

**Einfluss VP2-kodierender Sequenzen und
verschiedener Translationsinitiationsfaktoren
auf die Translationsreinitiation
des kleinen Kapsidproteins beim Felinen Calicivirus**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl. Humanbiol. Maria Haß
aus Greifswald

Tübingen
2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.09.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gregor Meyers

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

Meinen Eltern

Die Wissenschaft - richtig verstanden - heilt Menschen von ihrem unangebrachten Stolz,
denn sie zeigt ihnen ihre Grenzen (Albert Schweitzer)

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gregor Meyers für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung während dieser Arbeit und darüber hinaus. Mit seiner Ruhe und Geduld, aber vor allem auch durch seine Erfahrung und Ideen konnte er mich in scheinbar ausweglosen Momenten wieder motivieren und mir neue Wege aufzeigen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović danke ich für sein Interesse und seine Bereitschaft, diese Arbeit gegenüber der Fakultät zu vertreten sowie für die Anfertigung des Gutachtens.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern am Institut für Immunologie in Tübingen und Greifswald-Insel Riems, die während meiner gesamten Zeit am FLI zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, darunter Prof. Dr. Lothar Stitz, PD Dr. Michael Knittler und Dr. Heiner Voigt.

Herzlicher Dank gilt Dr. Christine Luttermann und Dr. Daniel Aberle für die stets kompetenten Ratschläge bei der Lösung anfallender Probleme und den regen Gedankenaustausch im Labor oder bei der spät nachmittäglichen Kaffeepause.

Für das nette Arbeitsklima und die freundliche Hilfe bei allen Fragen danke ich Dr. Ioana Bintintan, Dr. Eva-Maria Schürmann, Dr. Sandra Burrack-Lange, Sabine Wirtz, Janett Wieseler, Maren Ziegler, Derya Batur und Gaby Stooß. Unvergessen bleiben Petra Wulle und ihre hervorragende technische Unterstützung.

Ihnen allen und Elke Straub danke ich außerdem auch für den über das Labor hinausgehenden Spaß und die gemeinsamen Freizeitaktivitäten.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, die mich in jeglicher Hinsicht immer bedingungslos und liebevoll unterstützt und gefördert sowie beharrlich weiter angetrieben hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	i
Inhaltsverzeichnis.....	ii
Abkürzungen.....	v
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Caliciviridae</i>	1
1.2 Felines Calicivirus.....	2
1.2.2 Epidemiologie und Pathogenese.....	2
1.2.2 Partikel Aufbau und Morphologie.....	3
1.2.3 Genomorganisation und Strategie der Genexpression.....	4
1.3 Translation.....	7
1.3.1 Translationsinitiation und Translationsinitiationsfaktoren.....	8
1.3.2 Alternative Strategien zur Translationsinitiation.....	11
1.4 Posttranskriptionelle Blockierung der Genexpression: RNA-Interferenz.....	13
1.5 Fragestellung.....	15
2. Material.....	16
2.1 Antikörper.....	16
2.2 Biologisches Material.....	16
2.2.1 Zellen.....	16
2.2.2 Bakterienstämme.....	17
2.2.3 Viren.....	17
2.3 Geräte.....	17
2.4 Verbrauchsmaterial.....	18
2.5 Reagenzien.....	19
2.5.1 Chemikalien.....	19
2.5.2 Radiochemikalien.....	21
2.5.3 Enzyme, Größenmarker, Proteine, Inhibitoren.....	21
2.5.4 Verwendete Kits und vorgefertigte Systeme.....	21
2.6 Verwendete Software und URLs.....	22
2.7 Medien und Zusätze für die Zell- und Bakterienkultur.....	23
2.8 Lösungen und Puffer.....	24
2.9 Oligonukleotide.....	28
2.9.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	28
2.9.2 Oligonukleotide für die Mutagenese.....	29
2.9.3 Oligonukleotide für die shRNA.....	33
2.10 Plasmide.....	35
2.10.1 Käuflich erworbene Plasmide.....	35
2.10.2 Zur Verfügung gestellte Plasmide.....	35
2.10.3 Plasmide aus eigener Herstellung.....	37
3. Methoden.....	39
3.1 Zellbiologische Methoden.....	39
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	39
3.1.2 Verschiedene Transfektionsmethoden.....	39
3.1.3 Nachweis exprimierter Proteine durch direkte Fluoreszenz.....	40

3.1.4	Transiente Proteinexpression in BHK-21 Zellen mit Hilfe von Vacciniavirus MVA-T7.....	40
3.1.5	Radioaktive metabolische Markierung transient transfizierter Zellen.....	40
3.1.6	Vaccinia MVA-T7 Virusanzucht.....	40
3.1.7	Titration von Vaccinia MVA-T7 Viren und Titerberechnung.....	41
3.2.	Mikrobiologische Methoden.....	42
3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	42
3.2.2	Hitzeschock Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	42
3.2.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	42
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.3.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43
3.3.2	Gelfiltration von Nukleinsäuren über Sephadex® G-50-Säulen.....	43
3.3.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion.....	43
3.3.4	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren.....	43
3.3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
3.3.6	Reverse Transkription (RT-PCR).....	44
3.3.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	45
3.3.8	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
3.3.9	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	45
3.3.10	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	45
3.3.11	Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	46
3.3.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	46
3.3.13	DNA-Sequenzierung.....	46
3.3.14	Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen.....	47
3.3.15	<i>in vitro</i> -Transkription.....	47
3.3.16	Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese.....	47
3.3.17	Northern Blot.....	48
3.3.18	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	48
3.3.19	Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden-DNA an membrangebundene RNA.....	48
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	49
3.4.1	Aufarbeitung der Gesamtproteine aus transfizierten Zellen.....	49
3.4.2	Immunpräzipitation.....	49
3.4.3	<i>in vitro</i> -Translation.....	49
3.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
3.4.5	Western Blot.....	50
3.4.6	Immundetektion der Proteine nach dem Western Blot.....	50
3.4.7	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i> , FACS).....	51
4.	Ergebnisse.....	52
4.1	Bedeutung von im 5'-Bereich des VP2 kodierten Sequenzen für die Translationsreinitiation des FCV.....	52
4.1.1	Sequenzvergleich der VP2 kodierenden Sequenz verschiedener FCV Stämme.....	53
4.1.2	Mutationsanalysen.....	54
4.1.2.1	Deletionen.....	54
4.1.2.2	Substitutionen.....	56
4.1.2.3	Stoppmutationen.....	58
4.1.3	Die Rolle von Stoppkodon #2 und #3.....	60
4.1.4	Stoppkodon #4 im dritten Leseraster.....	61

4.1.5	Gibt es Interaktionen mit anderen Bereichen der subgenomische mRNA, die die Translationsreinitiation beeinflussen?.....	63
4.1.6	Strukturvorhersage und Bedeutung der Struktur für die Translationsreinitiation.....	67
4.1.6.1	Einfluss der Haarnadelschleife.....	69
4.1.7	Vergleichende Analysen zum RHDV.....	72
4.1.7.1	Strukturvorhersage für die 5'-terminale Region der VP2 kodierenden Sequenz des RHDV.....	73
4.1.7.2	Bedeutung der Abstandssequenz zwischen Motiv 2 und der Start/Stoppstelle.....	75
4.2	Einfluss verschiedener Translationsinitiationsfaktoren auf die Translationsreinitiation des FCV.....	76
4.2.1	Si- und shRNA Design.....	76
4.2.2	Vektor.....	79
4.2.3	Etablierung der Vektoren und erste Transfektionsstudien.....	79
4.2.4	Spezifische Reduktion der mRNA Mengen nach shRNA Transfektion.....	81
4.2.5	Überprüfung der Proteinmenge nach RNA-Interferenz.....	83
4.2.6	Etablierung eines geeigneten Testsystems - Parameterwahl (Konstrukte, Zellen und andere).....	86
4.2.7	Bedeutung einzelner Translationsinitiationsfaktoren für die FCV VP2 Synthese.....	90
5.	Diskussion.....	95
5.1	Untersuchungen zur Bedeutung von Sequenzmotiven und putativen Sekundärstrukturen in der VP2 kodierenden Region für die Reinitiation.....	97
5.2	Bedeutung verschiedener Translationsinitiationsfaktoren für die Reinitiation.....	100
5.2.1	Reduktion der Menge einzelner Translationsinitiationsfaktoren durch RNA-Interferenz.....	102
5.2.2	Bedeutung der Translationsinitiationsfaktoren.....	103
5.2.3	Cap-unabhängige und -abhängige VP1-Synthese.....	104
5.2.4	Alternative Ansätze.....	105
5.2.5	Modellmechanismus der Reinitiation.....	107
	Zusammenfassung.....	109
	Summary.....	111
	Abbildungsverzeichnis.....	113
	Literaturverzeichnis.....	114
Anhang:	Multipler Sequenzabgleich verschiedener Spezies für die Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF5A, eIF5 und eIF5B.....	123
	Lebenslauf.....	139

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
³² P	Phosphor Radionuklid
³⁵ S	Schwefel Radionuklid
∞	unendlich
ΔG	Änderung der freien Energie
μ	Mikro-
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AGO	Argonautenprotein
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>aqua bidest.</i>	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
BEC	<i>Bovine Enteric Calicivirus</i>
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney-21</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Centi-
cal	Kalorie
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CDS	<i>Coding sequence</i> , kodierende Region
CHV1	Cryphonectria Hypovirus 1
Ci	Curie
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	<i>Cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
<i>CrPV</i>	<i>Cricket paralysis virus</i>
C-term(inal)	Carboxyterminal
C-Term(inus)	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
Cys	Cystein
d	defizient
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholinsäure

ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBHSV	<i>European Brown Hare Syndrome Virus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(e)EF	(Eukaryotischer) Elongationsfaktor
(e)IF	(Eukaryotischer) Translationsinitiationsfaktor
EMBL-EBI	<i>European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute</i>
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
engl.	englisch
EP	Elektroporation
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> , und andere
EtOH	Ethanol
F	Farad
f/ for	<i>forward</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS/ FKS	Fötales Kälberserum
FCV	Felines Calicivirus
FCV-UKOS	Felines Calicivirus, <i>UK outbreak strain</i>
fJAM-A	<i>Feline junctional adhesion molecule A</i>
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FMD(V)	<i>Foot-and-Mouth-Disease (Virus)</i>
G	Guanin
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i> , GTP-Austauschfaktor
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein, aus der Koralle <i>Renilla reniformis</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Destilliertes Wasser
HCV	Hepatitis-C-Virus
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
http	<i>Hypertext transfer protocol</i>
huCV	Humanes Calicivirus
huNV	Humanes Norovirus
IF	Initiationsfaktor
IFN	Interferon
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin
IGR	<i>Intergenic region</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> , Interne Ribosomen-Eintrittsstelle

JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
k	Kilo
kb/ Kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KID50	Kulturinfektiöse Dosis 50
l	Liter
LB	<i>Luria Bertani</i>
M	Molar (mol/l)
M	Motiv
m	Meter
m	Milli-
Met	Methionin
MFC	Multifaktorieller Komplex
min	Minute
miRNA	<i>Micro RNA</i>
MKS	Maul-und-Klauenseuche
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mol	Molar
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
MVA	<i>Modified Virus Ankara</i>
MW	<i>Molecular weight</i> , Molekulargewicht
N	Normal
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	Nukleotid
N-term(inal)	Aminoterminal
N-term(inus)	Aminotermminus
NTR	<i>Non translated region</i> , nicht-translatierte Region
Ø	Durchmesser
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> , offener Leserahmen
p	Pico-
PABP	Poly(A)-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>P-bodies</i>	<i>Processing bodies</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEC	<i>Porcine Enteric Calicivirus</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potential hydrogenii</i> , (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PIC	43S Präinitiationskomplex
PKC	Proteinkinase C

PKR	Proteinkinase R
PO	Peroxidase
pre-miRNA	<i>Precursor miRNA</i>
pri-miRNA	<i>Primery miRNA</i>
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencing</i> , posttranskriptionelle Genblockade
r/ rev	<i>reverse</i>
RACK1	<i>Receptor for activated C kinase</i>
RHD(V)	<i>Rabbit Haemorrhagic Disease (Virus)</i>
RIP	Radioimmunpräzipitation
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RL	Renilla
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
RRL	<i>Ribosome release factor</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMSV	San-Miguel-Seelöwen-Virus
ss	einzelsträngig
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TC	Ternärer Komplex
TE	Tris-EDTA-Puffer
TE	<i>Translation Enhancer</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-SDS-Puffer
TMV	<i>Tobacco Mosaic Virus</i>
tRNA	Transfer-RNA
tRNA _i ^{Met}	Methionin beladene Initiator-tRNA
TURBS	<i>Termination Upstream Ribosomal Binding Site</i>
U	Unit (Aktivitätseinheit bei Enzymen)
U	Uracil
UK	<i>United Kingdom</i>
ün	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
URL	<i>Uniform Resource Locator</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VESV	<i>Vesicular Exanthema of Swine Virus</i>

Vgl.	Vergleich
VLP	<i>Virus like particle</i>
VP1	Virales Protein 1
VP2	Virales Protein 2
VPg	<i>Viral protein genome-linked</i>
VSD	<i>Virulent systemic disease</i>
w/v	Gewicht pro Volumenprozent
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 *Caliciviridae*

Die Familie der Caliciviren besitzt ein sehr breites Wirtsspektrum. Beim Menschen werden durch Caliciviren hauptsächlich akute Gastroenteritiden oder vesikuläre Läsionen ausgelöst. Außerdem kommt es beim Menschen und bei vielen Säugetieren nach einer Infektion mit Caliciviren zu respiratorischen Krankheiten mit Konjunktivitis und Stomatitis sowie hämorrhagischen Erkrankungen.

