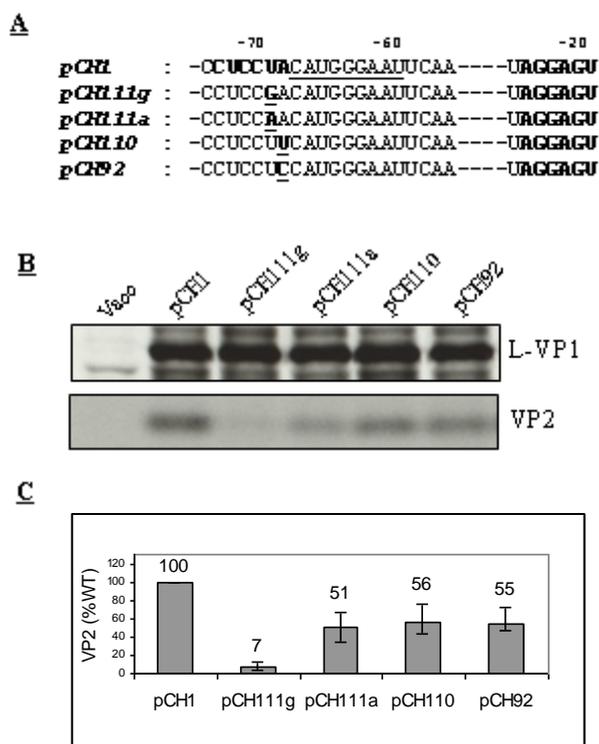


Abbildung 4.22: **Substitutionen in der Sequenz, die komplementär zu Motiv 2 ist**

(A) In der angegebenen 3'-terminalen Sequenz des ORF2 ist das Motiv 1 unterstrichen und das Motiv 2 und die dazu komplementäre Region sind fett markiert. Darunter sind Einzelsubstitutionen innerhalb des zum Motiv 2 komplementären Bereichs (Motiv 2*) durch Unterstrich und fette Schrift hervorgehoben. (B) Nachweis der Kapsidproteine. (C) Auswertung der Translationseffizienz der Mutanten.

Um die Interaktion zwischen Motiv 2 und Motiv 2* zu bestätigen, wurden verschiedene Substitutionen in beiden Motiven untersucht. Die Cytosine an Position -71 (P1) und -70 (P2) im Kern des Motivs 2* wurden für die Mutationsanalysen ausgewählt (Abbildung 4.23:A), da bei den Analysen zum Motiv 2 der Austausch der komplementären Guanine den größten Effekt auf die VP2-Synthese zeigte (pCH105, pCH106, siehe Abbildung 4.21). Die Substitutionen wurden so gewählt, dass sie die mögliche Bindung an das Motiv 2 verhindern (G_G) oder erhalten (U-G). Daher wurden jeweils an beiden Positionen (Nt -71 und Nt -70) ein U oder ein G für das C eingesetzt. Des Weiteren wurden dieselben Mutationen im Kontext der oben beschriebenen Mutationen im Motiv 2 an Position -23 oder -22 (A oder C für G) eingeführt. Dies führte in manchen Fällen zu reziproken Austauschen, welche die Komplementarität wiederherstellten. Somit verhindern diese Doppelmutationen die mögliche Interaktion (C-G zu U_C oder G_A) oder stellen diese wieder her (C-G zu U-A oder G-C). Mutationen, welche die mögliche Bindung durch Substitution eines Nukleotides (G_G) oder zwei der komplementären Nukleotide (G_A, U_C) verhinderten, führten zu einer deutlichen Reduktion der ORF3 Expression auf 7% bis 16% im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt mit der möglichen C-G Bindung (Abbildung 4.23). Die Substitution des U gegen C im Motiv 2*, welche die Interaktion via G-U Paarung ermöglichte, führte zu einer mildereren Reduktion auf 31% (P1: Nt -71) oder 50% (P2: Nt -70) (Abbildung 4.23:B,C). Wenn in beiden Regionen reziproke Austausche durchgeführt wurden, die eine Bindung über U-A oder G-C Paarung erlauben würden, war die VP2-Translationseffizienz wesentlich höher als für die entsprechenden Einzelsubstitutionen. Die U-A Paarung resultierte in einem VP2-Translationslevel von 46% (P1: Nt -71/-22) oder 69% (P2: Nt -70/-23). Die G-C Bindung an Position -71/-22 zeigte sogar eine höhere VP2-Translationseffizienz als der Wildtyp (138%), während die G-C Paarung an Position -70/-23 ein Expressionslevel nahe dem Wildtyp aufwies (88%) (Abbildung 4.23:B,C). Diese Ergebnisse unterstützen deutlich die Annahme, dass es zwischen Motiv 2 und Motiv 2* zu einer Interaktion kommt, die eine wichtige Rolle für das Reinitiationsereignis spielt.

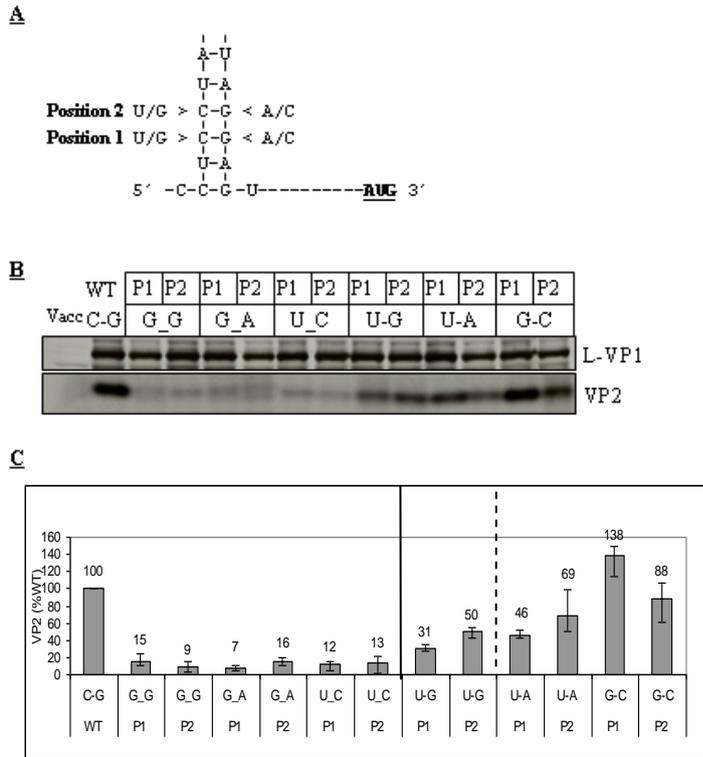


Abbildung 4.23: **Untersuchung von analogen Austauschen in Motiv 2 und Motiv 2***

(A) Dargestellt sind Ausschnitte aus der FCV-ORF2-Sequenz von Nukleotid -74 bis -68 und -25 bis -19, welche Motiv 2* und Motiv 2 beinhalten. Angegeben sind die möglichen Paarungen, die die Motive miteinander eingehen könnten, und die untersuchten Substitutionen innerhalb der beiden Interaktionspartner an zwei Positionen. (B) Detektion der Kapsidproteine, ausgehend von den Mutanten mit Substitutionen in Motiv 2 und/oder Motiv 2*. Oberhalb der Gelausschnitte sind die Basen an Nukleotid-Position -71/-22 (P1) und Position -70/-23 (P2) vor dem 3'-Ende des ORF2 angegeben. (C) Im Diagramm sind die Auswertungen zur Proteinsynthese in der Form dargestellt, dass jeweils gleiche Austausche an den beiden Positionen aufeinanderfolgen. Des Weiteren sind links die Austausche angegeben, die eine potentielle Bindung der beiden komplementären Regionen an dieser Stelle verhindern würden. Davon durch eine durchgezogene Linie abgetrennt, folgen die Mutationen, die eine Bindung zulassen. Im rechten Feld sind zunächst die Konstrukte aufgeführt, die eine U-G Paarung aufweisen, und folgend durch eine gestrichelte Linie abgetrennt auf der rechten Seite des Diagramms die Mutanten mit zwei Einzelsubstitutionen in den beiden Motiven, die durch die reziproken Austausche wieder eine Bindung über U-A oder G-C Bindung erlauben.

5. Diskussion

Viren sind in ihrer Proteinsynthese abhängig von der Wirtszell-Maschinerie. Die zellulären mRNAs unterlaufen im Zellkern ko- und posttranskriptionalen Modifikationen. Über nukleäre Enzymkomplexe wird an das 5'-Ende der mRNA ein 7-Methylguanosin angefügt („Cap“) und das 3'-Ende wird polyadenyliert. Diese Modifikationen dienen der Stabilität der mRNA und sind essentielle Faktoren für die Translationsinitiation, den wesentlichen Schritt bei der Entscheidung ob eine RNA translatiert wird oder nicht. Viren, die im Zytoplasma replizieren, können die zellulären Enzyme zur Modifizierung ihrer RNA zu einer translatierbaren Form nicht nutzen. Daher haben sie verschiedene Strategien entwickelt, um die Translation ihrer Proteine trotzdem zu erreichen. Diese Strategien führen zu einer effektiven Synthese viraler Proteine ausgehend von einer häufig limitierten Menge an genetischem Material in Konkurrenz zu den zellulären mRNAs.

Caliciviren tragen am 3'-Ende ihrer RNAs einen PolyA-Schwanz, weisen am 5'-Ende aber keine Cap-Struktur auf. Sie haben am 5'-Ende das VPg Protein kovalent gebunden, welches vermutlich die Rolle des „Cap“ bei der Translationsinitiation übernimmt, da es mit verschiedenen Initiationsfaktoren interagieren kann (Chaudhry et al., 2006; Daughenbaugh et al., 2003; Goodfellow et al., 2005). Somit wird ausgehend von der genomischen RNA über das VPg die Synthese eines Polyproteins vermittelt, welches ko- und posttranslational in die verschiedenen viralen Proteine gespalten wird. Da die subgenomische RNA ebenso wie die genomische RNA ein VPg trägt, wird ausgehend von der subgenomischen RNA die Translation des vom 5'-terminalen ORF kodierten Hauptkapsidproteins VP1 über das VPg erreicht. Die Translation des minoren Kapsidproteins VP2 erfolgt ebenfalls ausgehend von der bicistronischen, für die beiden Kapsidproteine kodierenden, subgenomischen RNA. Da das Startkodon für die VP2-Translation weit vom 5'-Ende und damit vom VPg entfernt liegt, kann die Translation des VP2 nicht direkt über das 5'-Ende erfolgen. Daher muss sie über einen anderen Mechanismus wie z.B. Leserasterverschiebung und anschließende Prozessierung, interne Initiation (mittels einer IRES) oder nach Termination der Translation des VP1 mittels Reinitiation erzielt werden. Einige Strategien für die VP2-Synthese können aufgrund des Aufbaus der subgenomischen RNA direkt ausgeschlossen werden. Die Translation des VP2-Proteins über „leaky scanning“ kann negiert werden, da dem Startkodon des VP2-kodierenden ORFs viele AUGs (beim FCV 37) vorangehen. Auch ein einfaches Überlesen des Stoppkodons und anschließende Prozessierung des Fusionsproteins kann ausgeschlossen werden, da der 3'-ORF in einem anderen Leseraster liegt als der für das VP1-kodierende ORF.

Für das RHD-Virus konnte nachgewiesen werden, dass VP2 mittels eines Terminations/Reinitiations-Mechanismus exprimiert wird, der abhängig von einer stromauf vom Start des VP2 (frühere Bezeichnung VP10) gelegenen Sequenz ist (Meyers, 2003). Das Thema der vorliegenden Doktorarbeit war, diesen speziellen Mechanismus der VP2-Translation beim FCV aufzuklären und eingehender zu untersuchen.