Die erste Infektion durch Caliciviren wurde 1932 durch Madin und Traum (1955) beschrieben. Das Virus des vesikulären Exanthems des Schweines (Vesicular Exanthema of Swine Virus, VESV) verursachte in Kalifornien eine Epidemie bei Schweinen, vermutlich durch die Verfütterung von rohen Speiseabfällen. Die durch VESV hervorgerufenen klinischen Symptome ähneln denen der Maul-und-Klauenseuche (MKS bzw. Foot-and-Mouth-Disease, FMD), es kommt zur Vesikelbildung sowohl im Bereich des Mauls als auch an den Füßen.

Wie VESV führt auch das San-Miguel-Seelöwen-Virus (SMSV) zu einer vesikulären Erkrankung bei empfänglichen Säugetieren (Neill *et al.*, 1995). SMSV wurde erstmals 1972 aus fehlgebärenden kalifornischen Seelöwen isoliert.

Zunächst wurde eine Verwandtschaft der Calici- mit den Picornaviren angenommen. 1978 wurden die Caliciviren jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur, Genomorganisation, Replikationsstrategie und physikochemischen Eigenschaften ausgegliedert und stellen seit 1979 eine eigenständige Virusfamilie dar (Thiel und König, 1999). Viren, die zur Familie der *Caliciviridae* gehören, wurden auch bei Rindern, Skunks, Seerobben, Walen, Seeelefanten und Walrossen gefunden. Ab 1982 galten der Nordpazifik und die Beringsee als ozeanisches Reservoir für Caliciviren. Mutmaßlich waren jedoch eher Fische und andere Meeresprodukte Überträger von marinen Caliciviren auf terrestrische Tiere als Meeressäugtiere (Smith *et al.*, 1998).

Taxonomisch wurden die Caliciviren lange in die vier Genera *Vesi-*, *Noro-*, *Sapo-* und *Lagovirus* unterteilt (Green *et al.*, 2000). Seit wenigen Jahren gehören als eine fünfte Gruppe die Neboviren dazu (Carstens 2010).

Noro- und Sapoviren verursachen beim Menschen eine akute Gastroenteritis, weshalb die Infektionen anfangs einem einzigen humanen Calicivirus (huCV) zugeschrieben wurden. Aufgrund der morphologischen Diversität sowie der unterschiedlichen Genomorganisation erhielten beide Genera später ihren Namen entsprechend der geografischen Lage der ersten beschriebenen Ausbrüche dieser Infektionen beim Menschen. Der erste diagnostizierte Norovirus-Ausbruch fand 1968 in Norwalk, Ohio in den USA statt. Daher wurde diese Spezies auch als Norwalk-Virus bezeichnet. Erst im Jahr 1972 wurden die Noroviren mittels immunoelektronenmikroskopischen Untersuchungen charakterisiert (Kapikian *et al.*, 1972) und damals noch als Picorna- oder Pircorna-ähnliche Viren beschrieben. Heutzutage sind Norovirus Infektionen nach §7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) meldepflichtig.

Die erste Sapovirus-Infektion trat wahrscheinlich 1982 in einem Waisenhaus in Sapporo in Japan auf. Demzufolge wurde diese Spezies Sapporovirus benannt. Sapoviren lösen vor allem bei Babys und Kleinkindern eine milde Gastroenteritis aus.

Der Name der Lagoviren (griechisch *lagos* (λαγός) „Hase“ bzw. Lagomorpha- „hasenartige“ Säugetiere) spiegelt den Wirtsbereich der Vertreter dieses Genus wider. Die ersten Erkrankungen wurden 1982 durch das European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV) in Dänemark und 1984 durch das Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) bei Kaninchen in China dokumentiert. Anders als Vertreter anderer Genera der Caliciviren führen Lagovirus-Infektionen zu schwerwiegenden Symptomen wie massiver Lebernekrose und verbreiteter intravaskulärer Koagulation. Erstmals 1990 in Ohlinger *et al.* wurde ein Calicivirus als kausatives Agens für die

RHD identifiziert. Mit einer Mortalität von über 80% zählt RHDV zu den hochpathogenen Viren (Capucci *et al.*, 1996).

Das Genus *Nebovirus* umfasst eine Reihe erst kürzlich aufgetretener Viruspezies, welche sich von den bovinen Noroviren unterscheiden, aber dennoch wie diese eine Enteritis bei Rindern hervorrufen. Von Oliver *et al.* war 2006 zunächst der Name Beco- oder Nabovirus vorgeschlagen worden. Becovirus sollte dabei für Bovine Enteric Calicivirus stehen und direkt Auskunft über die infizierte Spezies sowie die ausgelöste Erkrankung geben, wie es auch bei vielen Lago- und Vesiviren der Fall ist. Der alternative Name Nabovirus basierte auf den zwei zuerst entdeckten Viren des neuen Genus: dem Newbury Agent-1, das 1976 identifiziert wurde, sowie dem Nebraska-Virus.

Zu den Neboviren zählt neben diesen beiden ebenfalls das Newbury Agent-2 sowie das 2002 von Smiley *et al.* beschriebene Bovine Enteric Calicivirus (BEC), welches vor allem in jungen Kälbern eine Diarrhö verursacht. BEC ist auf Basis von phylogenetischen Analysen am nächsten mit den Lagoviren verwandt.

Zum letzten Genus, den Vesiviren, gehören neben dem bereits zuvor beschriebenen VESV, welches für die ersten verzeichneten caliciviralen Infektionen verantwortlich war, das SMSV sowie das in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Feline Calicivirus (FCV). FCV löst bei Katzen Atemwegserkrankungen aus. Erstmals in Zellkultur isoliert wurde dieses Virus in Neuseeland (Fastier 1975). Wie bei den Noroviren wurde auch für VESV, SMSV und FCV zunächst eine Verwandtschaft mit den Picornaviren angenommen.

1.2 Felines Calicivirus

1.2.1 Epidemiologie und Pathogenese

Das Feline Calicivirus ist in Katzenpopulationen weit verbreitet und wird fäkal-oral oder durch Aerosole übertragen. Die Virusvermehrung findet hauptsächlich im Mund- und Rachenraum statt. Die durch die Infektion verursachte Krankheit kann ohne klinische Symptome verlaufen, führt aber häufig bei den Katzen zu einer Konjunktivitis, Erkrankungen des oberen respiratorischen Traktes oder einer Stomatitis. Das breite Spektrum an Symptomen beinhaltet außerdem orale Geschwüre zum Beispiel an der Zunge und seltener das Hinken der Katzen, Aborte oder schwere Pneumonien. Die Krankheit verläuft epidemisch und neben akuten gibt es auch chronische Formen. Bislang gibt es keine Einteilung in verschiedene Biotypen (Geissler *et al.*, 1997).

Um die Jahrtausendwende kam es zum Auftreten mehrerer hochvirulenter FCV Stämme: Der erste Ausbruch wurde 1998 in Kalifornien verzeichnet. Das Virus (*FCV-Ari*) war genetisch ähnlich zu weniger pathogenen Stämmen, die Symptome erinnerten jedoch an hämorrhagische Erkrankungen wie sie durch das RHDV hervorgerufen werden (Pedersen *et al.*, 2000). Der zweite Ausbruch (*FCV-Diva*) 2001 in Massachusetts ging mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (Schorr-Evans *et al.*, 2003). Ein dritter Ausbruch in Kalifornien wurde in Hurley *et al.* (2004) dokumentiert. Nachdem diese hochvirulenten Stämme bis dahin nur in den USA aufgetreten waren, erschien 2003 das erste hochvirulente Virus in Großbritannien. Durch Quarantänemaßnahmen konnte das Virus (*FCV-UKOS, UK outbreak strain*) unter Kontrolle gebracht werden. Auffällig war, dass ausgewachsene Katzen stärker betroffen waren als junge. Alle diese Ausbrüche waren verbunden mit einer neuen Stärke an Symptomen, die dazu führte, dass die Krankheit zuerst als „hämorrhagisch-ähnliches Fieber“ und danach als „FCV-assoziierte virulent systemische Erkrankung“ (*FCV-associated virulent systemic disease, VSD*) bezeichnet wurde (Coyne *et al.*, 2006). Im Jahr 2005 trat in Frankreich ein FCV-VSD in einem Veterinärlehrkrankenhaus auf (Reynolds *et al.*, 2009). Letztlich wurden die hochvirulenten Stämme unter dem Namen „virulent systemisches (VS-) FCV“ zusammengefasst. Die Mortalität bei Katzen, die mit diesen Viren infiziert waren, lag bei über 50%. Zu den klinischen Symptomen

zählen hier hohes persistierendes Fieber, Appetitlosigkeit, Depressivität, Haut- und Lungenödeme sowie im Gesicht und an den Gliedmaßen, Wunden und Haarausfall im Gesicht, an den Ohren und den Füßen sowie neben Gerinnungsstörungen auch Pankreatitis und Lebernekrosen. Es konnte gezeigt werden, dass Stämme des VC-FCV in Zellkultur deutlich schneller wachsen (Ossiboff *et al.*, 2007). In allen beschriebenen Fällen waren auch vakzinierte Katzen betroffen, weshalb aktuelle Impfstoffe vermutlich nicht schützen (Radford *et al.*, 2006).

1.2.2 Partikelbau und Morphologie

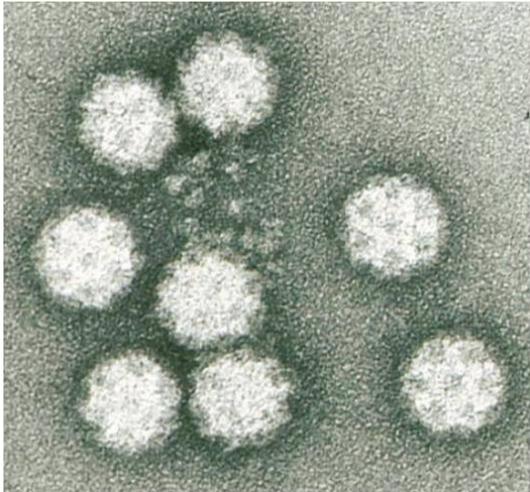


Abb. 1.1: EM-Aufnahme eines aufgereinigten FCV-Partikels
(Frank Weiland, FLI Tübingen)

Caliciviren sind nicht umhüllt und haben einen Durchmesser von etwa 30-40nm. Das ikosaedrische Kapsid besteht aus 90 Homodimeren des Hauptkapsidproteins VP1 (Peterson und Studdert, 1970; Prasad *et al.*, 1994) sowie wenigen Molekülen des minoren Kapsidproteins VP2 (Sosnovtsev und Green, 2000; Luttermann und Meyers, 2007). Die oberflächlichen Vertiefungen der Partikel sind verantwortlich für den Namen Calicivirus (lateinisch *calix* „Becher“, „Kelch“, „Pokal“). In Abb. 1.1 ist ein Partikel des FCV dargestellt. Beim FCV ist die carboxyterminale Domäne des VP1, die die Oberfläche des Viruspartikels bildet, die variabelste Region des viralen Proteoms und mutmaßlich immun-

dominant. VP1 setzt sich aus den zwei Domänen S und P zusammen. Die VP1 Domäne S besitzt ein β -Faltblatt-Motiv und formt die innere Schicht des Kapsids, die die RNA gegen den Außenbereich abschirmt. Die Domäne P des VP1 ragt aus dem Partikel heraus und bildet brückenähnliche Strukturen aus. Diese sind für die typische Morphologie der Caliciviren verantwortlich. Die VP1 Domäne P wird in die Regionen P1 und P2 unterteilt. Die hypervariable Region P2, ein Insert in P1, befindet sich am äußersten Rand eines Kapsomers. Sie enthält verschiedene Epitope, gegen die neutralisierende Antikörper gebildet werden können (Bhella *et al.*, 2008).