5.1 Translation der Kapsidproteine im transienten System

Für die Analyse der Kapsidproteinsynthese wurde ein transientes System genutzt. Als Basiskonstrukt diente das Plasmid pCH1, in dem die beiden für die Kapsidproteine kodierenden Leseraster des FCV enthalten waren, und das somit den Aufbau der subgenomischen RNA widerspiegelt. Um die effiziente Translation des VP1 in Abwesenheit des VPg zu gewährleisten, wurde eine EMCV-IRES stromauf des VP1-kodierenden Rasters eingefügt. Die VP1-Expression konnte als Normgröße für die Translationseffizienz des VP2 genutzt werden, da die generierte VP1-Menge unabhängig von Veränderungen an der weit stromab gelegenen Start/Stoppstelle sein sollte. Es zeigte sich, dass diese Methode zur Untersuchung des Translationsmechanismus gut geeignet ist, da beide Proteine nachgewiesen werden konnten und das Verhältnis VP2/VP1 dem in der infizierten Zelle beobachteten sehr ähnlich war. Die Expression der Kapsidproteine erfolgt somit unabhängig von weiteren viralen Faktoren und die Grundparameter der Kapsidproteinsynthese im transienten System sind denen in der Virus infizierten Zelle vergleichbar.

5.2 Die Bedeutung des AUG als Startkodon der VP2-Translation

Die klassische eukaryotische Translationsinitiation erfolgt durch Interaktion des Ribosoms mit dem 5'-Ende der mRNA und anschließendes „scanning“ bis zum ersten AUG. Es wurde gezeigt, dass ein AUG als Startkodon essentiell ist und die das AUG flankierenden Nukleotide einen erheblichen Einfluss auf die Effizienz der Initiation haben (Kozak, 1987). Nur in Ausnahmefällen erfolgt bei den Eukaryoten eine Initiation an einem alternativen Startkodon wie CUG, ACG, oder GUG, wobei dann aber ein optimaler Sequenzkontext erforderlich ist (Kozak, 1999). Bei einer Initiation an einem alternativen Startkodon beginnt das resultierende Protein trotzdem immer mit Methionin (Yoon and Donahue, 1992), da die Initiation beim „Scann“-Mechanismus in Abhängigkeit von der speziellen Initiator-tRNA^{Met} erfolgt.

Bei den verschiedenen Caliciviren findet sich jeweils ein AUG als Startkodon für das VP2, jedoch ist der Kontext nach Kozak nicht optimal. Dies spricht dafür, dass für die Auffindung des Startpunktes bei der Reinitiation der VP2-Translation ein anderer Mechanismus als der beim klassischen „scanning“ beobachtete zu erwarten ist. Die Bedeutung des AUG und flankierender Sequenzen für die VP2-Synthese erlaubt somit Rückschlüsse auf den Mechanismus, der zur Translation führt.

Einzel-, Doppel-Substitutionen oder auch ein Austausch des gesamten Startkodons beim FCV führten zu einer Reduktion der VP2-Syntheserate. Bei Austausch eines Nukleotids sank die Effizienz im Vergleich zum Wildtyp auf 47% bis 57%, bei zwei Mutationen auf 35% und bei Austausch des kompletten Triplets auf 12%. Diese Reduktion fiel jedoch wesentlich geringer aus als für eine klassische Initiation zu erwarten wäre. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für das verwandte RHDV erzielt (Meyers, 2003). Somit ist ein AUG als Startkodon für die VP2-Synthese nicht essentiell. Des Weiteren wiesen die Analysen beim FCV darauf hin, dass das synthetisierte VP2-Protein trotz der Startkodon-Mutationen zumeist mit einem Methionin beginnt und nicht mit der von der veränderten Sequenz kodierten Aminosäure. Somit stellt die Synthese des VP2 eine „de novo“ Translationsinitiation dar, die abhängig von der spezifischen Initiator-tRNA^{Met} ist. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass die VP2-Expression die Folge einer echten Translationsinitiation ist, und daher weitere Mechanismen

wie z.B. ein Leserastersprung und ko- und posttranslationale Spaltung eines Fusionsproteins für die Synthese des VP2 nicht in Betracht kommen.

Bei der klassischen Initiation ist die Bindung des AUG an das Antikodon der Initiator tRNA^{Met} als Bestandteil des ribosomalen Komplexes notwendig, damit die weiteren Schritte der Initiation erfolgen können. Ein AUG als Startkodon war für die VP2-Translation des FCV nicht essentiell jedoch effizienter als die anderen getesteten Kodone an dieser Position, so dass vermutlich die stabilere Bindung des AUG an das Antikodon der Initiator-tRNA^{Met} zu einer höheren Effizienz der Initiation führte, als die schwächere Bindung an alternative Kodone. Diese effizientere Reinitiation erklärt, warum das AUG als Startkodon des VP2 konserviert aber nicht essentiell für die VP2-Synthese ist.

Der Kontext spielt bei der klassischen Initiation ebenso eine wichtige Rolle. Es wird vermutet, dass es über diese flankierenden Sequenzen zu einem Verlangsamten des „scannenden“ Ribosoms kommt, was die Interaktion des AUG mit der Met-tRNAⁱ erlaubt. Da bei der VP2-Translationsinitiation weder das AUG selber noch ein optimaler Kontext nach Kozak essentiell sind, müssen weitere Faktoren bei der Festlegung der Startposition der Translation eine Rolle spielen.

5.3 Bedeutung der Termination der Translation des VP1 für das Reinitiationsereignis

Bei einem Terminations/Reinitiations-Mechanismus ist die Translation des stromab gelegen Leserasters abhängig von der Translation des stromauf gelegenen Leserasters und deren Termination. Das Einführen des Terminationssignals für das VP1 an eine Position weit stromaufwärts vom ursprünglichen Stoppkodon, führte zu einem Verlust der VP2-Synthese, und zeigt somit, dass das Ribosom über die Translation des ersten ORFs bis zur Startstelle des zweiten ORFs gelangen muss, damit eine Initiation der VP2-Synthese erfolgen kann. Ein Verschieben der Termination der VP1-Translation an das Ende des 3'-ORFs über Insertion eines Nukleotides direkt stromauf der Start/Stoppstelle, was zur Fusion der beiden Raster führte, resultierte ebenfalls im Verlust der VP2-Synthese. Folglich muss das Ribosom nicht nur zur Start/Stoppreion gelangen, sondern es muss hier auch eine Termination, somit ein Anhalten des Ribosoms, erfolgen. Diese Ergebnisse schließen eine unabhängige interne Initiation mittels einer IRES oder ein Übertragen des Initiationskomplexes vom 5'-Ende mittels „shunting“ (Hohn et al., 1988) aus, und lassen den Schluss zu, dass beim FCV ebenfalls ein Terminations/Reinitiations-Mechanismus zur VP2-Translation führt.

Die Verschiebung des Terminationspunktes in 3'-Richtung durch Substitutionen innerhalb des ursprünglichen Stoppkodons und stromab gelegener Terminationssignale zeigten, dass die Termination in einem bestimmten Abstand zum Startkodon des VP2 erfolgen muss, damit sich eine Reinitiation an dieser Position ereignen kann. So war eine kaum verminderte Expressionseffizienz für das VP2 zu detektieren, wenn die Termination der VP1-Translation 12 Nukleotide weiter stromab erfolgte, jedoch führte das Verlagern der Termination um 60 Nukleotide (20 Kodone) stromab zum Verlust der VP2-Synthese. Bei der VP2-Translation des RHDV wurde ebenfalls die Abhängigkeit der Reinitiation von der Termination gezeigt, jedoch konnte eine VP2-Synthese auch nach Verschieben des Stoppkodons um bis zu 42 Kodone in 3'-Richtung nachgewiesen werden (Meyers, 2007). Somit scheint der

Mechanismus beim RHDV bezüglich des Abstandes zwischen Termination und Reinitiation flexibler zu sein als beim FCV (siehe auch 5.7).

Zusätzlich zeigten diese Analysen, dass die Sequenz stromab des Startsignals eine gewisse Rolle für die Reinitiation spielt, da das Verändern dieser Sequenz durch zwei Punktmutationen, die der Aufhebung der im Leseraster befindlichen Terminationssignale dienen, zu einer Reduktion der VP2-Synthese auf 42% im Vergleich zum Wildtyp führte (siehe auch 5.4). Dies ist vergleichbar mit RHDV bei dem sogar der Austausch von UGA gegen andere Stoppkodone eine deutliche Verringerung der VP2-Synthese bewirkt (Meyers, 2003).

5.4 Die von der Start/Stoppreion stromab gelegene Sequenz ist nicht essentiell für die Translation des VP2

Bei der Analyse der für die Reinitiation essentiellen Sequenzen zeigte sich, dass Deletionen in dem Bereich, der stromab der Start/Stoppreion gelegen ist, die VP2-Expression nicht verhindern konnten, so dass zu folgern ist, dass weder ORF3 noch die 3'-NTR eine essentielle Rolle für die VP2-Synthese spielen. Die verschiedenen Deletionen zeigten aber überraschenderweise unterschiedliche Einflüsse auf die Reinitiationsrate. Dies ist vermutlich auf die Veränderung der Sekundärstruktur zurückzuführen, da die Ausdehnung der Deletionen nicht mit ihrem Effekt auf die VP2-Translation zu korrelieren ist, was bei entscheidender Bedeutung der Primärsequenz zu erwarten wäre.

Bei den hier beschriebenen Deletionen im ORF3 wurde jeweils auch der Bereich entfernt, in dem es wie unter 5.3 beschrieben durch zwei Punktmutationen zu einer Verminderung der VP2-Synthese um circa 50% im Vergleich zum Wildtyp kam. Da bei den Deletionsmutanten das Fehlen dieser stromab vom Start gelegenen Sequenz nicht zu einer deutlichen Reduktion der VP2-Synthese führte, ist der für die Punktmutationen beschriebene Effekt vermutlich ebenfalls auf eine Veränderung der Sekundärstruktur zurückzuführen und nicht auf die Abwandlung eines wichtigen Sequenzmotivs.

5.5 Eine stromauf der Start/Stoppreion gelegene Sequenz ist essentiell für die Translation des VP2

Beim RHDV wurde nachgewiesen, dass eine stromauf gelegene Region unabdingbar für die Expression des folgenden 3'-ORFs ist. Deletionsanalysen beim FCV zeigten, dass in diesem Bereich ebenfalls eine Region von ca. 70 Nt essentiell für die Synthese des VP2 ist, die analog zum RHDV als TURBS ("termination upstream ribosomal binding site") bezeichnet wurde. Die TURBS Region des FCV ist alleine in der Lage, eine Reinitiation nach Termination zu vermitteln, wie Analysen mit Konstrukten zeigten, bei denen FCV-ORF2 und -ORF3 durch 2 Reportergene ersetzt worden waren. Die Effizienz der Reinitiation bei den Reporterproteinen entsprach ca. der für die FCV-Kapsidproteine ermittelten, so dass vermutlich neben der TURBS keine weiteren Sequenzen der FCV-RNA einen entscheidenden Einfluss auf den Reinitiations-Mechanismus haben.

In Ergänzung zu den unter 5.3 und 5.4 beschriebenen Resultaten, wo zwei Punktmutationen oder eine Deletion innerhalb der Start/Stopregion angeschlossenen Sequenzen einen negativen Einfluss auf die VP2-Translation zeigten, lassen die Ergebnisse zu den Reporterkonstrukten den Schluss zu, dass die der Start/Stopregion 3'-folgende Sequenz (in diesen Versuchen die für GFP kodierende Sequenz) einen Einfluss auf die Reinitiationsrate haben kann, dieser aber Primärsequenz unabhängig ist, und vermutlich allein auf einen Einfluss über Sekundärstrukturen zurückzuführen ist.

Durch Einführung verschiedener Deletionen von 12 bzw. 3 Nukleotiden im Bereich der TURBS konnten zunächst zwei essentielle Motive innerhalb der TURBS detektiert werden. Motiv 1 befindet sich ca. 60 Nukleotide und Motiv 2 ca. 20 Nukleotide stromauf vom ORF2 3'-Ende.