FCV bindet nur an Zellen feline Ursprungs. Der Rezeptor für das FCV ist das *feline junctional adhesion molecule A* (fJAM-A) (Makino *et al.*, 2006). *Junctional adhesion molecules* bzw. JAM-Proteine (JAMs) gehören zur Immunglobulin (Ig) -Superfamilie und spielen vermutlich eine Rolle bei unterschiedlichen zellulären Prozessen wie beispielsweise der Bildung apikaler *tight junctions*, der Leukozytenmigration, der Plättchenaktivierung oder der Angiogenese (Mandell und Parkos, 2005). Außer FCV nutzt auch das Reovirus JAM-A als Rezeptor. Durch Stuart und Brown wurde 2006 gezeigt, dass der Viruseintritt in die Zelle abhängig ist von der Clathrin-vermittelten Endozytose sowie der Ansäuerung des den Partikel umgebenden Milieus. Dies gewährleistet dann die Membranpenetration und Freisetzung des Genoms ins Zytoplasma.

Die Charakterisierung der fJAM-A-FCV-Bindung erfolgte 2007 durch Ossiboff und Parker. JAM-A ist ein Typ 1 Transmembranglykoprotein mit einem N-terminalen Signalpeptid, zwei Ig-Domänen, einer C-terminalen Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil. Die Analyse des Virus-Rezeptor-Komplexes erfolgte wenig später auch im Cryo-Elektronenmikroskop sowie durch *homology modeling*. Dabei konnte gezeigt werden, dass die membran-ferne Ig-Domäne 1 des fJAM-A an die Außenseite der P2 Region des FCV VP1

bindet, was zu einer Konformationsänderung im viralen Kapsid und höchstwahrscheinlich zur Freisetzung des viralen Genoms führt (Bhella und Goodfellow, 2011).

Zusätzlich wurde eine mögliche Anheftung des Virus an $\alpha(2,6)$ -Sialinsäure beschrieben (Stuart und Brown, 2007). Viele Viren nutzen Proteoglykane als ersten Bindungspartner an der Zelle. Während aviäre Influenzaviren an $\alpha(2,3)$ -Sialinsäure und humane Influenzaviren an $\alpha(2,6)$ -Sialinsäure binden (Burnet, 1951), erfolgt die Anheftung der humanen Noroviren an Blutgruppenantigene (Marionneau *et al.*, 2002).

Sowohl eine potentielle Anheftung des Virus an $\alpha(2,6)$ -Sialinsäure als auch die fJAM-A-FCV-Bindung sind Faktoren, die den viralen Tropismus mit bestimmen. Die Verfügbarkeit eines Rezeptors auf der Zielzelle ist Voraussetzung für eine Infektion. Somit bestimmen fJAM-A und möglicherweise $\alpha(2,6)$ -Sialinsäure, ob eine Bindung bzw. eine Infektion erfolgt.

1.2.3 Genomorganisation und Strategie der Genexpression

Alle Caliciviren besitzen ein kleines einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einer Größe von circa 7,5kb. Je nach Genus weist dieses entweder zwei oder drei offene Leseraster (*open reading frame*, ORF) auf (Clarke und Lambden, 1997) (Abb. 1.2). Das Genom der Caliciviren trägt N-terminal ein kovalent gebundenes VPg (*viral protein genome-linked*) (Burroughs und Brown, 1978; Schaffer *et al.*, 1980; Meyers *et al.*, 1991; Dunham *et al.*, 1998) und ist am C-Terminus polyadenyliert (Ehresmann und Schaffer, 1977).

Das VPg der Caliciviren unterscheidet sich in Größe und bisher bekannten Funktionen deutlich von dem der Picornaviren. Die Rolle des VPg für die Infektion war lange unklar. Inzwischen wird angenommen, dass das VPg als Analogon für die Cap-Struktur fungiert und die Translationsinitiation vermittelt (Rohayem *et al.*, 2006), indem es verschiedene Translationsinitiationsfaktoren bindet, darunter eIF3 (Daughenbaugh *et al.*, 2003) und eIF4E (Goodfellow *et al.*, 2005).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zu den Picornaviren besteht darin, dass bei den Picornaviren die Nichtstrukturproteine 3'-terminal kodiert werden, während bei den Caliciviren die für die Kapsidproteine VP1 und VP2 kodierenden Sequenzen 3'-terminal zu finden sind. Wie bei den Picornaviren werden die viralen Proteine als Vorläuferprotein exprimiert und durch eine virale Protease prozessiert (Clarke und Lambden, 2000). Allen Caliciviren ist die Existenz einer subgenomischen RNA von 2,2 - 2,4kb gemein (Ehresmann und Schaffer, 1977), deren Sequenz identisch zum genomischen 3'-Ende ist und für die Strukturproteine kodiert (Abb. 1.2).

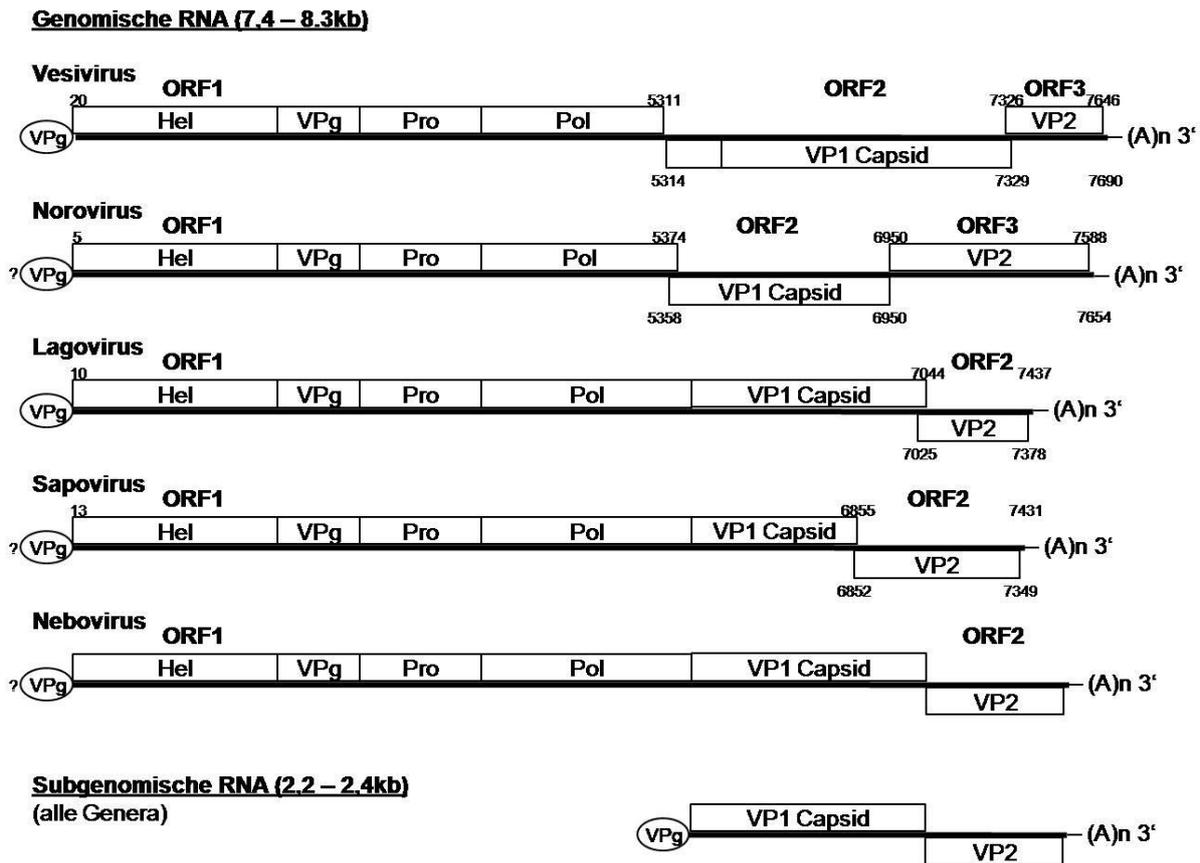


Abb. 1.2: Genomorganisation der Mitglieder der Familie *Caliciviridae*
modifiziert nach Green *et al.* (2000)

Die Abbildung veranschaulicht den Aufbau des Genoms für die fünf verschiedenen Genera der Caliciviren. Am 5'-Ende befindet sich vermutlich bei allen Caliciviren ein kovalent gebundenes VPg und das 3'-Ende ist polyadenyliert ((A)n). Dargestellt sind die verschiedenen offenen Leseraster und ihre Position innerhalb des Genoms sowie wichtige daraus resultierende virale Proteine (Helikase, Hel; *viral protein genome-linked*, VPg; Protease, Pro; Polymerase, Pol; Kapsidproteine VP1 und VP2). Für alle Genera wird eine subgenomische RNA ausgebildet, die wie im unteren Teil dargestellt, identisch mit dem 3'-Ende der genomischen RNA ist und für die Kapsidproteine kodiert.

Das Genom des FCV und die subgenomische RNA tragen wie oben bereits beschrieben 5'-terminal keine Cap-Struktur (Carter 1990), sondern verfügen über ein kovalent gebundenes VPg, wodurch eine Cap-unabhängige Translationsinitiation möglich ist (Herbert *et al.*, 1997). Weiterhin besitzen sowohl die subgenomische RNA, die ausschließlich für die Strukturproteine kodiert, als auch die genomische RNA das gleiche 3'-Ende (Neill und Mengeling, 1988), welches polyadenyliert ist.

Die genomische RNA des FCV enthält drei offene Leseraster (Abb. 1.3). Im ersten Leseraster sind wie bei allen Caliciviren die Nichtstrukturproteine kodiert. Diese werden als Vorläuferprotein exprimiert und anschließend durch die virale Protease prozessiert (Sosnovtseva *et al.*, 1999; Sosnovtsev *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 2007). In 5'-3' Richtung entstehen folgende vier Nichtstrukturproteine, die anfangs analog zu den Picornaviren bezeichnet wurden: eine 2C-ähnliche Cysteinprotease (Helikase), ein 40kDa Polypeptid (daraus VPg), eine 3C-ähnliche Cysteinprotease sowie eine 3D-ähnliche RNA-abhängige RNA-Polymerase (Neill 1990). Beim FCV werden die 3C-ähnliche Cysteinprotease und die 3D-ähnliche RNA-abhängige RNA-Polymerase nicht voneinander getrennt. Eine in vielen Punkten vergleichbare Abfolge der Nichtstrukturproteine findet sich in den Genomen der Vertreter der anderen Genera der Caliciviren (zum Beispiel Wirblich *et al.*, 1995). Die Kapsidproteine VP1 und VP2 werden beim FCV im zweiten bzw. dritten offenen Leseraster kodiert und von der subgenomischen RNA

exprimiert (Neill *et al.*, 1991). Die subgenomische RNA wird auch in Partikel verpackt, den *virus like particles* (VLPs) (Geissler *et al.*, 1999; Neill 2002), die während der FCV-Infektion entstehen. Sie trägt wie die genomische RNA am 5'-Ende ein kovalent gebundenes VPg und ist am 3'-Ende polyadenyliert. Das im zweiten offenen Leserahmen kodierte VP1 (Carter *et al.*, 1992) wird mit einer *Leadersequenz* translatiert. Das entstehende Polyprotein wird ebenfalls durch die virale Protease prozessiert (Sosnovtsev *et al.*, 1998). Die Leseraster für die Strukturproteine überlappen um vier Nukleotide, wodurch eine Start/Stoppreigion entsteht. Das minore Kapsidprotein VP2 wird durch Reinitiation vom dritten Leseraster translatiert (Sosnovtsev *et al.*, 2000). Auf den genauen Mechanismus der Termination/Reinitiation wird in einem späteren Abschnitt eingegangen. Das VP2 wird nur zu einem sehr geringen Teil in das Kapsid eingebaut, ist jedoch essentiell für die Virusinfektion und den Zusammenbau neuer infektiöser Partikel (Sosnovtsev *et al.*, 2005).