5.5.1 Funktion des Motivs 1

Das Motiv 1 des FCV ist 9 Nukleotide lang und beinhaltet ein Pentamer (UGGGA), welches bei den Caliciviren konserviert ist (Abbildung 4.16; 5.4). Dieses Pentamer sowie einige flankierende Nukleotide sind komplementär zu einer Region der 18S rRNA Sequenz, die in der Spitze der Helix 26 lokalisiert ist (Abbildung 4.16). Beim FCV erstreckt sich dieser komplementäre Bereich über insgesamt 9 Nukleotide. Einzelsubstitutionen innerhalb des Motivs 1 zeigten, dass alle 9 Nukleotide wichtig für die Funktion des Motivs sind, wobei Mutationen, die die 3 G's im konservierten Pentamer des Motivs (Position -62 bis -64) betrafen, einen besonders großen Einfluss auf die Reinitiation zeigten (Reduktion auf 3% bzw. 4%). Des Weiteren führten die verschiedenen Substitutionen innerhalb des Motivs zu deutlichen Unterschieden in der Reinitiationseffizienz, je nachdem ob trotz Mutation eine Interaktion mit der 18S rRNA über eine G-U Paarung möglich war oder durch den Austausch die Hybridisierung an dieser Position verhindert wurde.

Die Verlängerung des Motivs, d.h. die Erweiterung des zur 18S rRNA komplementären Bereiches durch Substitution eines Nukleotids, führte zu einer Steigerung der VP2-Synthese im Vergleich zum Wildtyp. Weitere kontinuierliche Verlängerungen des komplementären Bereichs um 2, 3 oder 4 Nukleotide zeigten dagegen eine zunehmende Verminderung der VP2-Syntheserate. Mit 10 komplementären Nukleotiden wird damit die höchste Reinitiationseffizienz erreicht, und ein Bereich von 11 oder mehr komplementären Nukleotiden hat einen negativen Einfluss auf die Reinitiation. Die Ergebnisse der Analysen mit Basensubstitutionen in diesem Bereich zeigen weiterhin, dass die sich dem Motiv 1 3'-anschließende Region keinen bedeutenden Einfluss auf die Reinitiation hat.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass sehr wahrscheinlich die Komplementarität des Motivs 1 zur 18S rRNA eine bedeutende Rolle für die Reinitiationseffizienz spielt. Um die Interaktion zwischen den beiden RNAs zu beweisen, mussten neben den Austauschen in der FCV-mRNA reziproke Austausche in die 18S rRNA Sequenz eingefügt werden können. Für diese Analysen sind bei Säugerzellen keine Systeme verfügbar. Deshalb wurde ein Hefesystem ausgewählt, bei dem der Stamm NOY908 als Basis diente. In diesem System war es möglich, sowohl die 18S rRNA als auch die FCV-RNA-Sequenz in den beiden komplementären Bereichen Helix 26 und Motiv 1 zu verändern. Die 18S rRNA wurde über das Plasmid pNOY353 in die Hefezellen verbracht. Als Hefe-Expressionsplasmid für die Untersuchung der TURBS vermittelten Reinitiation wurde das Konstrukt pYF21A verwendet,

welches als erstes Leseraster den für das VP1-Protein kodierenden Bereich enthält. Das zweite Leseraster bestand aus den ersten 8 Nukleotiden des ORF3 und daran fusioniert das GFP-Gen mit einem 3'-terminalen cMyc-Tag.

Bei einem Ermöglichen der Interaktion zwischen Helix 26 und Motiv 1 über 5 bzw. 7 paarende Nukleotide erfolgte in der Hefe eine schwache Translation des zweiten Leserasters. Bei einer möglichen Hybridisierung über die gesamten 9 Nukleotide, wie sie durch Mutation der Hefe 18S rRNA Sequenz erreicht wurde, erhöhte sich die Syntheserate des zweiten Leserasters sehr deutlich im Vergleich zu den Mutanten, die nur eine Interaktion über 5 oder 7 paarende Nukleotide erlaubten. Dies war der Fall wenn nur die 18S rRNA Sequenz der Wildtyp-FCV-Basenfolge angepasst wurde, aber auch wenn beide Regionen Mutationen beinhalteten. Wichtig war nur die Länge des komplementären Bereiches.

Bei den zuvor geschilderten Versuchen konnten nicht alle Ribosomen mit der fraglichen Region des Motivs 1 interagieren, da ein Großteil der Ribosomen die Wildtyp-Hefe 18S rRNA Sequenz beinhalteten. Diese Ribosomen enthielten rRNA, die ausgehend vom Plasmid pNOY373 transkribiert worden war. Wenn hingegen das Motiv 1 in der TURBS des FCV so mutiert wurde, dass es zu den 9 Nukleotiden der Hefe 18S rRNA Sequenz komplementär war, war im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen, eine erheblich gesteigerte VP2/GFPmyc-Syntheserate zu detektieren. Diese Ergebnisse, hohe Reinitiationsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der interagierenden Nukleotide zwischen Motiv 1 und 18S rRNA und Steigerung durch Erhöhung des Anteils der Ribosomen mit der komplementären Sequenz der 18S rRNA, zeigen eindeutig, dass eine Interaktion zwischen Motiv 1 und der komplementären Sequenz innerhalb der Helix 26 der 18S rRNA eine entscheidende Rolle für die Effizienz der Reinitiation zur Translation des zweiten Leserasters spielt.

Die VP2/GFPmyc-Translation beruht im hier genutzten Hefesystem allein auf Reinitiation und nicht auf einem anderen Mechanismus wie einer internen Initiation, da das Verlagern des Terminationssignals innerhalb des für VP1-kodierenden Leserasters weit stromauf des ursprünglichen Stoppkodons zu einem Verlust der Translation des zweiten Leserasters führte. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die Synthese des zweiten Leserasters im Hefesystem den Grundsätzen folgt, die zuvor für die Säugerzellen gezeigt worden waren.

5.5.2 Bedeutung des Motivs 2

Die Funktion des zweiten Motivs ließ sich zunächst nicht so eindeutig definieren. Motiv 2 ist im Gegensatz zu Motiv 1 nicht konserviert. Es lag aber nahe anzunehmen, dass es für die Positionierung des Ribosoms relativ zum Start (mit) verantwortlich ist. So führten die Deletionen von 3, 6 oder 12 Nukleotiden im Bereich zwischen dem Motiv 2 und der Start/Stoppreion abhängig von der Länge, aber unabhängig von der Position, zu einer Verminderung der VP2-Translationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletionen von 3 Nukleotiden in diesem Bereich führten alle zur Verminderung um ca. 50%, während der Verlust von 6 Nukleotiden die Reinitiationsrate auf 6% bzw. 9% des Wildtyp-Niveaus reduzierte, und die Deletion von 12 Nukleotiden zu einem fast vollständigen Verlust der VP2-Synthese führte. Das heißt, dass der Abstand zwischen dem Motiv 2 und dem Start wichtig ist. Dass die Distanz und nicht die Sequenz in diesem Bereich eine essentielle Rolle spielt, wurde durch Austausch von insgesamt 6 Nukleotiden der insgesamt 15 Nukleotide langen fraglichen Sequenz gezeigt, da dies keinen Einfluss auf die VP2-Synthese hatte.

Um die Funktion des Motivs 2 besser zu verstehen, wurden die einzelnen Nukleotide des über 3 Nukleotid Deletionen bestimmten Hexamers ausgetauscht. Die meisten dieser Substitutionen führten zu einer Reduktion der VP2-Synthese, wobei die Austausch der 2 Gs (Position -22,-23) die größte Abnahme (um 90-95%) bewirkten. Das letzte Nukleotid des Hexamers (Nt -19) scheint keine Rolle bei dem Reinitiationsereignis zu spielen, da zwei unterschiedliche Austausche an dieser Position keinen Einfluss auf die VP2-Expression hatten. An zwei Positionen zeigten sich unterschiedliche Translationseffizienzen je nach eingesetzter Base. Der Austausch des A an Position -21 oder -24 gegen ein G bewirkte jeweils eine wesentlich geringere Reduktion der VP2-Translationseffizienz als der Austausch des A gegen ein C (Nt -24) oder ein U (Nt -21). Dies wies auf eine Interaktion dieser Region mit einer weiteren Nukleinsäure hin, da durch den Austausch zu G weiterhin eine Hybridisierung mittels G-U Paarung möglich wäre.

Da die Sequenz des Motivs 2 wie erwähnt bei den Caliciviren nicht konserviert ist und eine Hybridisierung mit einer konservierten Zellsequenz deshalb unwahrscheinlich ist, wurde nach einer komplementären Sequenz innerhalb der FCV-RNA gesucht. Es konnte eine entsprechende Sequenz direkt stromauf vom Motiv 1 gefunden werden. Diese erstreckt sich über die Nukleotide -73 bis -68 und ist komplementär zu den Nukleotiden -20 bis -25. Somit verschiebt sich Motiv 2 um ein Nukleotid in 5'-Richtung im Vergleich zu dem Bereich, der über 3 Nukleotid Deletionen bestimmt wurde (Nt -19 bis -24). Die zu Motiv 2 komplementäre Region wurde als Motiv 2* bezeichnet. Motiv 2* wurde zuvor über die 3 Nukleotid Deletionen nicht als essentieller Bereich detektiert, da benachbarte Sequenzen den Effekt der Deletionen zum Teil ausgleichen können, und es daher nur zu einer vergleichsweise geringen Verminderung der VP2-Expression kam (siehe Abbildung 4.13). Die Interaktion der beiden komplementären Regionen innerhalb der FCV-RNA konnte durch reziproke Austausche in beiden Motiven bestätigt werden. Basierend auf der Interaktion zwischen den beiden Motiven 2 und 2* ergibt sich die in Abbildung 5.1 dargestellte mögliche Sekundärstruktur für die TURBS Region.

kompakt diese Region in ihrer Sekundärstruktur ist. Dies lässt sich daraus folgern, dass größere Deletionen höhere Translationseffizienzen aufwiesen, und zum Anderen Deletionen gleichen Ausmaßes unterschiedliche Auswirkungen hatten, die mit ihrem Einfluss auf die mögliche Sekundärstruktur korrelieren. Die meisten 3-Nukleotid-Deletionen führten nicht zur Reduktion der VP2-Translation. Lediglich die Deletionen, die die vorhergesagte Interaktion zwischen den Nukleotiden -52 bis -46 mit -39 bis -34 vermindern würden, wiesen eine deutliche Reduktion der VP2-Syntheserate auf. So führten Deletionen, die die Basis dieser Duplex schwächen würden, zu einer starken Reduktion der VP2-Synthese auf 14% (Nt -52-bis -50) bzw. 17% (Nt -36 bis -34), und auch angrenzende Deletionen, die die Interaktion beeinträchtigen würden, führten zu einer Reduktion um ca. 50% (Nt -55 bis -53 und -39 bis -37). Somit zeigt sich ein negativer Einfluss auf die Reinitiation, wenn diese Haarnadelstruktur aufgebrochen wurde und folglich die Region zwischen den Motiven weniger kompakt war. Bei größeren Deletionen spielten nach dieser Hypothese die Beeinträchtigungen der Sekundärstruktur keine Rolle mehr, da der Verlust etlicher Nukleotide auch ohne Ausbildung einer Sekundärstruktur zu einer kompakten Struktur führt, wie sie in Abbildung 5.2 exemplarisch für die Deletion von 30 Nukleotiden dargestellt ist.

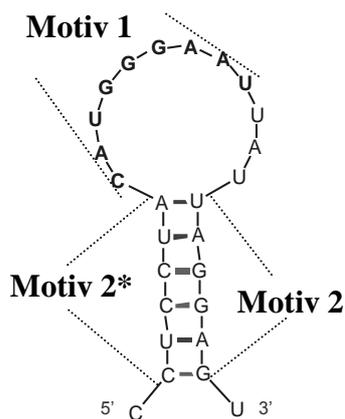


Abbildung 5.2: **Mögliche Sekundärstruktur der TURBS nach Deletion von 30 Nukleotiden**

Dargestellt ist die mögliche Sekundärstruktur der FCV-TURBS ausgehend vom Konstrukt pCH74 mit Deletion von 30 Nukleotiden zwischen Motiv 1 und Motiv 2. Die essentiellen Motive sind gekennzeichnet.

Nimmt man die Ergebnisse, die mit den Deletionsmutanten erhalten wurden, zusammen so bestätigen sich die essentiellen Motive und die vorhergesagte Sekundärstruktur in Abbildung 5.1. Sie zeigen außerdem die Bedeutung der kompakten Struktur im Bereich zwischen den Motiven. Des Weiteren stimmt die hier vorgeschlagene Sekundärstruktur der TURBS mit den von Pöyry et al. (2007) erwähnten Ergebnissen von Strukturuntersuchungen und der von diesen Autoren vorgeschlagenen Struktur weitgehend überein.

Durch die Sekundärstruktur der TURBS wird eine bestimmte Distanz zwischen dem Motiv 1 und der Startregion geschaffen, die wahrscheinlich für die Positionierung des Ribosoms für die Reinitiation notwendig ist. Durch diese spezifische Positionierung ist vermutlich auch zu erklären, dass ein AUG als Startsignal nicht absolut essentiell ist, da das AUG bei der

Translationsinitiation primär für das Auffinden des Startpunktes während des „scanning“-Prozesses erforderlich ist. Diese Notwendigkeit fällt bei einer direkten Positionierung weg.

Eine mögliche Positionierung des Ribosoms über die Sekundärstruktur der TURBS ist im Einklang mit den Ergebnissen, die von Pisarev et al (2008) erzielt wurden. Bei der Untersuchung der Position des Ribosoms und dessen Kontakt mit der mRNA bei einem Initiationsereignis, wurde unter anderem gezeigt, dass ein Nukleotid in der Helix 26 der 18S rRNA mit dem Nukleotid an Position -17 der mRNA relativ zum Startkodon interagiert. In der FCV-RNA entspricht das dem Abstand zwischen dem VP2-Startkodon und dem Motiv 2. Somit befindet sich die Helix 26 der 18S rRNA während eines Initiationsprozesses wahrscheinlich in räumlicher Nähe zum Motiv 1 und ist zugänglich für Interaktionen. Die Grundzüge der Anordnung des Ribosoms bezogen auf die Startstelle sind demnach bei klassischer Initiation und der caliciviralen Reinitiation gleich.

Auch bei anderen Mechanismen der Initiation erfolgt das Auffinden des Translationsstartpunktes nicht über AUG/Antikodon-Paarung, sondern durch direkte Positionierung des Ribosoms. Bei der Initiation mittels einer HCV- (Hepatitis C Virus) oder CSFV- („classical swine fever virus“) IRES erfolgt die Positionierung des Ribosoms am Startkodon über Bindung des Ribosoms an Regionen der komplexen Sekundärstrukturen der IRES (Pestova et al., 1998). Durch die Bindung des 43S Initiationskomplexes an die IRES wird das AUG sehr präzise in unmittelbare Nähe der P-Stelle des Ribosoms gebracht. Diese Initiation mittels der HCV oder CSFV IRES ist unabhängig von einigen der Initiationsfaktoren (eIF4A, eIF4B und eIF4F), die eine entscheidende Rolle bei der klassischen eukaryotischen Initiation spielen. Für den Initiationsfaktor eIF3 konnte ebenso wie für die ribosomale 40S Untereinheit eine direkte Bindung an die IRES Strukturen nachgewiesen werden. Der eIF3 ist hier nicht essentiell für die Ausbildung des 48S Komplexes jedoch für den Aufbau des 80S Komplexes.

Beim FCV erfolgt vermutlich ebenso eine Positionierung des Ribosoms über die Bindung an die Sekundärstruktur der TURBS mittels Hybridisierung zwischen 18S rRNA mit dem Motiv 1. Jedoch bleibt zu untersuchen, welche Faktoren beim caliciviralen Reinitiationsereignis essentiell sind. Diese beiden Mechanismen unterscheiden sich unter anderem darin, dass es durch eine IRES zu einer unabhängigen Initiation und Rekrutierung von freien Ribosomen und Faktoren aus dem Zytosol kommt, während sich die Initiation beim FCV direkt an ein Terminationsereignis anschließt und vermutlich an der RNA bereits gebundene Ribosomen wieder verwendet werden.

5.6 Rolle des eIF3 für die Reinitiation der VP2-Translation

Neben der TURBS sind vermutlich zumindest ein Teil der klassischen Initiationsfaktoren und vielleicht weitere Faktoren an dem Reinitiationsereignis zur Translation des VP2-Proteins beteiligt. Die meisten der unterschiedlichen Auswirkungen von Einzelsubstitutionen können durch die unterschiedliche Stärke der Wechselwirkungen zwischen Motiv 1 und der 18S rRNA erklärt werden. So ist der negative Effekt größer wenn eine G-C Paarung verhindert wird als bei Zerstören einer A-U Paarung. Manche der beobachteten Effekte können aber nicht allein mit der Störung dieser Wechselwirkung erklärt werden. Das zeigt z.B. der Austausch an Position -61, der trotz einer möglichen G-U Paarung eine um 53% reduzierte

Translationseffizienz für VP2 aufwies. Somit interagieren vermutlich weitere Faktoren mit der FCV-RNA-Sequenz und unterstützen das Reinitiationsereignis.

Pöyry et al. (2007) konnten zeigen, dass die TURBS-Region in der Lage ist, den multimeren Initiationsfaktor eIF3 zu binden. Auch für diese Bindung scheint das Motiv 1, speziell die 3 G's (Position -62 bis -64), eine besondere Rolle zu spielen, da ein Austausch zu 3 Cs die Bindung des eIF3 an die TURBS sehr stark reduzierte. eIF3 ist ein Schlüsselfaktor in den verschiedenen Schritten der Translationsinitiation. Die Hauptfunktion ist eine Art von Gerüst für den Zusammenbau des Initiationskomplexes zur Verfügung zu stellen. Seit kurzem ist bekannt, dass eIF3 eine weitere wichtige Funktion in einer anderen Phase der Translation, dem sogenannten Recycling der Ribosomen, hat (Pisarev et al., 2007). Mit Recycling bezeichnet man den Prozess, der Ribosomen nach Beendigung der Translation für einen neuen Prozess wieder verfügbar macht. Nach der Dissoziation eines reifen Proteins vom Ribosom sind die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und eIF3 notwendig und ausreichend um einen kompletten Abbau des Ribosoms und seine Dissoziation von der mRNA zu erreichen. eIF3 fördert die Dissoziation der 60S Untereinheit, während eIF3/40S weiterhin an der mRNA gebunden bleiben, wobei sich noch eine deacylierte tRNA in der P-Stelle befindet. Das Entfernen dieser deacylierten tRNA wird von eIF1 gefördert, und anschließend vermittelt die locker assoziierte Untereinheit eIF3j das Ablösen des eIF3/40S Komplexes von der mRNA (Pisarev et al., 2007).

Für eine Reinitiation könnte also eIF3 in Folge seiner Beteiligung an der Termination bereits als komplex gebundener Faktor zur Verfügung stehen. Die Interaktion zwischen der TURBS und dem bereits vorhandenen eIF3 könnte dann dabei mithelfen, den Terminationsprozess zu beenden und das Ribosom auf besondere Art zu recyceln, nämlich in Form einer Reinitiation. Somit kommt der TURBS eine duale Rolle bei dem Termination/Reinitiations-Mechanismus zu, indem sie zum Einen die 18S rRNA (40S Untereinheit des Ribosoms) und zum Anderen einen wichtigen Initiationsfaktor sowohl für das Recycling als auch für die Initiation bindet.

Da im Hefe System ein Austausch der 3 G's zu 3 C's im Motiv 1 keinen negativen Effekt auf die Expression von VP2/GFPmyc zeigte, wenn gleichzeitig eine korrespondierende 18S rRNA Mutation eingeführt und damit die Hybridisierung beibehalten wurde, kann die Primärsequenz nicht essentiell für die Bindung des eIF3 sein. Da die Auswirkung dieser Mutation bei Pöyrys Untersuchungen nahezu zum Verlust der eIF3 Bindung an die TURBS führte, erfolgt die Bindung des eIF3 vermutlich eher an eine Sekundärstruktur als an die Motiv 1 Sequenz. Allerdings ist nicht klar, welche Sekundärstruktur für die Bindung des eIF3 verantwortlich ist. Möglicherweise wird das Hybrid 18S/TURBS durch den eIF3 erkannt, allerdings bindet eIF3 auch ohne die Anwesenheit von Ribosomen an die TURBS enthaltende RNA (Pöyry et al., 2007).

5.7 Modell des Terminations/Reinitiations-Mechanismus zur Synthese des minoren Kapsidproteins beim Felinen Calicivirus

Die Ergebnisse der verschiedenen Analysen zur Reinitiation der VP2-Translation beim FCV führen zu folgendem Modell (siehe Abbildung 5.3) des zu Grunde liegenden Terminations/Reinitiations-Mechanismus:

Die Ribosomen gelangen über Translation des stromauf gelegenen ORFs in die Start/Stoppreion. Es erfolgt die Termination, und das Ribosom bzw. seine 40S Untereinheit

wird über die Hybridisierung der komplementären Region in der Helix 26 der 18S rRNA mit dem Motiv 1 innerhalb der TURBS der FCV-RNA an der Dissoziation gehindert und neu positioniert. Dazu wird das Motiv 1 über die Sekundärstruktur, die sich durch die Interaktion von Motiv 2 mit Motiv 2* ergibt, präsentiert. Über die TURBS wird das Ribosom festgehalten und am Start des ORF3 für die Reinitiation positioniert. Es erfolgt ein Recycling, bei dem unter anderem die deacylierte tRNA dissoziiert und vermutlich ebenfalls die 60S Untereinheit. Es erfolgt ein "de novo" Translationsstart mit der Initiator-tRNA^{Met}. Allerdings greift dieser Mechanismus nur bei 5-10% der Ribosomen, so dass ein Großteil der Ribosomen keine Reinitiation durchführt, sondern wie bei einer gewöhnlichen Termination dissoziiert.

Die Hybridisierung zwischen TURBS und Ribosom scheint sich somit nur bei einem geringen Anteil, der über die Translation des VP1 herangeführten Ribosomen auszubilden oder scheint relativ schwach zu sein. Die Effizienz der Reinitiation ist beim FCV geringer als beim verwandten RHDV. Beim RHDV ist eine 4x höhere Initiationsrate für das VP2 zu beobachten. Diese Tatsache geht einher mit der Beobachtung, dass das Stoppsignal beim RHDV wesentlich weiter in 3'-Richtung verlagert werden kann, ohne dass es zum Verlust der VP2-Synthese kommt. Dies spricht auch dafür, dass zumindest beim RHDV die Bindung an die TURBS vor der Termination stattfindet, so dass die 18S rRNA im Ribosom während der Expression des 3'-Bereichs des stromauf gelegenen ORFs bereits an die TURBS gebunden wird. Eine Verschiebung des Terminationssignals erhöht die Spannung, die auf der Bindung lastet und die Zeit, die zwischen Bindung und Reinitiation vergeht, so dass es bei weiterem Abstand der Terminationsstelle von der TURBS entsprechend häufiger zum Aufbrechen der Interaktion des Ribosoms mit dem Motiv 1 kommt, und daher die Reinitiationsrate mit zunehmendem Abstand des Terminationspunktes zur TURBS sinkt.

Zu welchem Zeitpunkt der eIF3 eine Rolle für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus spielt, bleibt noch zu analysieren. Entweder führt eIF3 nach der Termination zum Recycling und wird dann an die TURBS übertragen oder eIF3 bindet zunächst an die TURBS und unterstützt/ermöglicht dann das Recycling und die neue Initiation. Es bleibt zu klären, welche Faktoren an welchen Schritten des Terminations/Reinitiations-Mechanismus beteiligt sind. Vermutlich sind eIF4A und eIF4G nicht essentiell (Pöyry et al., 2007).

Die FCV-Sequenz zwischen den Motiven ist zwar für die Kodierung des VP1-C-Terminus erforderlich, spielt aber für die Reinitiation zur VP2-Synthese keine direkte Rolle. Sie kann aber die Reinitiation vermutlich sterisch behindern, wenn sie nicht in eine kompakte Struktur eingebunden ist.