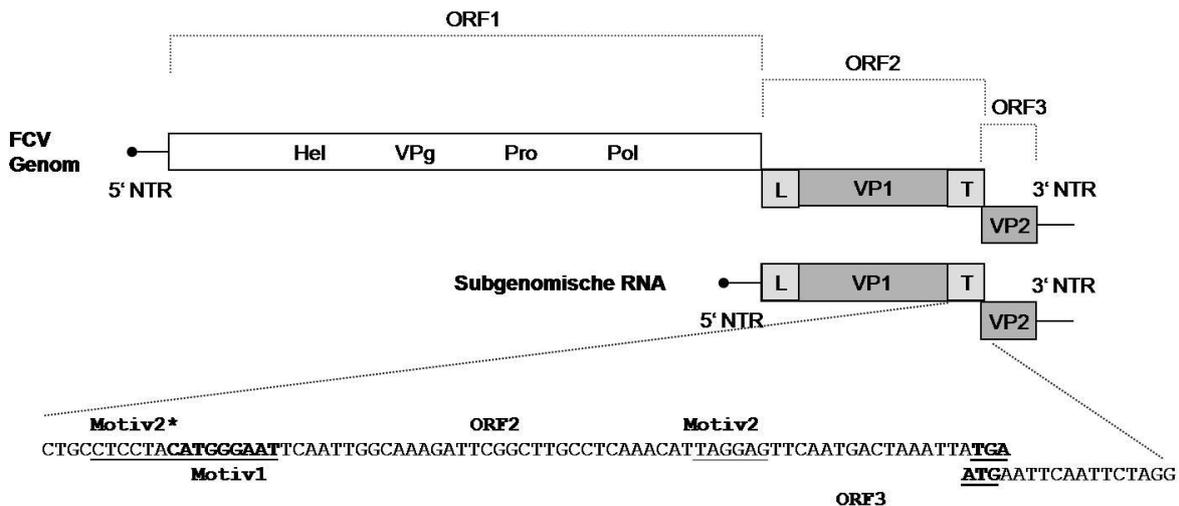


Abb. 1.3: FCV Genomorganisation

In dieser Abbildung ist das Genom des FCV einschließlich nicht translaterter Regionen (NTR) gezeigt (nicht maßstabsgetreu). Der obere Teil der Abb. veranschaulicht die drei offenen Leserahmen, wobei in 5'-3' Richtung im ersten Leserahmen die Nichtstrukturproteine (Helikase (Hel), VPg, Protease (Pro), Polymerase (Pol)) kodiert sind. Im mittleren Teil ist die subgenomische RNA dargestellt, von der aus die beiden Strukturproteine VP1 und VP2 synthetisiert werden. Die Sequenz des Hauptkapsidproteins VP1 besitzt eine *Leadersequenz* (L), wodurch ein Vorläuferprotein translatiert wird, das im Anschluss prozessiert wird. Das kleine Kapsidprotein wird mittels Translationsreinitiation exprimiert. Dazu bedarf es der *Termination Upstream Ribosomal Binding Site* (TURBS, T). Ein Sequenzausschnitt der TURBS und der anschließenden Start/Stoppstelle ist im unteren Teil abgebildet. Die TURBS beinhaltet drei essentielle Motive 1, 2 und 2*. Die Start/Stoppstelle zeigt die Überlappung von Leseraster zwei und drei um vier Nukleotide.

Die Replikation der Caliciviren findet im Zytoplasma statt.

Wenngleich sich die Kapsidstruktur wie auch die Genomorganisation der Caliciviren von denen der Picornaviren unterscheidet, so besitzen beide Virusfamilien eine partiell ähnliche Strategie zum *viral host shutdown*, dem Abschalten der Proteinsynthese der Wirtszelle. Dies ist ein gängiger Mechanismus bei Viren zur Inhibition der zellulären Translation. Die calicivirale 3C-ähnliche Protease ist stabil und akkumuliert in der Wirtszelle während der Infektion, so dass eine Spaltung des Poly(A)-Bindepoteins (PABP) erfolgen kann. Dies führt dazu, dass sich die C-terminale Domäne des PABPs, welche eIF4B bindet, von der N-terminalen RNA-bindenden Domäne räumlich entfernt (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2004 a und b). Dadurch nimmt die zelluläre Proteinsyntheserate ab und es stehen mehr Faktoren der zellulären Translationsmaschinerie für die Synthese viraler Proteine zur Verfügung. Dazu trägt die zusätzlich beschriebene Spaltung von eIF4GI und eIF4GII durch die 3C-ähnliche Protease bei (Willcocks *et al.*, 2004).

1.3 Translation

Die Translation ist neben der Transkription der zweite wesentliche Abschnitt der Genexpression und kommt in allen Lebewesen vor. Dabei werden die Proteine anhand des zuvor transkribierten Bauplans, der mRNA, durch die Ribosomen und unter Beteiligung vieler weiterer Faktoren synthetisiert. Dieser Prozess wird in die folgenden vier Phasen unterteilt: Translationsinitiation, -elongation, und -termination sowie das Recycling. Während des Initiationsschritts wird der Translationskomplex aus der mRNA, dem Ribosom und diversen Initiationsfaktoren zusammengesetzt und am Startkodon positioniert. Die Ribosomen bestehen aus zwei verschiedenen großen Untereinheiten, wobei die kleine Untereinheit unter anderem für die mRNA Erkennung und die große Untereinheit vor allem für die Verknüpfung der Aminosäure in der A-Stelle mit der in der P-Stelle gebundenen Peptidkette zuständig ist. Bei Prokaryoten und Eukaryoten unterscheiden sich die Ribosomen aufgrund ihres Sedimentationskoeffizienten. Die kleine ribosomale Untereinheit der Prokaryoten (30S) wird aus der 16S rRNA und 21 Proteinen gebildet, wohingegen sich die große Untereinheit (50S) aus zwei rRNAs (23S und 5S) und 31 Proteinen zusammensetzt. Das eukaryotische Ribosom besteht aus der kleinen 40S Untereinheit mit 18S rRNA und circa 33 Proteinen sowie der großen 60S Untereinheit mit den zwei rRNAs (28S und 5,8S) und etwa 49 Proteinen.

Beide ribosomale Untereinheiten bilden zusammen eine funktionelle Einheit, die im Laufe der Elongationsphase die Polypeptidkette verlängert. Sowohl die Elongation als auch die Termination verlaufen bei Pro- und Eukaryoten annähernd gleich. Am Ribosom werden Exit (E)-, Peptidyl (P)- und Aminoacyl (A)-Stelle unterschieden. Im ersten Schritt der Elongation bindet eine Aminoacyl-tRNA mit Guanosintriphosphat (GTP) und dem Elongationsfaktor eEF1A an die A-Stelle. Mit Hilfe der Kodon-Antikodonpaarung zwischen mRNA und tRNA wird gewährleistet, dass nur die passende tRNA an die A-Stelle bindet. Dieser Schritt wird energetisch kontrolliert durch die Kopplung der Aminoacyl-tRNA Bindung an die Hydrolyse von GTP durch eEF1A. Die ribosomale Peptidyltransferase katalysiert im zweiten Schritt die Ausbildung der Peptidbindung zwischen der neuen Aminosäure und der Peptidkette. In einem dritten und letzten Schritt fördert der Elongationsfaktor eEF2 die GTP-abhängige Translokation des Ribosoms um drei Nukleotide auf der mRNA. Dabei löst sich die deacylierte tRNA von der P-Stelle und außerdem gelangt die Peptidyl-tRNA in die P-Stelle. Damit wird die A-Stelle wieder freigegeben und befindet sich an der Stelle des nächsten Kodons. Dieser Zyklus wiederholt sich bis eines der drei möglichen Stoppkodone erreicht ist. Dann beginnt die vorletzte Phase der Translation, die Termination. Während dieser wird durch mehrere Terminationsfaktoren die vollständige Polypeptidkette freigesetzt, indem mit Hilfe der katalytischen Aktivität des Ribosoms die Esterbindung zwischen der letzten Aminosäure und der tRNA gespalten wird (Kapp und Lorsch, 2004). In der vierten und letzten Phase der Translation, dem Recycling, dissoziiert das Ribosom, so dass beide Untereinheiten für eine neue Runde Proteinsynthese zur Verfügung stehen. In Prokaryoten geschieht dies durch den Freisetzungsfaktor (*ribosome release factor*, RRF). Für Eukaryoten ist darüber nur wenig bekannt, möglicherweise sind die Translationsinitiationsfaktoren eIF3, eIF1 und eIF1A (Pisarev *et al.*, 2007) sowie eIF6 daran beteiligt.

1.3.1 Translationsinitiation und Translationsinitiationsfaktoren

Während bei den Eukaryoten die Transkription im Zellkern und die Translation im Zytoplasma räumlich getrennt voneinander ablaufen, kann bei den Prokaryoten noch im Verlauf der Transkription die Translation beginnen. Im Bezug auf die Translation unterscheiden sich Prokaryoten und Eukaryoten insbesondere in der Phase der Initiation (Hershey und Merrick, 2000; Hershey *et al.*, 2012): Während bei Prokaryoten lediglich drei Initiationsfaktoren (IF 1-3) an der Initiation beteiligt sind, besitzen Eukaryoten circa sechs Translationsinitiationsfaktoren, welche häufig aus mehreren Untereinheiten bestehen. Weiterhin unterscheiden sich Pro- und Eukaryoten in der Art der Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit sowie der Startkodonerkennung. Die „Shine-Dalgarno-Sequenz“ definiert in Prokaryoten die Position, an welcher die kleine ribosomale Untereinheit bindet. Sie liegt direkt stromauf vom Translationsstart (etwa zehn Nukleotide) und gewährleistet eine korrekte Positionierung am Startkodon (Shine und Dalgarno, 1975). Durch eine entsprechende Anzahl von „Shine-Dalgarno-Sequenzen“ können bei Prokaryoten mehrere Proteine von einer mRNA kodiert sein und dadurch gleichzeitig von dieser polycistronischen mRNA translatiert werden. Insgesamt sind bei der prokaryotischen Translationsinitiation nur drei Initiationsfaktoren beteiligt und die erste tRNA ist mit einem N-Formylmethionin beladen. Der Initiationskomplex bei den Prokaryoten besteht aus der mRNA, der 30S ribosomalen Untereinheit und der tRNA.

Bei den Eukaryoten verläuft die Translationsinitiation komplexer und wird in vier Schritte unterteilt (Abb. 1.4). Zu Beginn kommt es zur Bildung des *Ternären Komplexes* (TC), welcher aus der mit Methionin beladenen Initiator-tRNA ($tRNA_i^{Met}$) und dem Translationsinitiationsfaktor eIF2 sowie einem GTP besteht. Aus diesem geht danach der *Multifaktorielle Komplex* (MFC) hervor, indem die Translationsinitiationsfaktoren eIF1, eIF3 und eIF5 an den TC binden. Im Folgenden interagiert der MFC mit der kleinen ribosomalen Untereinheit (40S) durch den Faktor eIF1, wodurch der *43S Präinitiationskomplex* (PIC) entsteht. Ob die $tRNA_i^{Met}$ auch direkt an die 40S Untereinheit oder als TC sofort binden kann, wird kontrovers diskutiert (Sokabe *et al.*, 2012). Im zweiten Schritt der eukaryotischen Initiationsphase wird der PIC an die mRNA rekrutiert. Parallel zum ersten Schritt kommt es bereits zur Pseudo-Zirkularisierung der zu translatierenden mRNA mittels Poly(A)-Bindeprotein (PABP) und eIF4F. Der multifaktorielle Translationsinitiationsfaktor eIF4F setzt sich aus dem Cap-bindenden eIF4E, dem Gerüstprotein eIF4G und der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen DEAD-box RNA-Helikase eIF4A zusammen. Während eIF4E an die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA bindet, interagiert eIF4G mit dem PABP, das am Poly(A)-Schwanz des 3'-Endes der mRNA gebunden ist (Sachs 1990). Die Helikase eIF4A bindet direkt an die mRNA und entwindet diese, so dass der Faktor eIF4B ATP-abhängig binden kann. Deutlich komplexer als bei Prokaryoten wird durch die Verbindung von eIF3 mit eIF4G und eIF4B die mRNA dann mit dem PIC assoziiert und der *48S Komplex* entsteht. Als drittes erfolgt der ATP-abhängige *scanning* Prozess der kleinen ribosomalen Untereinheit entlang des nicht-translatierten Bereiches der mRNA auf der Suche nach einem Startkodon (Algire und Lorsch, 2006). Unklar ist, ob der Vorgang aufgrund des *scanning* Prozesses *per se* oder der Notwendigkeit des Auflöserns der Sekundärstrukturen der RNA ATP-abhängig ist. In dem Verlauf des *scanning* Prozesses aktiviert eIF5 die GTPase eIF2 und es kommt zur GTP-Hydrolyse des von eIF2 gebundenen GTPs. Währenddessen werden die Translationsinitiationsfaktoren des eIF4F-Komplexes und eIF4B vom Translationskomplex entlassen. Für gewöhnlich wird das erste Startkodon stromabwärts von der Cap-Struktur als Startpunkt verwendet (Kozak 1989, Hinnebusch 2011). Sobald dieses erreicht ist, bindet die $tRNA_i^{Met}$ mit der Antikodonsequenz daran. Durch eine Konformationsänderung innerhalb des PIC nach der Erkennung des Startkodons kommt es zur Freisetzung von eIF1 und eIF2-GDP+P_i. Außerdem werden die Translationsinitiationsfaktoren eIF3 und eIF5 freigesetzt. Durch den Translationsinitiationsfaktor eIF2B, einem GTP-Austauschfaktor (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*, GEF) wird das eIF2 gebundene GDP wieder durch GTP ersetzt. Im vierten und letzten Schritt der Translationsinitiation bindet die große ribosomale Untereinheit (60S) mit Hilfe von

eIF5B an die 40S Untereinheit. Durch die GTPase Aktivität von eIF5B werden die restlichen Translationsinitiationsfaktoren freigegeben. Nach der Bildung des 80S Ribosoms beginnt die Elongationsphase und die Polypeptidkette beginnend mit der tRNA_i^{Met} wird kontinuierlich verlängert.