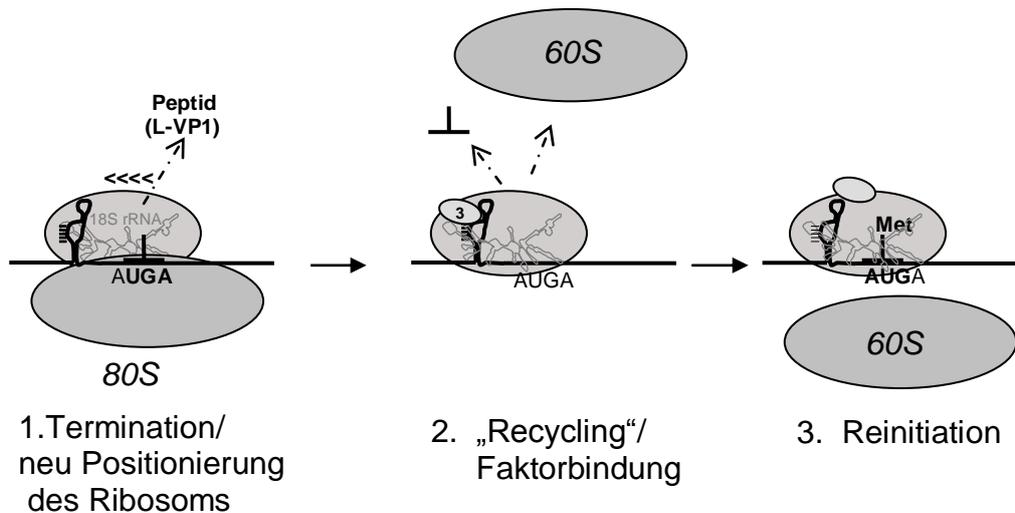


Abbildung 5.3: **Modell zum Terminations/Reinitiations-Mechanismus**

Gezeigt sind die hypothetischen Schritte des Terminations/Reinitiations-Mechanismus beim FCV. Schematisch dargestellt sind die tRNA und die ribosomalen Untereinheiten 60S und 40S, mit der 18S rRNA angegeben als Interaktionspartner der TURBS. Die FCV-mRNA ist im Bereich der Überlappung des ORF2 mit dem ORF3 dargestellt, mit der TURBS als Sekundärstruktur. Als erster essentieller Schritt ist die Termination des stromauf gelegenen Leserasters dargestellt, bei der das fertige Peptid dissoziiert, und die sich anschließende Neupositionierung des Ribosoms, welche über die Interaktion mit der TURBS vermittelt wird. Beim 2. Schritt dissoziieren vermutlich die große ribosomale Untereinheit und die deacylierte tRNA. An diesem Schritt sind wahrscheinlich verschiedene Faktoren, wie z.B. eIF3 beteiligt. Im 3. Schritt kommt es dann über die Bindung und Positionierung des Ribosoms zur Reinitiation für die Translation des stromab gelegenen Leserasters unter Beteiligung der Met-tRNA_i und vielleicht verschiedener weiterer Initiationsfaktoren. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Schritte ist z.T. hypothetisch. Ebenso ist nicht klar, ob die 60S Untereinheit tatsächlich freigesetzt und durch eine neue ersetzt wird.

5.8 Der VP2-Translationsmechanismus bei anderen Caliciviren

Das Modell zum Terminations/Reinitiations-Mechanismus, welches für das FCV (*Vesivirus*) erstellt wurde, lässt sich sehr gut mit den für das RHDV (*Lagovirus*) erhaltenen Ergebnissen vereinbaren. Dies deutet darauf hin, dass die Caliciviren aller Genera diesen Mechanismus in zumindest sehr ähnlicher Form nutzen, um das VP2-Protein ausgehend von der subgenomischen RNA zu synthetisieren. Ein Vergleich der putativen TURBS-Regionen verschiedenster Caliciviren bestätigt diese Annahme. Das essentielle Motiv 1 ist konserviert und ist in einem Abstand von 27 (SV) bis 62 (EBHSV) Nukleotiden zum Startkodon des VP2 lokalisiert. Zudem sind Regionen detektierbar, die den Motiven 2 und 2* des FCV entsprechen sollten (Abbildung 5.4). Es befindet sich jeweils eine Region direkt stromauf vom Motiv 1 (Motiv 2*), zu der eine komplementäre Region (Motiv 2) in der TURBS mit einer Distanz von 13 bis 20 Nukleotiden zum Start für das VP2 zu finden ist. Somit bilden sich vermutlich bei allen Caliciviren ähnliche Sekundärstrukturen, die aber eine unterschiedliche Größe der Schleife basierend auf der Hybridisierung dieser komplementären Regionen aufweisen. Aber die für den Mechanismus entscheidenden Fixpunkte bleiben erhalten: das Motiv 1 wird direkt oberhalb eines doppelsträngigen Stammes präsentiert, und über die Interaktion der intramolekularen komplementären Regionen wird eine bestimmte

Distanz zwischen Motiv 1 und dem Start der VP2-kodierenden Sequenz festgelegt, die das durch die RNA/RNA-Interaktion gebundene Ribosom für die Reinitiation positioniert.

	motif 2*	motif 1	motif 2	start/stop		
FCV	: gc <u>ccuccua</u> CAUGGGAAU ucaauuggc	aaagauucggcuugccu	caaacau <u>aggag</u> uucaaugacuaaa	uu <u>auga</u>	15nt	
SMSV	: uc <u>gaccuu</u> CAUGGGAGU gcagcuagcagcug	uuagcuagcauca	<u>aagguc</u> aaagaaucaaaaaggacau	<u>auga</u>	20nt	
BCV	: cuu <u>ggcc</u> CGUGGAA cguugagugcu	<u>ggccg</u> ccgccucccccggau	cg <u>auggc</u> uacuga		17nt	
RV	: gc <u>gaccuu</u> CAUGGGAGU gcagcuggcua	agauaaagcuggcgucu	<u>aagguc</u> aaaauugacagaacaacagu	<u>auga</u>	20nt	
RHDV	: gua <u>ggcc</u> UGUGGGA accagggccgucca	agagcacacucguguu	caaccu <u>ggg</u> gacagccaauggcuuuuu	<u>augucuga</u>	19nt	
EBHSV	: gugc <u>ggcc</u> UGUGGAGU ccggc	aaacacgagcacacucguguu	caaccuugccggagu	<u>ggcc</u> accacuggauuu	<u>augucuga</u>	16nt
NV	: uua <u>aagcc</u> UGUGGAA cugccagcuc	ggcaagaggu	<u>ggcuu</u> ggucugcgccga	<u>uaaug</u>	14nt	
BEC	: uu <u>ggggcc</u> UGUGGAA augcuagugu	<u>ggccg</u> cggccuccucgcuu	<u>aug</u> gcuucuga		16nt	
SV	: cu <u>ggggcc</u> GUGGAA caugggaa	<u>ggcc</u> agacgggugu	uccaa	<u>auga</u>	14nt	
PESV	: <u>uggacc</u> aa <u>GUGGAA</u> caucaggaa	<u>ggucca</u> uuca	cagcuacg	<u>auga</u>	13nt	

Abbildung 5.4: Vergleich der TURBS-Regionen verschiedener Caliciviren

Eine exemplarische Auswahl der TURBS-Sequenzen verschiedener Caliciviren, welche Mitglieder aller 4 Genera beinhaltet, ist dargestellt. Die Lokalisation der essentiellen Motive ist für die FCV-Sequenz angegeben. Start- und Stoppkodone sind in fett markiert, der konservierte Bereich des Motivs 1 ist grau unterlegt und die zur 18S rRNA Sequenz komplementäre Region ist durch Großbuchstaben hervorgehoben. Die möglichen Motive 2 und 2* sind unterstrichen. Der Abstand zwischen dem 3'-Ende des Motivs 2 und dem Startkodon des VP2-kodierenden ORFs ist rechts neben den Sequenzen angegeben.

FCV: *Felines Calicivirus*, SMSV: *San Miguel Seelöwen Virus*, BCV: *Bovines Calicivirus*, RV: „*rabbit vesivirus*“, RHDV: „*rabbit hemorrhagic disease virus*“, EBHSV: „*European brown hare syndrome virus*“, NV: *Norwalk Virus*, BEC: *Bovines Entero-Calicivirus*, SV: *Sapovirus*, PES: *Porcines Entero-Sapovirus*, WCV: *Walross Calicivirus*, CCV: *Canines Calicivirus*

5.9 Bedeutung des caliciviralen Terminations/Reinitiations-Mechanismus

Es ist sehr wahrscheinlich, dass der hier vorgestellte spezielle Terminations/Reinitiations-Mechanismus nicht nur bei der VP2-Synthese der Caliciviren genutzt wird, sondern einen weiter verbreiteten Mechanismus darstellt, der beim FCV und RHDV als erstes nachgewiesen und charakterisiert werden konnte.

So wurde bei einem bovinen Norovirus ein Terminations/Reinitiations-Mechanismus für die Translation des VP1-Proteins ausgehend von der genomischen RNA gezeigt (McCormick et al., 2008). Beim Genus *Norovirus* wie beim Genus *Vesivirus* kodiert ein separater ORF2 für das VP1-Protein, während das Hauptkapsidprotein bei den Lago- und Sapoviren im ORF1 zusammen mit den Nichtstrukturproteinen kodiert wird (Abbildung 1.3). Beim bovinen Norovirus überlappen ORF1 (Polyprotein) und ORF2 (VP1) um 4 Nukleotide. McCormick et al. konnten nachweisen, dass die Translation des VP1 abhängig von der Translation des stromauf gelegen Leserasters und vom Terminationssignal war. Analog zu den Ergebnissen zur Reinitiation der VP2-Translation beim FCV war auch hier ein AUG als Startkodon nicht essentiell. Des Weiteren wurde eine dem Motiv 1 entsprechende Region (UGUGGGAA) 30 Nukleotide stromauf vom Startkodon des ORF2 gefunden, und deren Bedeutung für die Translation des VP1 über Mutation von 3 Nukleotiden in diesem zur 18S rRNA komplementären Bereich bestätigt. Der generelle Aufbau der möglichen TURBS für die Reinitiation des VP1 beim bovinen Norovirus entspricht dem für das FCV vorgestellten Modell: direkt stromauf vom Motiv 1 findet sich ein Motiv 2*, dessen komplementäre Region (Motiv 2) sich 18 Nukleotide stromauf vom Start für das VP1 befindet. Somit basiert vermutlich zumindest bei diesem bovinen Norovirus (Genotyp III) sowohl die VP1-

Translation ausgehend von der genomischen RNA als auch die VP2-Translation ausgehend von der subgenomischen RNA auf einem Terminations/Reinitiations-Mechanismus, der von der Interaktion zwischen einem Motiv 1 und der 18S rRNA abhängt.

Aber auch außerhalb der Familie der Caliciviren konnte ein vergleichbarer Mechanismus nachgewiesen werden. Beim Influenza B Virus überlappen die für die Proteine M1 und BM2 kodierenden Leseraster auf dem antigenomischen RNA Segment 7 in einem Nukleotid. Es wurde bereits 1990 postuliert, dass es sich bei der Translation für das BM2-Protein um einen Terminations/Reinitiations-Mechanismus handelt (Horvath et al., 1990b). Nach neuen Untersuchungen basiert dieser Mechanismus ebenfalls auf einer Interaktion zwischen einem Motiv 1 (UAUGGGAA) und der 18S rRNA (Powell et al., 2008). Es konnte wie für die VP2-Synthese des FCV ebenso für die Translation des BM2 Proteins des Influenza B Virus gezeigt werden, dass die Nähe des Terminationssignals zur Startregion entscheidend ist, und ein AUG als Startkodon sowie der direkte Kontext der Startposition nicht essentiell sind. Die mögliche TURBS erstreckt sich beim Influenza B Virus über ca. 45 Nukleotide. Punktmutationen innerhalb des Motivs 1, welche die Bindung an die 18S rRNA verhindern würden, führten zur Reduktion der BM2 Translation. Mutationen, die eine Interaktion über eine G-U Paarung weiterhin erlauben würden, hatten dagegen kaum einen Einfluss auf die Translationseffizienz. Auch hier entspricht der Abstand zwischen dem möglichen Motiv 2 und dem Startkodon des BM2 kodierenden Leserasters mit 18 Nukleotiden der für die Caliciviren bestimmten Distanz. Chemische und enzymatische Strukturuntersuchungen der TURBS des Influenza B Virus deuteten auf zwei mögliche Konformationen dieser Region hin. Es wird vermutet, dass die TURBS durch die Translation des M1 moduliert wird, und dadurch eine Sekundärstruktur annimmt, die die Reinitiation unterstützt. Dies würde erklären, warum eine TURBS nicht in der Lage ist Ribosomen direkt aus dem Zytoplasma zu binden, sondern erst nachdem das Ribosom über diese Region hinweg zur Start/Stoppreregion translatiert hat.

Auch beim RHDV wurden die essentiellen Motive über Mutationsanalysen detektiert, sie weisen jedoch eine größere Ausdehnung als beim FCV auf (Meyers, 2007). Aufgrund der Deletionsanalysen der RHDV TURBS wurde eine mögliche Sekundärstruktur bestimmt (Struktur 2, Abbildung 5.5), bei der die flankierenden Bereiche der Motive in Sekundärstrukturen eingebunden sind, die vermutlich wiederum für die Kompaktheit der TURBS wichtig sind. Diese Strukturen erklären auch die Befunde, dass im Vergleich zum FCV größere Bereiche der Motive beim RHDV essentiell sind. Bei der Struktur 2 würde das Motiv 1 frei präsentiert und wäre zu einer Interaktion mit der 18S rRNA fähig (Abbildung 5.5). Nach Strukturvorhersageprogrammen wäre aber eine andere Struktur der TURBS energetisch bevorzugt (Struktur 1, Abbildung 5.5), bei der das Motiv 1 in Sekundärstrukturen eingebunden wäre. Somit könnte die TURBS zumindest beim RHDV wie beim Influenza B Virus vermutet in verschiedenen Konformationen vorliegen. Eine Struktur wäre vergleichbar mit der Struktur 1 in Abbildung 5.5, die keine Interaktion mit der 18S rRNA erlauben würde und die andere mit der Struktur 2 in Abbildung 5.5, die das Motiv 1 für die Bindung frei präsentiert. Entweder wird die Struktur 2 generell nur zu einem geringen Prozentsatz gebildet, oder deren Ausbildung wird durch das Überlesen und damit Aufschmelzen dieses Bereichs durch das Ribosom während der Elongation ermöglicht. Um ein klares Bild über die Struktur und damit Funktion der TURBS zu erhalten, müssen detaillierte Strukturuntersuchungen sowohl bei den verschiedenen Caliciviren als auch beim Influenza B Virus folgen.

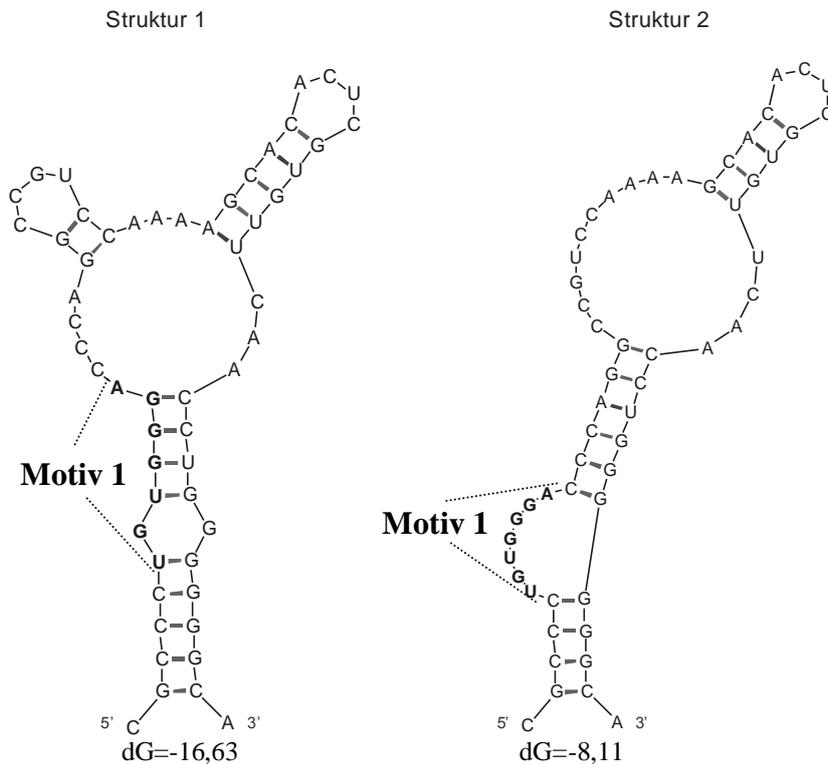


Abbildung 5.5: **Mögliche Sekundärstrukturausbildung der TURBS des RHDV**

Dargestellt sind 2 mögliche Konformationen der TURBS-Region des RHD-Virus. Die Position des Motivs 1 ist jeweils gekennzeichnet.

Ein ebenfalls auf einer stromauf der Start/Stoppreion gelegenen essentiellen Region beruhender Terminations/Reinitiations-Mechanismus wurde beim RSV (Humanes Respiratorisches Synzytial Virus) nachgewiesen (Ahmadian et al., 2000; Gould and Easton, 2005). Beim RSV überlappen die 2 ORFs der M2-mRNA, welche für die Proteine M2-1 und M2-2 kodieren, um 32 Nukleotide. Jedoch ist die essentielle stromauf gelegene Region mit >250 Nukleotiden wesentlich größer als bei den Caliciviren und dem Influenza B Virus. Weiterhin konnten in dieser Region keine definierten Motive, und keine zur 18S rRNA komplementäre Region gefunden werden. Interessant ist an diesem System, dass die essentielle stromauf gelegene Region eine stark ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist, die vermutlich eine Funktion für die Initiation hat. Ein entsprechender Mechanismus konnte auch bei den verwandten Viren PVM (Pneumonie Virus der Maus) und APV (Avian Pneumonievirus) nachgewiesen werden (Gould and Easton, 2007), er weicht jedoch von den hier für die Caliciviren vorgestellten Prinzipien deutlich ab.

Der calicivirale Terminations/Reinitiations-Mechanismus unterscheidet sich auch von der bereits länger bekannten Reinitiation bei mRNAs mit kurzen stromauf gelegenen ORF's. Die Translation erfolgt hier umso effektiver je kürzer das stromauf gelegene Raster ist. Dies beruht vermutlich auf der Tatsache, dass die Initiationsfaktoren über eine kurze Phase der Elongation am ribosomalen Komplex gebunden bleiben, und dadurch nach Translation eines kurzen Leserasters noch für eine Reinitiation zur Verfügung stehen (Kozak, 2001; Luukkonen et al., 1995), und nicht wie beim caliciviralen Mechanismus neu rekrutiert werden müssen. Da die stromauf gelegenen ORFs zumeist nicht für funktionelle Proteine kodieren, dienen sie

ausschließlich der Regulation der Translation des folgenden ORFs. So findet man solche Elemente in höheren Eukaryoten häufig zur Regulation der Expression von Proto-Onkogenen und Proteinen, die unter Stressbedingungen der Zelle exprimiert werden (Harding et al., 2000;Kozak, 2005).

Die Reinitiation bei mRNAs mit kurzem 5'-terminalen ORF ist beim GCN4 System der Hefe am besten untersucht worden. Die GCN4-Translation wird über 4 kurze stromauf gelegene ORFs reguliert (Hinnebusch, 2005). Der Faktor eIF3 bleibt während der Translation des ersten Leserasters am ribosomalen Komplex gebunden, und interagiert nach der Termination mit einem Sequenzelement, welches stromauf am 5'-Ende lokalisiert ist. Durch diese Interaktion des eIF3 mit der mRNA bleibt das Ribosom gebunden, und es kommt zu einer Reinitiation am folgenden Leseraster (Szamecz et al., 2008). Bei diesem Mechanismus spielt wie vermutlich auch bei der caliciviralen VP2-Translation die Bindung des eIF3 eine Rolle für das Reinitiationsereignis, jedoch gelten sehr unterschiedliche Voraussetzungen. Beim GCN4 System liegt unter anderem der eIF3 bereits gebunden vor, wohingegen für die Calicivirus-VP2-Reinitiation neue Faktoren rekrutiert werden müssen, oder z.T. vielleicht auch durch das Recyclingereignis nach der Termination zur Verfügung stehen. Jedoch könnten Details zur Funktion des eIF3 im GCN4 System hilfreich sein, um dessen Funktion im caliciviralen VP2-System zu verstehen.

Der hier vorgestellte calicivirale Mechanismus ist am ehesten vergleichbar mit Terminations/Reinitiationsereignissen im prokaryotischen System. Bei Prokaryoten erfolgt die Initiation unabhängig vom 5'-Ende. Ausgehend von polycistronischen RNAs werden Ribosomen aus dem freien Pool an die purinreichen Shine-Dalgarno (SD) Sequenzen gebunden. Die SD Sequenzen binden die Ribosomen über Hybridisierung mit der 16S rRNA und positionieren die Ribosomen gleichzeitig zum Start. Im prokaryotischen System erfolgen aber auch Reinitiationsereignisse nach der Termination einer Translation. Nahe einer Reinitiationsstelle ist ein nicht optimales SD-Motiv zu finden, welches zu schwach ist, Ribosomen aus dem freien Pool zu requirieren. Es wird vermutet, dass das Ribosom nach der Termination für eine limitierte Zeit eine bidirektionale Diffusion durchführt (Adhin and van, 1990). Somit erreichen einige der postterminalen Ribosomen das schwache SD Motiv, binden über die komplementäre Region der 16S rRNA an dieses SD Motiv, und es kommt zur Reinitiation. Vermutlich hat die TURBS-Region eine ähnliche Funktion bei den Eukaryoten, durch Festhalten des postterminalen Ribosoms die Reinitiation zu ermöglichen. Fraglich bleibt ob das Ribosom im eukaryotischen System den Reinitiationsstartpunkt ebenfalls durch Diffusion erreicht, bereits während der Translation an das Motiv 1 bindet oder nach der Termination aktiv an die Bindestelle (Motiv 1) in der TURBS übertragen wird. Eine Diffusion führt im prokaryotischen System dazu, dass das der Terminationsstelle am nächsten gelegene AUG genutzt wird. Da aber bei den Caliciviren nicht-AUG-Startkodone genutzt werden können, aber eine auch nur geringfügige Veränderung der Position des Startpunktes in Bezug auf die TURBS nicht toleriert wird, müssten neben einer Diffusion weiterer Faktoren an der Festlegung des Startpunktes beteiligt sein.

Die hier präsentierten Ergebnisse schlagen eine weitere Brücke über die evolutionär unterschiedlichen Arten der Translationsinitiation. Sie zeigen, dass neben dem dominierenden „Scann“-Prozess in Eukaryoten auch Prokaryoten-ähnliche Mechanismen verwendet werden. Es ist anzunehmen, dass in Zukunft neben weiteren viralen Systemen ähnliche Mechanismen auch bei zellulären Translationsprozessen nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass diese Mechanismen nicht von Viren evolviert wurden, sondern sich diese an das vorhandene Repertoire der Wirtszellen angepasst haben.

Zusammenfassung

Die Caliciviren umfassen eine Gruppe tier- und humanpathogener Viren mit einem Genom positiver Polarität. Die caliciviralen Strukturproteine werden ausgehend von einer subgenomischen RNA translatiert, die zwei überlappende Leseraster enthält. Das erste Leseraster kodiert für das virale Hauptkapsidprotein VP1 und das zweite für das minore Kapsidprotein VP2. In transienten Expressionsstudien war die VP2-Translationseffizienz ca. 20fach geringer als die des VP1.