Eine interessante Rolle spielt der Translationsinitiationsfaktor eIF5A, welcher als einziger Initiationsfaktor mehr als freies Protein als an Ribosomen gebunden vorliegt. Zudem ist der Lysin-Rest an Position 51 zu einer anderen Aminosäure umgewandelt, dem Hypusin (N6-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysin). Diese Aminosäure ist in keinem anderen Protein von Eukaryoten oder Archaeen zu finden. Die Modifikation ist jedoch essentiell für die Aktivität von eIF5A. Hypusin ist erforderlich für die Assoziation von eIF5A mit den Ribosomen und zur Stimulation der Methionyl-Puromycin Synthese. Sequenzalignment-Analysen deuten aufgrund von strukturellen Homologien auf eine Entwicklung von eIF5A aus dem bakteriellen Elongationsfaktor EF-P hin. eIF5A agiert hauptsächlich als Elongationsfaktor (Saini *et al.*, 2009), hat eventuell aber auch einen Einfluss auf die Translationsinitiation, indem es mit eIF1A interagiert, sowie auf die Termination (Merrick 2009).

Der oft wenig erwähnte Translationsinitiationsfaktor eIF6 bindet an die große ribosomale Untereinheit (60S) im Zytoplasma, nicht jedoch an das 80S Ribosom (Gartmann *et al.*, 2010). Endogenes eIF6 liegt vermutlich frei oder gebunden an die 60S Untereinheit vor. Die Verbindung zur 80S Einheit wird daher entsprechend durch eIF6 reguliert, indem es die 40S und 60S Untereinheit dissoziiert hält. eIF6 bindet außerdem direkt an RACK1 (*receptor for activated C kinase*). Da RACK1 ebenso an die Proteinkinase C (PKC) bindet, fungiert es als Gerüstprotein und bringt die PKC und eIF6 in räumliche Nähe. Die Phosphorylierung von eIF6 durch die PKC führt zur Dissoziation von eIF6 von der 60S Untereinheit. Dadurch ist eine Verbindung beider ribosomaler Untereinheiten zum funktionellen 80S Ribosom möglich (Guo *et al.*, 2011).

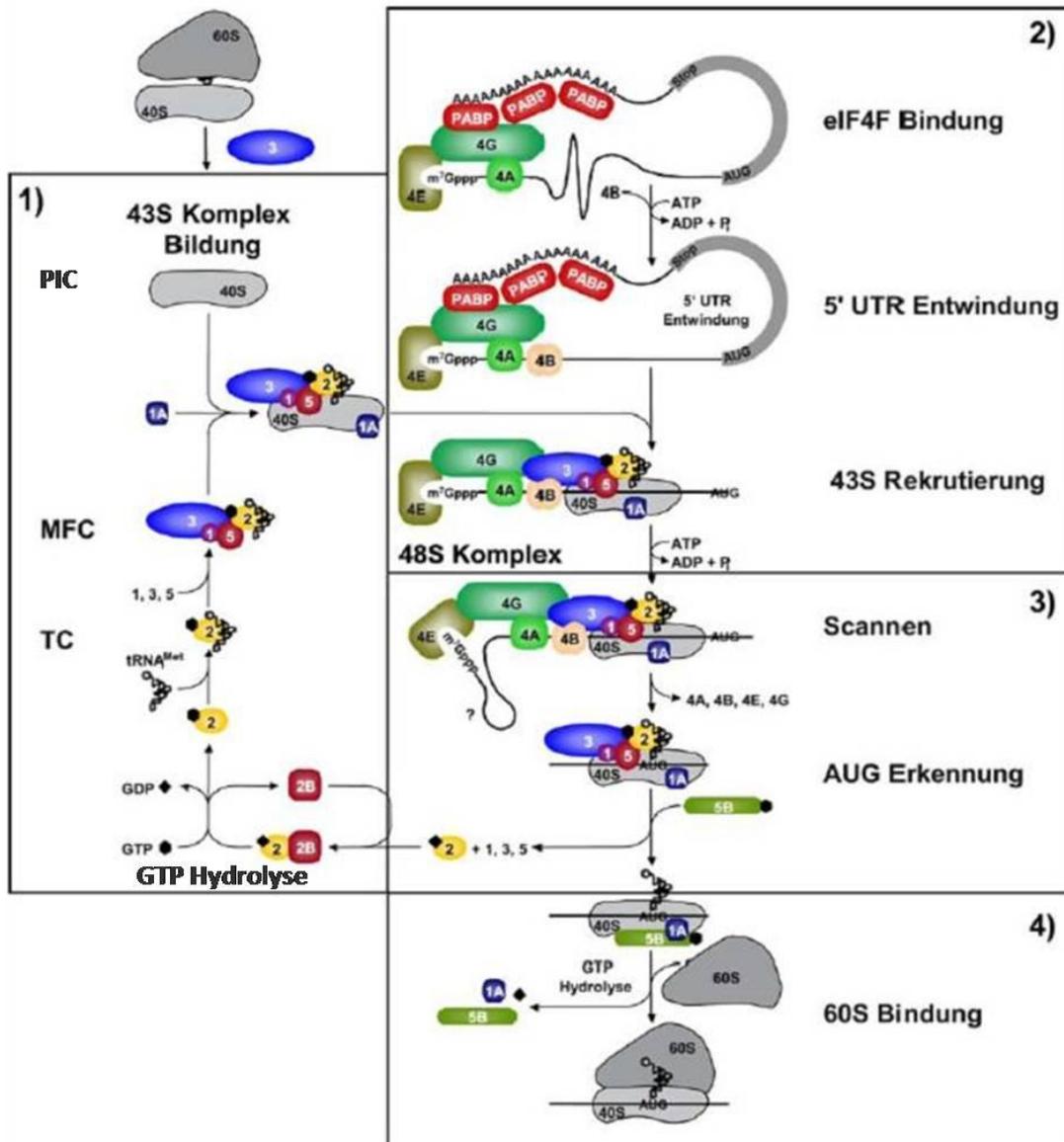


Abb. 1.4: Schematischer Überblick über den Ablauf der eukaryotischen Translationsinitiation modifiziert nach Preiss und Hentze (2003)

1.3.2 Alternative Strategien zur Translationsinitiation

Der oben beschriebene Prozess stellt die normale Translationsinitiation der Zelle dar. Daneben gibt es einige andere unter anderem von Viren verwendete Mechanismen, wie zum Beispiel die interne Initiation an internen Ribosomen-Eintrittsstellen (*internal ribosome entry site*, IRES) (Jackson 2005; Sonenberg und Hinnebusch, 2009) oder die Reinitiation nach der Termination eines Cistrons. Ein größerer Überblick über die von Viren genutzten Translationsstrategien wird zu Beginn der Diskussion gegeben.

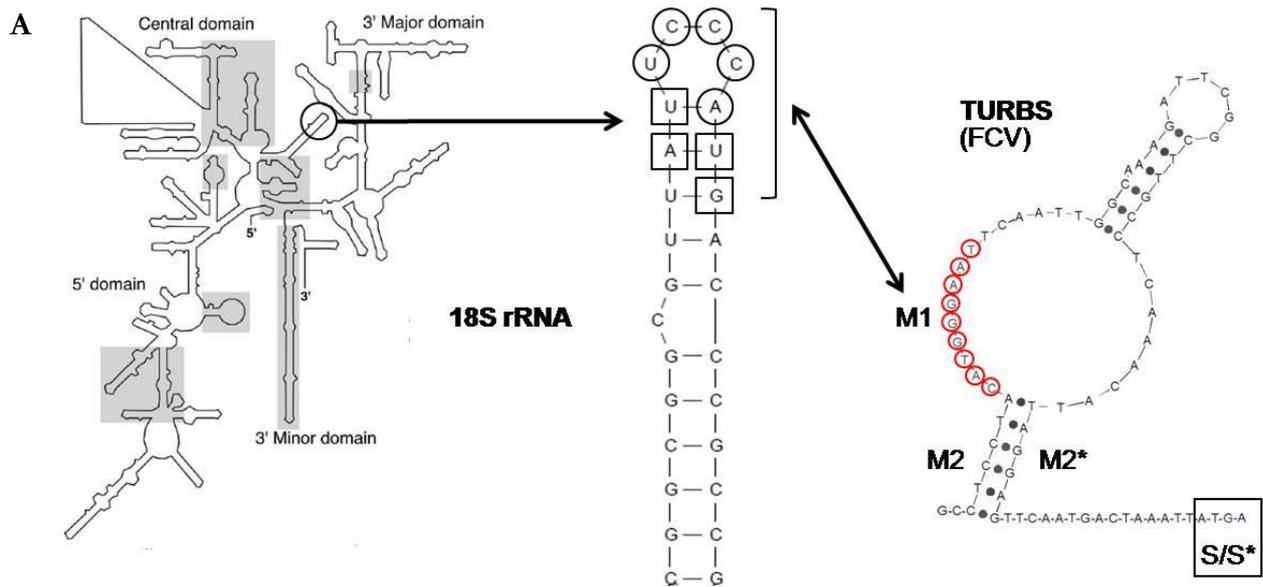
Die Translationsreinitiation (Meyers, 2003) konnte bereits bei unterschiedlichen Viren nachgewiesen werden. Ein exotischer Vertreter des Reinitiationsmechanismus ist das Cryphonectria Hypovirus 1 (CHV1), ein den Kastanienrindenpilz infizierendes Picorna-ähnliches Virus (Guo *et al.*, 2009). Bekannter sind das Influenza B Virus (Powell *et al.*, 2008) und die verschiedenen Caliciviren wie RHDV, FCV oder das Norovirus (Meyers, 2003; Luttermann und Meyers, 2007; McCormick *et al.*, 2008; Naphthine *et al.*, 2009).

Die subgenomische mRNA der Caliciviren dient dazu, die Synthese der Strukturproteine zu gewährleisten. Die Translationsinitiation des VP1 Vorläuferproteins wird durch das VPg Cap-unabhängig vermittelt, wohingegen diese beim VP2 durch Reinitiation stattfindet. Voraussetzung für diesen Mechanismus ist ein 70 Nukleotide langer Sequenzbereich, der sich am 3'-Ende des VP1 befindet und als *Termination Upstream Ribosomal Binding Site* (TURBS) bezeichnet wird. Die Abbildung 1.5.A zeigt beispielhaft die TURBS des FCV, welche essentiell für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus ist. Sie enthält die drei Motive M1, M2 und M2* und endet mit der Start/Stoppstelle (S/S*). Das Motiv 1 der TURBS ist aufgrund seiner Komplementarität in der Lage die 18S rRNA zu binden und dadurch das Ribosom festzuhalten. Die Motive 2 und 2* interagieren miteinander, wodurch das gebundene Ribosom relativ zum Start positioniert und die Translationsinitiation des VP2 ermöglicht wird.

Die Sequenzen der Start/Stoppstelle der verschiedenen Viren variieren in ihrer Reihenfolge von Start- und Stoppkodon. Genauso sind auch die Abstände zwischen Motiv 1 der TURBS und Start/Stoppstelle bei den einzelnen Viren verschieden. Die Kernsequenz des Motivs 1, welche komplementär zur 18S rRNA ist, bleibt jedoch immer gleich (UGGGA) (Abb. 1.5.B).

Für die Reinitiation beim FCV ist neben der Bindung der 18S rRNA an die virale RNA auch die Interaktion von eIF3 mit der TURBS besonders wichtig (Luttermann und Meyers, 2009; Pöyry *et al.*, 2007). Sowohl das minore Kapsidprotein des FCV als auch des RHDV werden durch Reinitiation translatiert.

Die Reinitiation bedarf vermutlich einer ganzen Reihe zellulärer Faktoren, von denen bisher kaum etwas bekannt ist. Diese Fragestellung diente als Ausgangsbasis für die vorliegende Arbeit.



	TURBS Motiv 1	Abstand M1 zu Start/Stopp	Start/Stopp Sequenz
FCV (Vesivirus)	CA<u>UGGG</u>AAU	56 nt	AUGA
huNV (Norovirus)	CA<u>UGGG</u>AAA	27 nt	UAAUG
RHDV (Lagovirus)	U<u>GUGGG</u>ACC	61 nt	AUGUCUGA
PEC (Sapovirus)	AG<u>UGGG</u>ACA	28 nt	AUGA
Newbury agent 1 (Nebovirus)	CA<u>UGGG</u>AAU	60 nt	UAAUAUG
Influenza	C<u>ATGGG</u>AAA	27 nt	UAAUG

Abb. 1.5: Terminations/Reinitiations-Mechanismus

Die in Abbildung (A) veranschaulichte *Termination Upstream Ribosomal Binding Site* (TURBS) ist essentiell für die Reinitiation und besteht aus den Motiven M1 (rot), M2 und M2*, wobei die letzten beiden miteinander interagieren. Dadurch könnte das Motiv M1 so präsentiert werden, dass die 18S rRNA binden kann. Im Schema der 18S rRNA (aus Shenvi *et al.*, 2005) ist der Bereich, an den M1 binden kann, gekennzeichnet und daneben vergrößert dargestellt. Die zu M1 komplementären Nukleotide sind umrandet. Umrandete Nukleotide symbolisieren das zentrale Motiv 1 (siehe auch (B)). Weitere komplementäre Nukleotide des FCV M1 sind mit Rechtecken markiert. Abbildung (B) zeigt das Motiv 1, den Abstand von M1 zur Start/Stopppregion sowie die Start/Stopppsequenz verschiedener Calicivertreter und des Influenza B Virus.

1.4 Posttranskriptionelle Blockierung der Genexpression: RNA-Interferenz

Für die Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* erhielten Andrew Z. Fire und Craig Mello 2006 den Medizin-Nobelpreis (Fire *et al.*, 1998). Die posttranskriptionelle Genblockade (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) ist ein überwiegend zytoplasmatischer Prozess und diente wahrscheinlich ursprünglich als antiviraler Abwehrmechanismus, mit dem gezielt Gene abgeschaltet werden können. Dieser Vorgang wird bei Pflanzen als „co-suppression“, bei Pilzen als „quelling“ und bei Tieren eben als RNAi bezeichnet (Agrawal *et al.*, 2003).

Auslöser von RNAi sind verschiedene RNA-Moleküle wie siRNA (*small interfering RNA*), shRNA (*short hairpin RNA*) oder miRNA (*micro RNA*). Unterscheiden lassen sich die zielerkennenden RNAs aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft. MiRNAs werden im natürlichen System in der Zelle aus endogenen Produkten gebildet. Sie werden aus pri-miRNA (*primary miRNA*) und pre-miRNA (*precursor miRNA*) als 21-23 Nukleotide lange RNA Moleküle prozessiert. MiRNAs sind hoch konserviert und haben vielfältige regulatorische Funktionen auf posttranskriptioneller Ebene. Si- und shRNAs, ebenfalls kurze einzel- (si) bzw. doppelsträngige (sh) RNA-Moleküle, werden hingegen von außen in die Zelle eingeschleust mittels Expressionsvektoren oder nach der chemischen Synthese ausgehend von PCR-Expressionskassetten. Sie dienen ebenfalls der Genregulation auf posttranskriptioneller Ebene. Außerdem spielen sie eine entscheidende Rolle in der Grundlagenforschung und der therapeutischen Anwendung. SiRNAs sind wie miRNAs etwa 19-23 Nukleotide lang. Im Vergleich zu shRNAs sind siRNAs gebrauchsfertig. Da ihre Wirkung zeitlich begrenzt ist und sie meist nur limitiert zur Verfügung stehen, ist ihr Einsatz kostspielig. Im Gegensatz dazu werden shRNAs in der Zelle ausgehend von Plasmiden oder bakteriellen bzw. viralen Vektoren synthetisiert und sind einfacher zu handhaben, da sie zunächst als DNA vorliegen. Sie können für Langzeitexperimente verwendet werden und verursachen vergleichsweise niedrige Kosten. ShRNA kann transient oder stabil in der Zelle vorkommen und ermöglicht daher auch induzierbare Expressionssysteme.

Während die siRNA direkt an die mRNA binden kann, stellt die shRNA ein Mimikry der pre-miRNA dar und muss gleichermaßen zuerst prozessiert werden (Abb. 1.6). Dies findet noch im Zellkern durch den *Mikroprozessor-Komplex* bestehend aus DGCR8 und Drosha statt. Dabei wird die pri-miRNA durch das dsRNA bindende Protein DGCR8 gebunden und von der RNase III Drosha in circa 70 Nukleotide lange pre-miRNA Stücke zerschnitten (Zeng *et al.*, 2005). Die pre-miRNA formt sich zu Haarnadelschleifen, welche im Anschluss aktiv mittels Exportin 5 über die Poren der Kernmembran aus dem Zellkern transportiert werden können. Im Zytoplasma werden die dsRNA Moleküle (miRNA oder shRNA) durch die Endoribonuklease Dicer, einem RNase III ähnlichen Enzym, in kleinere, 21-23 Nukleotid lange Moleküle prozessiert. Nach diesem ersten Schritt, der Prozessierung der dsRNA durch Ribonukleasen wie Drosha oder Dicer, werden die kleineren dsRNA Moleküle an Proteine der Argonautenfamilie übergeben, wodurch der *RNA-induced silencing complex* (RISC) entsteht. Je nach Spezies können weitere Proteine am RISC beteiligt sein. Bei *Drosophila melanogaster* bindet dabei nicht perfekt gepaarte dsRNA an AGO1 (meist miRNA) und vollständig gepaarte dsRNA (überwiegend shRNA) an AGO2 (Iwasaki *et al.*, 2009). Sodann wird die dsRNA entwunden und gespalten, so dass der Leitstrang (Vorwärtsstrang mit 5'-3' Orientierung) im RISC verbleibt und der Gegenstrang abgebaut wird (Khvorova *et al.*, 2003). Im letzten Schritt des RNAi Mechanismus bindet der RISC an die zum Leitstrang komplementäre mRNA. Diese wird durch ein Argonautenprotein mit Endonukleaseaktivität gespalten und degradiert. Bei Säugern besitzt nur das Argonautenprotein AGO2 eine Ribonukleaseaktivität (Liu *et al.*, 2004).

Abhängig von der Komplementarität der miRNA/siRNA und der mRNA sowie dem assoziierten Argonautenprotein werden die Zielgene unterschiedlich reguliert. So ist vermutlich eine perfekte Paarung zwischen miRNA/siRNA und mRNA mit der Bindung an AGO2 verbunden und führt zur Degradation der mRNA. Im Vergleich dazu bedingt die Bindung von nicht perfekt gepaarter miRNA/siRNA und mRNA sowie die Interaktion mit AGO1 einen

Translationsblock. Die Speicherung oder teilweise Zersetzung des Translationskomplexes findet in den sogenannten *processing bodies* (*P-bodies*) statt. Dies sind abgegrenzte zytoplasmatische Strukturen, welche eine bedeutende Rolle im mRNA-Turnover spielen.

In dieser Arbeit sollten mit Hilfe der RNAi gezielt einzelne Translationsinitiationsfaktoren ausgeknockt werden, um anschließend ihren Einfluss auf die Termination/Reinitiation bei der Synthese des VP2 des FCV untersuchen zu können.

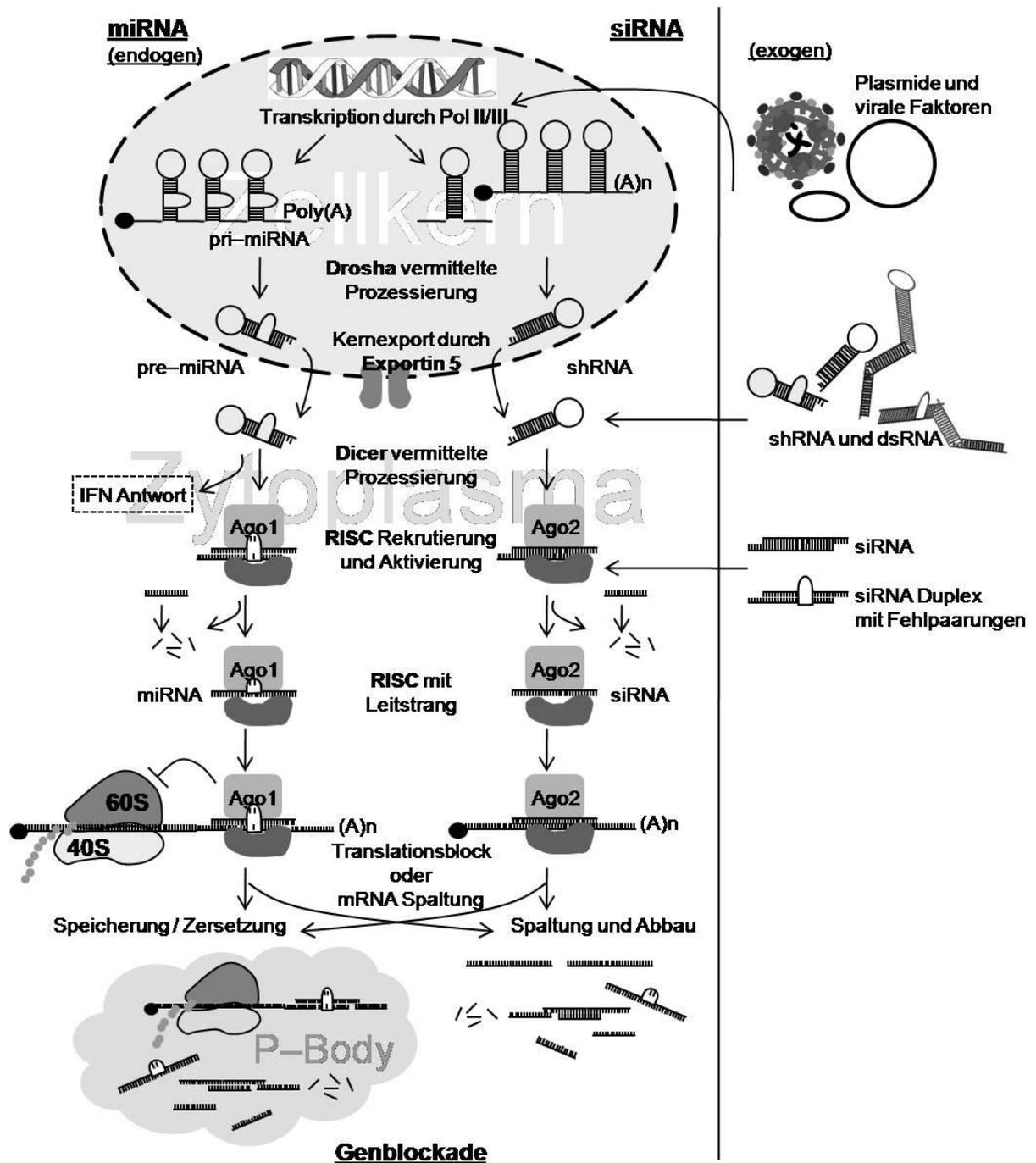


Abb. 1.6: Mechanismus der RNA-Interferenz
 modifiziert nach Hajeri und Singh (2009)

Die Abbildung veranschaulicht den Mechanismus der RNAi sowohl für endogene als auch exogen in die Zelle eingeführte dsRNA. Unterschieden werden außerdem die Abläufe für häufig nicht perfekt paarende miRNA und vollständig gepaarte siRNA.

1.5 Fragestellung

Die *Termination Upstream Ribosomal Binding Site* (TURBS) am 3'-Ende der VP1 kodierenden Sequenz ist essentiell für die Reinitiation zur VP2 Synthese. Aufbauend auf den Erkenntnissen zum Terminations/Reinitiations-Mechanismus des feline Calicivirus aus den Arbeiten von Dr. C. Luttermann (Luttermann und Meyers, 2007 und 2009) sollten in der vorliegenden Arbeit weitere Untersuchungen zur Reinitiation vorgenommen werden. Ersten Anhaltspunkten, die auf eine Rolle von 5'-terminalen Sequenzen der VP2 kodierenden Region hinwiesen, sollte im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen werden. Dazu wurden Mutationsanalysen durchgeführt.

Weiterhin sollte in einem zweiten Teil der Arbeit analysiert werden, welche Translationsinitiationsfaktoren für die VP2 Reinitiation notwendig sind. Mit Hilfe der RNA-Interferenz sollten *in vivo* einzelne Faktoren ausgeschaltet und anschließend überprüft werden, ob sie für die Reinitiation von Bedeutung sind.

Ziel dieser Arbeit war es, das Wissen über essentielle Bereiche des viralen Genoms für die VP2 Reinitiation zu steigern sowie Erkenntnisse über die Faktoren zu gewinnen, die für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus bei FCV wichtig sind.

2. Material

2.1 Antikörper

Die für Immunpräzipitationen (IP) radioaktiv markierter Proteine und im Western Blot (WB) eingesetzten Antikörper sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Die jeweilige Antikörperverdünnung ist angegeben.