Für das Feline Calicivirus (FCV) konnte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt werden, dass die Translation des VP2 mittels eines speziellen Terminations/Reinitiations-Mechanismus erfolgt. So konnte über verschiedene Mutanten nachgewiesen werden, dass die Translation des VP2 von der Translation des VP1 abhängt, das Ribosom bis zur Startstelle des VP2 gelangen muss, und des Weiteren die Termination der VP1-Translation in relativer Nähe zum VP2 Start erfolgen muss, damit sich eine Reinitiation ereignen kann. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ein AUG als Startkodon nicht essentiell ist. Es erfolgt jedoch eine „de novo“ Translationsinitiation unter Verwendung der spezifischen Initiator-tRNA^{Met}. Mittels Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, dass dieser spezielle Terminations/Reinitiations-Mechanismus auf einer Sequenz von ca. 70 Nukleotiden stromauf der Start/Stoppreion basiert, die als TURBS (‘‘termination upstream ribosomal binding site’’) bezeichnet wurde. Innerhalb dieser TURBS-Region konnten drei essentielle Motive bestimmt werden. Bei Motiv 1 handelt es sich um eine konservierte Region innerhalb der caliciviralen RNAs, zu der sich eine komplementäre Region innerhalb der Säuger 18S rRNA findet. Durch reziproke Austausche innerhalb des Motivs 1 sowie der komplementären 18S rRNA Region, konnte die Bedeutung der Hybridisierung dieser beiden RNAs für die Translation des VP2 in einem Hefesystem nachgewiesen werden. Diese intermolekulare Interaktion führt vermutlich zum Festhalten des postterminalen Ribosoms an der FCV-RNA.

Motiv 2 ist ca. 20 Nukleotide stromauf von der VP2 Startstelle gelegen, während Motiv 2* direkt vor Motiv 1 lokalisiert ist. Motiv 2 und 2* sind komplementär zueinander und bilden vermutlich intramolekulare Paarungen aus, die zu einer Sekundärstruktur führen, die das Motiv 1 präsentiert und einen bestimmten Abstand zum VP2-Start festlegt und somit das Ribosom am Startpunkt positioniert.

Die in der vorliegenden Doktorarbeit vorgestellten Daten, führen zu einem besseren Verständnis der Grundlagen dieses speziellen Terminations/Reinitiations-Mechanismus der Translationsinitiation bei Eukaryoten. Zum ersten Mal gelang es die mechanistische Basis für eine Translationsreinitiation höherer Zellen aufzuklären.

Summary

The family *Caliciviridae* contains positive strand RNA viruses that represent important human and animal pathogens. The caliciviral structure proteins are expressed from a subgenomic mRNA with two overlapping open reading frames (ORFs). The first ORF of this RNA codes for the viral major capsid protein VP1, and the second ORF for the minor capsid protein VP2. In transient expression studies, the efficiency of VP2 translation was about 20 times lower than that of VP1.

The studies on the feline calicivirus (FCV) showed that translation of VP2 is achieved by a special termination/reinitiation-mechanism. VP2 translation depends on translation of VP1, the ribosome has to get to the startpoint of VP2 to allow reinitiation, and the termination of VP1 translation has to occur in close vicinity to the VP2 start site. Furthermore, it was shown that an AUG is not essential as the start codon. A „de novo“ translation initiation with the specific initiator-tRNA^{Met} takes place. Deletion mapping revealed that this special termination/reinitiation-mechanism leading to expression of VP2 depends on a sequence of about 70 nucleotides upstream of the start/stop region, denoted as TURBS (“termination upstream ribosomal binding site”). The TURBS region contains 3 short sequence motifs essential for VP2 translation as determined by deletion mapping and substitution analyses. Motif 1 is conserved among caliciviruses and is complementary to part of the mammalian 18S rRNA. The importance of hybridization of these two RNAs for VP2 translation was shown in a yeast system via reciprocal exchanges within motif 1 and as well in the complementary 18S rRNA region. This intermolecular interaction leads probably to tethering of posttermination ribosomes on the FCV RNA.

Motif 2 is located ca. 20 nucleotides upstream of the VP2 startsite whereas motif 2* directly precedes motif 1. Motif 2 und 2* show sequence complementarity and are supposed to establish a intramolecular pairing leading to a secondary structure, that presents motif 1 and defines a certain distance to the VP2 startcodon and thus positions the ribosome relative to the start site.

The analyses led to a better understanding of the requirements for translation termination/reinitiation in eukaryotes. For the first time a mechanistic basis for translation/reinitiation of higher cells was found.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der 4 Phasen der Translation
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung verschiedener Translationsmechanismen
Abbildung 1.3: Genomorganisationen der 4 Calicivirus-Genera
Abbildung 1.4: FCV-Kapsid
Abbildung 2.1: Konstrukt pCH1
Abbildung 2.2: Konstrukt pCnC1
Abbildung 2.3: Konstrukt pCnN1
Abbildung 2.4: Konstrukt pCnNgfp3
Abbildung 2.5: Konstrukt pYF21A
Abbildung 2.6: Konstrukte pNOY373 und pNOY353
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des FCV-Genoms und des pCH1-Konstruktes
Abbildung 4.2: Detektion der Kapsidproteine nach transienter Expression oder Infektion mit FCV
Abbildung 4.3: Es erfolgt keine proteolytische Prozessierung des VP2 nach der Translation
Abbildung 4.4: Präzipitationsverhalten des VP1-Proteins
Abbildung 4.5: Abhängigkeit der VP2-Translation vom AUG Startkodon
Abbildung 4.6: Abhängigkeit der VP2-Expression von der Translation des VP1
Abbildung 4.7: Ein Terminationssignal ist essentiell für die VP2-Synthese
Abbildung 4.8: Die relative Nähe des Stoppkodons des ORF2 zum Startkodon des ORF3 ist entscheidend für dessen Translation
Abbildung 4.9: Bedeutung der in 3'-Richtung vom ORF3 Start gelegener Sequenzen
Abbildung 4.10: Circa 70 Nukleotide stromauf von der Start/Stoppreion sind essentiell für die VP2-Translation
Abbildung 4.11: Die TURBS-Region allein kann eine Reinitiation vermitteln
Abbildung 4.12: 12-Nukleotid-Deletionen innerhalb der TURBS
Abbildung 4.13: Detektion von 2 essentiellen Motiven innerhalb der TURBS mittels 3 Nukleotid Deletionen
Abbildung 4.14: Die Sequenz zwischen den beiden essentiellen Motiven definiert keinen bestimmten Abstand
Abbildung 4.15: 3-Nukleotid-Deletionen zwischen den Motiven
Abbildung 4.16: Die Sequenz des Motiv 1 ist bei Caliciviren konserviert
Abbildung 4.17: Einzelsubstitutionen innerhalb des Motivs 1
Abbildung 4.18: Substitutionen stromab des Motivs 1
Abbildung 4.19: Interaktion zwischen 18S rRNA und Motiv 1 im Hefesystem
Abbildung 4.20: Bedeutung der Sequenz zwischen Motiv 2 und dem Startkodon des ORF3
Abbildung 4.21: Einzelsubstitutionen innerhalb des Motivs 2
Abbildung 4.22: Substitutionen in der Sequenz, die komplementär ist zu Motiv 2
Abbildung 4.23: Untersuchung von analogen Austauschen in Motiv2 und Motiv2*
Abbildung 5.1: Mögliche Sekundärstruktur der TURBS Region des FCV
Abbildung 5.2: Mögliche Sekundärstruktur der TURBS nach Deletion von 30 Nukleotiden
Abbildung 5.3: Modell zum Terminations/Reinitiations-Mechanismus
Abbildung 5.4: Vergleich der TURBS-Regionen verschiedener Caliciviren

Literaturverzeichnis

- Adhin, M.R. and D.J. van. 1990. Scanning model for translational reinitiation in eubacteria. *J. Mol. Biol.* **213**: 811-818.
- Ahmadian, G., J.S. Randhawa, and A.J. Easton. 2000. Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *EMBO J.* **19**: 2681-2689.
- Bertolotti-Ciarlet, A., S.E. Crawford, A.M. Hutson, and M.K. Estes. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J. Virol.* **77**: 11603-11615.
- Capucci, L., P. Fusi, A. Lavazza, M.L. Pacciarini, and C. Rossi. 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* **70**: 8614-8623.
- Carter, M.J. 1990. Transcription of feline calicivirus RNA. *Arch. Virol.* **114**: 143-152.
- Carter, M.J., I.D. Milton, P.C. Turner, J. Meanger, M. Bennett, and R.M. Gaskell. 1992. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch. Virol.* **122**: 223-235.
- Chang, K.O., D.W. George, J.B. Patton, K.Y. Green, and S.V. Sosnovtsev. 2008. Leader of the capsid protein in feline calicivirus promotes replication of Norwalk virus in cell culture. *J. Virol.* **82**: 9306-9317.
- Chaudhry, Y., A. Nayak, M.E. Bordeleau, J. Tanaka, J. Pelletier, G.J. Belsham, L.O. Roberts, and I.G. Goodfellow. 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J. Biol. Chem.* **281**: 25315-25325.
- Clarke, I.N. and P.R. Lambden. 1997. The molecular biology of caliciviruses. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 2): 291-301.
- Clarke, I.N. and P.R. Lambden. 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *J. Infect. Dis.* **181 Suppl 2**: S309-S316.
- Coyne, K.P., B.R. Jones, A. Kipar, J. Chantrey, C.J. Porter, P.J. Barber, S. Dawson, R.M. Gaskell, and A.D. Radford. 2006. Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet. Rec.* **158**: 544-550.
- Daughenbaugh, K.F., C.S. Fraser, J.W. Hershey, and M.E. Hardy. 2003. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* **22**: 2852-2859.
- Dawson, S., D. Bennett, S.D. Carter, M. Bennett, J. Meanger, P.C. Turner, M.J. Carter, I. Milton, and R.M. Gaskell. 1994. Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Res. Vet. Sci.* **56**: 133-143.

- de Breyne S., J.M.Bonderoff, K.M.Chumakov, R.E.Lloyd, and C.U.Hellen. 2008. Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF5B by enterovirus 3C proteases. *Virology* **378**: 118-122.
- DiMartino B., F.Marsilio, and P.Roy. 2007. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. *Vet. Microbiol.* **120**: 173-178.
- Dominguez,D.I., L.A.Ryabova, M.M.Pooggin, W.Schmidt-Puchta, J.Futterer, and T.Hohn. 1998. Ribosome shunting in cauliflower mosaic virus. Identification of an essential and sufficient structural element. *J. Biol. Chem.* **273**: 3669-3678.
- Dresios,J., S.A.Chappell, W.Zhou, and V.P.Mauro. 2006. An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 30-34.
- Dunham,D.M., X.Jiang, T.Berke, A.W.Smith, and D.O.Matson. 1998. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch. Virol.* **143**: 2421-2430.
- Ehresmann,D.W. and F.L.Schaffer. 1977. RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *J. Virol.* **22**: 572-576.
- Farkas,T., K.Sestak, C.Weil, and X.Jiang. 2008. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J. Virol.* **82**: 5408-5416.
- FASTIER,L.B. 1957. A new feline virus isolated in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* **18**: 382-389.
- Geissler,K., K.Schneider, A.Fleuchaus, C.R.Parrish, G.Sutter, and U.Truyen. 1999. Feline calicivirus capsid protein expression and capsid assembly in cultured feline cells. *J. Virol.* **73**: 834-838.
- Geissler,K., K.Schneider, G.Platzer, B.Truyen, O.R.Kaaden, and U.Truyen. 1997. Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations. *Virus Res.* **48**: 193-206.
- Gesteland,R.F. and J.F.Atkins. 1996. Recoding: dynamic reprogramming of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 741-768.
- Glass,P.J., L.J.White, J.M.Ball, I.Leparc-Goffart, M.E.Hardy, and M.K.Estes. 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* **74**: 6581-6591.
- Glass,P.J., C.Q.Zeng, and M.K.Estes. 2003. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J. Virol.* **77**: 3569-3577.
- Goodfellow,I., Y.Chaudhry, I.Gioldasi, A.Gerondopoulos, A.Natoni, L.Labrie, J.F.Laliberte, and L.Roberts. 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* **6**: 968-972.
- Gould,P.S. and A.J.Easton. 2005. Coupled translation of the respiratory syncytial virus M2 open reading frames requires upstream sequences. *J. Biol. Chem.* **280**: 21972-21980.

Gould,P.S. and A.J.Easton. 2007. Coupled translation of the second open reading frame of M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly within the subfamily Pneumovirinae. *J. Virol.* **81**: 8488-8496.

Gradi,A., Y.V.Svitkin, H.Imataka, and N.Sonenberg. 1998. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 11089-11094.