Antikörper	Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Monoklonal				
α -eIF4E	eIF4E	Kaninchen	1:250 (WB)	Abcam, UK
α -eIF5A	eIF5A	Kaninchen	1:10000 (WB)	Abcam, UK
α -V5	V5 Epitop	Maus	1:5000 (WB)	Life Technologies, Darmstadt
Polyklonal				
FR3	FCV-VP1	Kaninchen	1:40 (IP)	Prof. M. Büttner, BFAV
T29	FCV-VP2	Kaninchen	1:100 (IP)	Dr. J.O. Thumfart, BFAV; Dr. H. Schirrmeier, BFAV Insel Riems
C1	RHDV-VP1	Kaninchen	1:100 (IP)	Dr. C. Wirblich, BFAV
C10	RHDV-VP2	Kaninchen	1:100 (IP)	Dr. C. Wirblich, BFAV
α -G1	N ^{Pro}	Kaninchen	1:40 (IP)	R. Stark, BFAV; Prof. HJ. Thiel, JLU Gießen
α -GFP	GFP	Kaninchen	1:1000(IP)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -eIF2B2	eIF2B2	Kaninchen	1:500 (WB)	Abcam, UK
α -eIF5	eIF5	Kaninchen	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -eIF5B	eIF5B	Kaninchen	1:500 (WB)	Proteintech, UK
α -Actin	Aktin	Kaninchen	1:20000 (WB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sekundär				
α -rabbit-PO	Kaninchen-IgG	Ziege	1:10000 (WB)	Dianova, Hamburg

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Zellen

Für transiente Expressionsstudien wurden die folgenden Zelllinien verwendet:

BHK-21	adhärente Nierenzelllinie (<i>baby hamster kidney-21</i>) (ATCC #CCL-10) erhalten von Prof. T. Rümenapf, JLU Gießen
BSR T7/5	Derivat der BHK-21 Zellen, stabil exprimierte T7-RNA-Polymerase erhalten von Prof. K. Conzelmann, LMU München
HeLa	adhärente Epithelzelllinie eines humanen Zervixkarzinoms (ATCC #CCL-2)
JAWSII	adhärente und in Suspension wachsende, murine dendritische Zelllinie (ATCC #CRL-11904) erhalten von Dr. M. Knittler, FLI Tübingen

2.2.2 Bakterienstämme

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde der Bakterienstamm *E. coli* Top 10F⁺ verwendet.

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

Zur Anreicherung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper in der Immunpräzipitation wurden fixierte *Staphylococcus aureus* Bakterien (Cowain Stamm) verwendet (Kessler, 1981).

2.2.3 Viren

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

2.3 Geräte

ABI-PRISM 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
AB Hitachi 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Amara [®] Nucleofactor [®] II Device	Lonza, Köln
Analysenwaage Satorius Analytic	Analytic Satorius, Göttingen
Ausschwingrotor SW41	Beckman Coulter, München
β-Counter, Mini Assay Typ 6-20	Mini Instruments, Berlin
Blotkammer Tankblot	Hoefer, USA
CO ₂ -Inkubator MCO-19AIC, Sanyo	Ewald Innovationstechnik, Bad Nenndorf
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems, USA
Elektroporator PG 200 Progenetor [™] II	Hoefer, USA
Entwicklungsmaschine Konica QX-70	Konica, Hohenbrunn
Eraser (für <i>imaging-plates</i>)	Raytest, Straubenhardt
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Filmkassetten	Agfa-Gevaert, Köln
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC	Vacuubrand, Wertheim
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Göttingen
Fujifilm PhosphorImager BAS-1500	Raytest, Straubenhardt
Fujifilm <i>imaging-plates</i>	Raytest, Straubenhardt
Geldokumentationssystem Quantum	peqlab, Erlangen
Gelelektrophoresekammer horizontal	Feinmechanik, FLI-Tübingen
Gelelektrophoresekammer vertikal	Feinmechanik, FLI-Tübingen
Geltrocknung Drygel Model Sr. SE1160	Hoefer, USA
Gilson-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Glasgefäße	Schott, Mainz
Heiz-Magnetrührer IKAMAG RET-GS	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Hybridisierofen	Bachofer, Reutlingen
Inkubator B5050	Heraeus, Hanau
Kühlfalle	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifuge 5402, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Diavert	Leica, Wetzlar
Lichtschirm	Rex Meßinstrumentebau, Erlangen
Microcomputer Electrophorese power supply	Renner, Darmstadt
Mikrowellengerät HMG 640B	Bosch, Gerlingen
Minifuge 2, RF	Heraeus, Hanau
PCR-Gerät Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
PCR-Gerät GeneAmp 9600	Perkin Elmer, USA
pH-Meter Calimatic	Knick, Berlin

Pipetboy acu
 Power-Supply PS500XT DC
 Rotlichtlampe
 Rotoren TLA 45, 55
 Schüttelinkubator G25
 Schütteltisch *The Belly Dancer*
 Schüttler IKA-VIBRAX-VXR
 Schweißgerät
 Schwenktisch/ Wippschüttler Rockomat
 Sonifier B-12
 Sonifier Cell Disruptor B-15
 SpeedVac Concentrator
 Spektralphotometer Ultrospec 3000
 Sterilbank FlowSafe® B-[MaxPro]²-130
 Sterilbank Safe2020
 Thermodrucker P93D
 Thermomix 5436
 Thermostatic Circulator 2219 Multitemp II

 Transilluminator,
 UV Kontaktlampe Chroma43 (302 nm)
 Ultrazentrifuge TL 100
 Vakuumpumpe
 Vakuumtrockenschrank VTR 5022
 Vortex Vibrofix VF1
 Waage Mettler PM2000
 Wasserbad GFL
 Wasserbad HAAKE D8
 Wasserbad Julabo U3
 Wasserbadschüttler Gyrotory G76
 Zentrifuge 5415C,D und 5424

Tecnomara, Fernwald
 Hofer, USA
 Kindermann
 Beckman Coulter, München
 New Brunswick Scientific, USA
 Fröbel Labortechnik, Lindau
 IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
 Bachofer, Reutlingen
 Tecnomara, Fernwald
 Branson Sonic Power Company, USA
 Branson Sonic Power Company, USA
 Bachofer, Reutlingen
 Pharmacia Biotech, Freiburg
 Berner International, Elmshorn
 Thermo Scientific, Langenselbold
 Mitsubishi electric, Ratingen
 Eppendorf, Hamburg
 LKB Bromma, Schweden,
 durch Haake, Vreden
 Vetter, Wiesloch

 Beckman Coulter, München
 Edwards, England
 Heraeus, Hanau
 Bachofer, Reutlingen
 Mettler-Toledo, Gießen
 Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
 Bachofer, Reutlingen
 Bachofer, Reutlingen
 New Brunswick Scientific, USA
 Eppendorf, Hamburg

2.4 Verbrauchsmaterial

Blue Caps CELLSTAR® (15ml, 50ml)
 CL-Xposure™ Film (Clear Blue X-Ray Film)
 Einmalspritzen (1ml, 2ml, 50ml)
 FACS-Reaktionsgefäße, BD Falcon
 Filtereinheit, gebrauchsfertig, Celluloseacetat
 Filterpapier, Blotting-Papier MN218B
 Glasfaser Mikrofilter GF/C (25mmØ)
 Kanülen (27G)
 Kodak® BioMax® MR Film, MR-1
 Nitrocellulose Transfer Membran, Protran®
 Nylonmembran (Duralon-UV Membran)

 Objektträger und Deckgläschen
 Parafilm „M“
 PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)
 Pipettenspitzen
 PP Tube, steril (5ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Thermo Scientific Pierce, USA
 B. Braun, Melsungen
 BD Biosciences, Heidelberg
 Whatman®, Schleicher & Schuell, Dassel
 Macherey-Nagel, Düren
 Whatman®, Schleicher & Schuell, Dassel
 B. Braun, Melsungen
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Whatman®, Schleicher & Schuell, Dassel
 Stratagene/ Agilent Technologies,
 Waldbronn
 Menzel Thermo Scientific, Braunschweig
 American National Can, Greenwich
 Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
 Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Greiner Bio-One, Frickenhausen

Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, BD Falcon (14ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Silikonfette Rotisilon®	Roth, Karlsruhe
Thermopapier	Mitsubishi electric, Ratingen
Transfektionsgefäße, Cell Culture Tube (12ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Vacuum Filter Systems	Corning Inc., USA
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (1,5ml)	Beckman Coulter, München

2.5 Reagenzien

2.5.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acridinorange	Serva, Heidelberg
Acrylamid (40%) (29:1)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Aminosäuren	Fluka, Buchs
	Merck, Darmstadt
	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Merck, Darmstadt
Bacto™ Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Betaine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotin	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Fraktion V), (<i>bovine serum albumin</i>)	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid, CsCl	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid, CaCl ₂	Riedel-de Haën, Seelze
Calciumphosphat, CaPO ₄	Riedel-de Haën, Seelze
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, DABCO	Sigma-Aldrich, Steinheim
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Serva, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholsäure	Serva, Heidelberg
dNTP Set	peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol, DTT	Roche, Mannheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
GelRed™ Nucleic Acid Stain	Biotrend, Köln
D-Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt

Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyoxal (40%)	Fluka, Buchs
Guanidinisoithiocyanat	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Qiagen, Hilden
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES	Merck, Darmstadt
Hypoxanthin	Merck, Darmstadt
Isopropanol, 2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin, Sarkosyl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lithiumcitrat	Fluka, Buchs
Magermilchpulver, fettarm	Discounter
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol, MeOH	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid, MgCl_2	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat, MgSO_4	Merck, Darmstadt
Mangandichlorid, MnCl_2	Merck, Darmstadt
Mowiol [®]	Merck Calbiochem, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid, NaN_3	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat, Na_2CO_3	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat, DOC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Life Technologies, Darmstadt
Orange G	Fluka, Buchs
Paraformaldehyd, PFA	Merck, Darmstadt
Phenol (Tris-gesättigt)	Qbiogene, Heidelberg
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Böhringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
1,4-Piperazindiethansulfonsäure, PIPES	USB, Cleveland
Phosphorsäure, H_3PO_4	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Salzsäure, HCl (1M und rauchend)	Roth, Karlsruhe
SDS, Dodecylsulfat-Natriumsalz in Pellets	Serva, Heidelberg
Sephadex [®] G-50	GE Healthcare, Freiburg
Sucrose	Serva, Heidelberg
Tetramethylethylendiamin, TEMED	Serva, Heidelberg
Tricin	Roth, Karlsruhe
Tris	Life Technologies, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol	Bio-Rad, München

2.5.2 Radiochemikalien

Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP), [α - 32 P] (>1000 Ci/mmol, 0,5mCi/ml)	MP Biomedicals, Eschwege, Hartmann Analytic, Braunschweig
L-Cystein, [35 S] (>1000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	MP Biomedicals, Eschwege, Hartmann Analytic, Braunschweig
L-Methionin, [35 S] (>1000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	MP Biomedicals, Eschwege, Hartmann Analytic, Braunschweig
Tran[35 S]-Label (>1000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	MP Biomedicals, Eschwege, Hartmann Analytic, Braunschweig
High-Range Rainbow Molekulargewichts- marker, [14 C] methyliert, CFA756	GE Healthcare, Freiburg

2.5.3 Enzyme, Größenmarker, Proteine, Inhibitoren

1 Kb Plus DNA Marker	Life Technologies, Darmstadt
0.5-10 Kb RNA Marker	Life Technologies, Darmstadt
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Antarctic</i> Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Calf intestine</i> alkalische Phosphatase, CIP	Roche, Mannheim
DNase RQ1, RNase-frei	Promega, Mannheim
DNA-Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Protein Synthesis Initiation Inhibitor</i> , Edein	Dr. E. Jan
<i>Mung Bean Nuclease</i>	New England Biolabs, Schwalbach
m 7 G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog	New England Biolabs, Schwalbach
PageRuler™ Prestained Protein Standard	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Pfx DNA-Polymerase (AccuPrime™)	Life Technologies, Darmstadt
<i>Protein Synthesis Initiation Inhibitor</i> , NSC 119889	Merck Calbiochem, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuklease A, RNase A	Serva, Heidelberg
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase, PNK	New England Biolabs, Schwalbach

2.5.4 Verwendete Kits und vorgefertigte Systeme

Amaya™ Cell Line Nucleofector™ Kit L	Lonza, Köln
BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Flexi® Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
FuGENE® HD Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Life Technologies, Darmstadt
Mammalian Transfection Kit	Stratagene/ Agilent Technologies, Waldbronn
Nick Translation Kit	Amersham GE Healthcare, Freiburg
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
peqGold TriFast™	peqlab, Erlangen
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene/ Agilent Technologies, Waldbronn

Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated	Promega, Mannheim
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System- T7	Promega, Mannheim
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce Thermo Scientific, USA
Qentix™ Western Blot Signal Enhancer	Pierce Thermo Scientific, USA

2.6 Verwendete Software und URLs

Axiovision 4.5	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen
BD CellQuest Pro™	BD Biosciences, Heidelberg
Clustal W (Version Omega) - MSA → http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Hinxton, Cambridge, UK
ExPASy, MW - Rechner → http://web.expasy.org/compute_pi/	Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne
Geneious (Probeversion)	Biomatters, Auckland, Neuseeland
mfold → http://mfold.rna.albany.edu/	Universität in Albany (<i>State University of New York</i>)
NCBI → http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
pDRAW32 (Version 1.1.113)	AcaClone software, Dänemark
Run 3130 Data Collection v3.0	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tina 2.0	Raytest, Straubenhardt
Python 2.6	im Haus
UN-SCAN-IT gel 6.1	Silk Scientific, Orem, Utah, USA
VisionCapt (Version 15.01)	Vilber Lourmat, Eberhardzell

shRNA-Design:

Aufgrund der schnellen Weiterentwicklung der siRNA-Designmöglichkeiten lässt sich außer TROD keines der Serviceprogramme mehr unter der ursprünglichen URL aufrufen und nutzen. In Klammern angegeben sind URLs zu Seiten mit den entsprechend aktuellen Hilfsprogrammen.