Green,K. Y., T.Ando, M.S.Balayan, T.Berke, I.N.Clarke, M.K.Estes, D.O.Matson, S.Nakata, J.D.Neill, M.J.Studdert, and H.J.Thiel. 2000. Family Caliciviridae. in *Virus Taxonomy* (ed. M.H.V.Regenmortel, C.M.Fauquet, and D.H.L.Bishop), pp. 725-734. Academic Press, New York.

Harding,H.P., I.Novoa, Y.Zhang, H.Zeng, R.Wek, M.Schapira, and D.Ron. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**: 1099-1108.

Herbert,T.P., I.Brierley, and T.D.Brown. 1996. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J. Gen. Virol.* **77 (Pt 1)**: 123-127.

Herbert,T.P., I.Brierley, and T.D.Brown. 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 5)**: 1033-1040.

Hershey J.W.B. and W.C.Merrick. 2000. The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. in *Translational control of gene expression*. (ed. N.Sonenberg, J.W.B.Hershey, and M.B.Mathews), pp. 33-88. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Hinnebusch,A.G. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 407-450.

Hohn,T., D.Dominguez, N.ScharerHernandez, W.Schmidt-Puchta, M.Hemmings-Mieszczak, and J.Fütterer. 1988. Ribosome shunting in eukaryotes: what the viruses tell me. in *A look beyond transcription*. pp. 84-95.

Horvath,C.M., M.A.Williams, and R.A.Lamb. 1990a. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J.* **9**: 2639-2647.

Horvath,C.M., M.A.Williams, and R.A.Lamb. 1990b. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J.* **9**: 2639-2647.

Hurley,K.E., P.A.Pesavento, N.C.Pedersen, A.M.Poland, E.Wilson, and J.E.Foley. 2004. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **224**: 241-249.

Jackson,R.J. 2005. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 1231-1241.

- Kapikian,A.Z., R.G.Wyatt, R.Dolin, T.S.Thornhill, A.R.Kalica, and R.M.Chanock. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**: 1075-1081.
- Kapp,L.D. and J.R.Lorsch. 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 657-704.
- Kessler,S.W. 1981. Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol.* **73**: 442-459.
- Kozak,M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8148.
- Kozak,M. 2001. Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* **29**: 5226-5232.
- Kozak,M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**: 13-37.
- Kozak,M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**: 229-241.
- Kozak,M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**: 187-208.
- Kräusslich,H.G., M.J.Nicklin, H.Toyoda, D.Etchison, and E.Wimmer. 1987. Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* **61**: 2711-2718.
- Kuyumcu-Martinez,M., G.Belliot, S.V.Sosnovtsev, K.O.Chang, K.Y.Green, and R.E.Lloyd. 2004a. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J. Virol.* **78**: 8172-8182.
- Kuyumcu-Martinez,N.M., M.E.Van Eden, P.Younan, and R.E.Lloyd. 2004b. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell Biol.* **24**: 1779-1790.
- Laurent,S., J.F.Vautherot, M.F.Madelaine, G.G.Le, and D.Rasschaert. 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J. Virol.* **68**: 6794-6798.
- Luttermann,C. and G.Meyers. 2007. A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J. Biol. Chem.* **282**: 7056-7065.
- Luukkonen,B.G., W.Tan, and S.Schwartz. 1995. Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J. Virol.* **69**: 4086-4094.
- Machin,A., J.M.Martin Alonso, and F.Parra. 2001. Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 27787-27792.

- Makino,A., M.Shimajima, T.Miyazawa, K.Kato, Y.Tohya, and H.Akashi. 2006. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J. Virol.* **80**: 4482-4490.
- Mandell,K.J. and C.A.Parkos. 2005. The JAM family of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 857-867.
- McCormick,C.J., O.Salim, P.R.Lambden, and I.N.Clarke. 2008. Translation termination reinitiation between open reading frame 1 (ORF1) and ORF2 enables capsid expression in a bovine norovirus without the need for production of viral subgenomic RNA. *J. Virol.* **82**: 8917-8921.
- Meyers,G. 2003. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**: 34051-34060.
- Meyers,G. 2007. Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol.* **81**: 9623-9632.
- Meyers,G., C.Wirblich, and H.J.Thiel. 1991. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* **184**: 677-686.
- Neill,J.D. 1990. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Res.* **17**: 145-160.
- Neill,J.D. 2002. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res.* **87**: 89-93.
- Neill,J.D. and W.L.Mengeling. 1988b. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res.* **11**: 59-72.
- Neill,J.D. and W.L.Mengeling. 1988a. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res.* **11**: 59-72.
- Neill,J.D., R.F.Meyer, and B.S.Seal. 1995. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J. Virol.* **69**: 4484-4488.
- Neill,J.D., I.M.Reardon, and R.L.Heinrikson. 1991c. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* **65**: 5440-5447.
- Neill,J.D., I.M.Reardon, and R.L.Heinrikson. 1991b. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* **65**: 5440-5447.
- Neill,J.D., I.M.Reardon, and R.L.Heinrikson. 1991a. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* **65**: 5440-5447.
- Ohlinger,V.F., B.Haas, G.Meyers, F.Weiland, and H.J.Thiel. 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J. Virol.* **64**: 3331-3336.

Oliver, S.L., E. Asobayire, A.M. Dastjerdi, and J.C. Bridger. 2006. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* **350**: 240-250.

Ossiboff, R.J. and J.S. Parker. 2007. Identification of regions and residues in feline junctional adhesion molecule required for feline calicivirus binding and infection. *J. Virol.* **81**: 13608-13621.

Ossiboff, R.J., A. Sheh, J. Shotton, P.A. Pesavento, and J.S. Parker. 2007. Feline caliciviruses (FCVs) isolated from cats with virulent systemic disease possess in vitro phenotypes distinct from those of other FCV isolates. *J. Gen. Virol.* **88**: 506-517.

Parra, F., J.A. Boga, M.S. Marin, and R. Casais. 1993. The amino terminal sequence of VP60 from rabbit hemorrhagic disease virus supports its putative subgenomic origin. *Virus Res.* **27**: 219-228.

pDraw32. AcaClone Software. <http://www.acaclone.com>.

Pedersen, N.C., J.B. Elliott, A. Glasgow, A. Poland, and K. Keel. 2000. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* **73**: 281-300.

Pestova, T.V. and C.U. Hellen. 2003. Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev.* **17**: 181-186.

Pestova, T.V., V.G. Kolupaeva, I.B. Lomakin, E.V. Pilipenko, I.N. Shatsky, V.I. Agol, and C.U. Hellen. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**: 7029-7036.

Pestova, T.V., I.N. Shatsky, S.P. Fletcher, R.J. Jackson, and C.U. Hellen. 1998. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* **12**: 67-83.

Peterson, J.E. and M.J. Studdert. 1970. Feline picornavirus. Structure of the virus and electron microscopic observations on infected cell cultures. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **32**: 249-260.

Pisarev, A.V., C.U. Hellen, and T.V. Pestova. 2007. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**: 286-299.

Pisarev, A.V., V.G. Kolupaeva, M.M. Yusupov, C.U. Hellen, and T.V. Pestova. 2008. Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *EMBO J.* **27**: 1609-1621.

Powell, M.L., S. Naphine, R.J. Jackson, I. Brierley, and T.D. Brown. 2008. Characterization of the termination-reinitiation strategy employed in the expression of influenza B virus BM2 protein. *RNA.* **14**: 2394-2406.

- Pöyry, T.A., A.Kaminski, E.J.Connell, C.S.Fraser, and R.J.Jackson. 2007. The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. *Genes Dev.* **21**: 3149-3162.
- Pöyry, T.A., A.Kaminski, and R.J.Jackson. 2004. What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev.* **18**: 62-75.
- Prasad, B.V., M.E.Hardy, T.Dokland, J.Bella, M.G.Rossmann, and M.K.Estes. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**: 287-290.
- Prasad, B.V., D.O.Matson, and A.W.Smith. 1994. Three-dimensional structure of calicivirus. *J. Mol. Biol.* **240**: 256-264.
- Rohayem, J., I.Robel, K.Jager, U.Scheffler, and W.Rudolph. 2006. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J. Virol.* **80**: 7060-7069.
- Sachs, A. 1990. The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**: 1092-1098.
- Sachs, A.B., P.Sarnow, and M.W.Hentze. 1997. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**: 831-838.
- Schaffer, F.L., D.W.Ehresmann, M.K.Fretz, and M.I.Soergel. 1980. A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA. *J. Gen. Virol.* **47**: 215-220.
- Schägger H. and Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. pp. 368-379.
- Schmidt-Puchta, W., D.Dominguez, D.Lewetag, and T.Hohn. 1997. Plant ribosome shunting in vitro. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2854-2860.
- Schorr-Evans, E.M., A.Poland, W.E.Johnson, and N.C.Pedersen. 2003. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *J. Feline. Med. Surg.* **5**: 217-226.
- Schwartz, S., B.K.Felber, E.M.Fenyo, and G.N.Pavlikis. 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **64**: 5448-5456.
- Shine, J. and L.Dalgarno. 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* **254**: 34-38.
- Sibilia, M., M.B.Boniotti, P.Angoscini, L.Capucci, and C.Rossi. 1995a. Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.* **69**: 5812-5815.

- Sibilia, M., M.B. Boniotti, P. Angoscini, L. Capucci, and C. Rossi. 1995b. Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.* **69**: 5812-5815.
- Smiley, J.R., K.O. Chang, J. Hayes, J. Vinje, and L.J. Saif. 2002. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J. Virol.* **76**: 10089-10098.
- Sosnovtsev, S.V., G. Belliot, K.O. Chang, O. Onwudiwe, and K.Y. Green. 2005. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.* **79**: 4012-4024.
- Sosnovtsev, S.V. and K.Y. Green. 2000. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* **277**: 193-203.
- Sosnovtsev, S.V., S.A. Sosnovtseva, and K.Y. Green. 1998. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J. Virol.* **72**: 3051-3059.
- Sosnovtseva, S.A., S.V. Sosnovtsev, and K.Y. Green. 1999. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J. Virol.* **73**: 6626-6633.
- Stuart, A.D. and T.D. Brown. 2007. Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J. Gen. Virol.* **88**: 177-186.
- Stuart, A.D. and T.D. Brown. 2006. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J. Virol.* **80**: 7500-7509.
- Szamecz, B., E. Rutkai, L. Cuchalova, V. Munzarova, A. Herrmannova, K.H. Nielsen, L. Burela, A.G. Hinnebusch, and L. Valasek. 2008. eIF3a cooperates with sequences 5' of uORF1 to promote resumption of scanning by post-termination ribosomes for reinitiation on GCN4 mRNA. *Genes Dev.* **22**: 2414-2425.
- Thiel, H.J. and M. König. 1999. Caliciviruses: an overview. *Vet. Microbiol.* **69**: 55-62.
- Traum J. 1936. Vesicular exanthema of swine. pp. 316-334. J. Am. Vet. Med. Assoc..
- Ueda, K., J.H. Park, K. Ochiai, and C. Itakura. 1992. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn. J. Vet. Res.* **40**: 133-141.
- Wai, H.H., L. Vu, M. Oakes, and M. Nomura. 2000. Complete deletion of yeast chromosomal rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements in vivo. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3524-3534.
- Willcocks, M.M., M.J. Carter, and L.O. Roberts. 2004. Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *J. Gen. Virol.* **85**: 1125-1130.

Wilson, J.E., M.J.Powell, S.E.Hoover, and P.Sarnow. 2000. Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol. Cell Biol.* **20**: 4990-4999.

Wimmer, E. 1982. Genome-linked proteins of viruses. *Cell* **28**: 199-201.

Wirblich, C., M.Sibilia, M.B.Boniotti, C.Rossi, H.J.Thiel, and G.Meyers. 1995. 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J. Virol.* **69**: 7159-7168.

Wirblich, C., H.J.Thiel, and G.Meyers. 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J. Virol.* **70**: 7974-7983.

Wyatt, L.S., B.Moss, and S.Rozenblatt. 1995. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* **210**: 202-205.

Yoon, H.J. and T.F.Donahue. 1992. The suil suppressor locus in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a translation factor that functions during tRNA(iMet) recognition of the start codon. *Mol. Cell Biol.* **12**: 248-260.