- <http://bip.weizmann.ac.il/toolbox/target/rna/siRNA.html>
- Ambion: http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html
[<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/rnai/Synthetic-RNAi-Analysis/Ambion-Silencer-Select-siRNAs/Silencer-Select-Pre-Designed-and-Validated-siRNA.html>]
- Dharmacon: <http://www.dharmacon.com/sidesign/default.aspx>
[<http://www.dharmacon.com/sirna/sirna.aspx>]
- DEQOR (Design and Quality Control of (e)siRNAs):
<http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html>
[http://deqor.mpi-cbg.de/deqor_new/input.html]
- Emboss: <http://inn.weizmann.ac.il/EMBOSS/>
[<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/siRNA>]
- Promega: <http://www.promega.com/siRNADesigner/program/>
- TROD (T7 RNAi Oligo Designer):
<http://websoft2.unige.ch/sciences/biologie/bicel/RNAi.html>

2.7 Medien und Zusätze für die Zell- und Bakterienkultur

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Medien in demineralisiertem *aqua bidest.* (Millipore) angesetzt.

Antibiotika

Ampicillin, Amp
Penicillin G
Streptomycin

Roche, Mannheim
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Fetales Kälberserum, FCS
Opti-MEM® I
Trypsin, 1-300

Gibco Life Technologies, Darmstadt
Biochrom, Berlin
Gibco Life Technologies, Darmstadt
MP Biomedicals, Eschwege

BFA-34(T)

13,4 g/l

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Zusätze:

0,1 mg/l
0,025 g/l
0,0178 g/l
0,03 g/l
0,075 g/l
0,07 g/l
0,025 g/l
3,7 g/l
0,4 ml/l

Biotin
Hypoxanthin
L-Alanin
L-Asparaginsäure
L-Glutaminsäure
Glycin
L-Prolin
NaHCO₃
1N HCl

BFA-34(T) + FCS
= BFA-34(T) mit

10 %
0,04 g/l
0,07 g/l

FCS
Penicillin
Streptomycin

ZB5d (pH 7,4)

5,32 g/l
4,76 g/l
1,25 g/l
10 ml/l
120 mg/l

Minimal Essential Medium (MEM) Eagle
(Hank's Salze, Sigma-Aldrich)
Minimal Essential Medium (MEM)
(Earles' Salze, Gibco Life Technologies)
NaHCO₃
Non Essential Amino Acids (NEA)
(Biochrom, 100x)
Natriumpyruvat

ZB5
= ZB5d mit

10 %
0,04 g/l
0,07 g/l

FCS
Penicillin
Streptomycin

BFA-35 (pH 7,4)
(Trypsinlösung)

8 g/l
0,2 g/l
1,44 g/l
0,2 g/l
2,5 g/l
1,25 g/l
0,016 g/l

NaCl
KCl
Na₂HPO₄
KH₂PO₄
Trypsin (1:300)
EDTA
Phenolrot
1N NaOH

Material

Alsever's Trypsin-Versen-Lösung (ATV) (pH 7,2)	8,5 g/l	NaCl
	0,4 g/l	KCl
	1,0 g/l	Glukose
	0,58 g/l	NaHCO ₃
	0,5 g/l	Trypsin (1:250)
	0,2 g/l	EDTA 1N NaOH
Markierungsmedium	4,5 g/l	D-Glukose
	4 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
		in DMEM ohne Cystein und Methionin
<i>Luria Bertani</i> Medium (LB) (pH 7,5)	10 g/l	Bacto™ Trypton
	5 g/l	Bacto™ Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
		5N NaOH
LB ⁺⁺ -Medium	10 mM	KCl
	20 mM	MgSO ₄
		in LB-Medium
LB-Agar	15 g/l	Bacto™ Agar in LB-Medium
LB ^{Amp} -Medium/Agar	100 µg/ml	Ampicillin in LB-Medium/Agar

2.8 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Lösungen und Puffer in demineralisiertem *aqua bidest.* (Millipore) angesetzt.

Acridinorange-Stocklösung	10 mg/ml	Acridinorange in PBS
Acridinorange-Lösung	0,25 % (v/v)	Stocklösung in 1x Phosphatpuffer
Ampicillin-Stocklösung (1000x)	100 mg/ml	Ampicillin in H ₂ O, sterilfiltriert
APS-Lösung	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat, APS in H ₂ O
Blockpuffer (Western Blot)	5 % (w/v)	Magermilchpulver in PBS-Tween
Cäsiumchlorid-Lösung	5,7 M	Cäsiumchlorid, CsCl (lösen und üN DEPC behandeln)
	5 mM	EDTA
	10 mM	Tris (pH 7,0)
Calciumchlorid-Transfektionslösung (pH 7,2)	2,5 M	Calciumchlorid, CaCl ₂
	10 mM	HEPES
Coomassie-Stocklösung	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v)	Methanol
	3 % (v/v)	Glycerin

Coomassie-Fixierlösung	30 % (v/v) 10 % (v/v)	Methanol Essigsäure
DNA-Probenpuffer (5x), FR	0,125 % (w/v) 30 % (v/v)	Orange G Glycerin
DEPC-Wasser (H_2O_{DEPC}) (RNase-freies Wasser)	0,1 % (w/v)	DEPC in H_2O (RT üN, autoklavieren zur DEPC-Inaktivierung)
dNTP-Mix (50x)	10 mM 10 mM 10 mM 10 mM	dATP dCTP dGTP dTTP
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml	Ethidiumbromid in H_2O
FACS-Puffer I	2 % (v/v)	FCS in PBS
FACS-Puffer II	10 % (v/v)	FCS in PBS
GelRed-Lösung	0,03 % (v/v) 0,1 M	GelRed NaCl
Glyoxal	circa 8,8 M	Glyoxal (entionisiert)
HEBS (<i>HEPES Buffered Saline</i>) (2x) (pH 7,2)	4,0 g/l 0,185 g/l 0,063 g/l 0,5 g/l 2,5 g/l	NaCl KCl $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ Glukose HEPES
Jagow-Anodenpuffer (10x) (pH 8,9)	2 M	Tris
Jagow-Gelpuffer (pH 8,45)	3 M 0,3 % (w/v)	Tris SDS
Jagow-Kathodenpuffer (10x) (pH 8,25)	1 M 1 M 1 % (w/v)	Tris Tricin SDS
Laemmli-Puffer (10x) (pH 8,3) (für Transferpuffer)	0,25 M 1,925 M	Tris Glycin
Laemmli-Probenpuffer (6x)	62 mM 30 % (v/v) 10 % (w/v) 15 % (v/v) 0,05 % (w/v)	Tris (pH 6,8) Glycerin SDS β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
MiniPräp-Lösung I (pH 8,0)	50 mM 10 mM 50 mM	Tris EDTA Glukose
MiniPräp-Lösung II	0,2 M 1 % (v/v)	NaOH Triton X-100
MiniPräp-Lösung III (pH 4,8)	3 M	Natriumacetat

Material

PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	2,7 mM 137 mM 1,5 mM 7,4 mM 0,9 mM 0,5 mM	KCl NaCl KH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O CaCl ₂ x 2H ₂ O MgCl ₂ x 6H ₂ O
PBS-A		= PBS ohne CaCl ₂ und MgCl ₂
PBS-Tween (PBST)	0,05 % (v/v)	Tween-20 in PBS
PFA-Lösung (4%)	4 % (w/v)	Paraformaldehyd, PFA in PBS-A
Phenol-Arbeitslösung	0,1 % (w/v)	Hydroxychinolin in TE-gesättigter Phenollösung
Phosphatpuffer (50x) (pH 6,8-7)	250 mM 250 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
Ponceau-Färbelösung	2,5 g/l 40 % (v/v) 1,5 % (v/v)	Ponceau S Methanol Essigsäure
RIP-Lösung I (pH 7,6)	1 % (v/v) 0,1 % (w/v) 0,1 % (w/v) 20 mM 100 mM 1 mM 2 g/l	Triton X-100 DOC SDS Tris NaCl EDTA BSA
RIP-Lösung II (pH 7,6)	1 % (v/v) 0,5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 20 mM 100 mM 1 mM 2 mg/l	Triton X-100 DOC SDS Tris NaCl EDTA BSA
RIP-Lösung III (pH 7,6)	0,2 % (v/v) 20 mM 100 mM 1 mM	Triton X-100 Tris NaCl EDTA
RIP-Lösung IV (pH 7,6)	0,06 % (v/v) 6 mM 30 mM 0,3 mM	Triton X-100 Tris NaCl EDTA
RIP-Sucrose-Lösung (pH 7,6)	25 % (w/v) 1 % (v/v) 0,5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 20 mM 100 mM 1 mM 2 mg/l	Sucrose Triton X-100 DOC SDS Tris NaCl EDTA BSA

RNA-Lysis-Mix	4 M 0,1 M 25 mM 0,5 % (w/v)	Guanidiniisothiocyanat β -Mercaptoethanol Lithiumcitrat Sarkosyl
RNA-Probenpuffer (5x), FR	0,125 % (w/v) 30 % (v/v) 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v)	Orange G Glycerin Bromphenolblau Xylencyanol
RNase A-Lösung	10 mg/ml	RNase A in 1x TE
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 (pH 6,8) SDS Glycerin Harnstoff β -Mercaptoethanol Bromphenolblau Phenolrot
SDS-PAGE-Sammelgel	4 % (v/v) 0,75 M 0,075 % (w/v) 0,08 % (w/v) 0,09 % (v/v)	Acrylamid (40%) (29:1) Tris-HCl (pH 8,45) } (Jagow-Gelpuffer) SDS APS TEMED
SDS-PAGE-Trenngel	6-16 % (v/v) 1 M 0,1 % (w/v) 5,5 % (v/v) 0,05 % (w/v) 0,05 % (v/v)	Acrylamid (40%) (29:1) Tris-HCl (pH 8,45) } (Jagow-Gelpuffer) SDS Glycerin APS TEMED
Sephadex® G-50 Arbeitslösung	10-20g	Sephadex® G-50 in 1x TE-Puffer - in 1x TE-Puffer quellen lassen - überschüssigen TE-Puffer abnehmen - 1-2x mit 1x TE-Puffer waschen - entgasen und autoklavieren
SSC-Transferpuffer (20x) (pH 7,0)	3 M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat
TAE-Puffer (pH 7,8)	40 mM 5 mM 1 mM	Tris Natriumacetat EDTA
TE-Puffer (pH 7,5)	10 mM 1 mM	Tris EDTA
TES-Puffer (pH 7,5)	10 mM 5 mM 0,5 % (w/v)	Tris EDTA SDS
Transformationspuffer (TFB)	60 mM 15 % (v/v) 10 mM	CaCl ₂ Glycerin PIPES (pH 7,1)

Transferpuffer (Western Blot)	10 % (v/v)	Laemmli-Puffer (10x)
	18 % (v/v)	Methanol
ZETA-Hybridisierungsmix	1 mM	EDTA
	250 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	250 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	7 % (w/v)	SDS
ZETA-Waschlösung (25x) (pH 7,0)	1 M	Phosphatpuffer
	25 mM	EDTA
	0,5 M	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	0,5 M	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
ZETA-Waschlösung (1%)	4% (v/v)	25x ZETA-Waschlösung
	1 % (w/v)	SDS
ZETA-Waschlösung (5%)	4% (v/v)	25x ZETA-Waschlösung
	5 % (w/v)	SDS

2.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung wurden von Metabion (Martinsried) oder Biomers (Ulm) bezogen und vom Hersteller frei von Schutzgruppen, entsalzt und lyophilisiert geliefert. Alle Oligonukleotide wurden in demineralisiertem *aqua bidest.* (Millipore) gelöst. (f/for = forward, r/rev = reverse)

2.9.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Aufgeführt sind die Sequenzen der Oligonukleotide in 5'-3' Richtung sowie die Grundkonstrukte, von denen ausgehend kloniert und zu deren Sequenzierung sie genutzt wurden.

Name	Konstrukt	Sequenz (5' → 3')
bluescript rev	pBluescript II SK(-)	AACAGCTATGACCATG
CM84	pCI	GCACCTATTGGTCTTACTGACA
CM85	pCI	ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
CMVf	CMV-Promotor	GTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGC
DR20	pYGFp, PK13	TAAGATCTTAATGCATATGTTTCATCCATGCCATGTGTAATCCC
EMCVf	EMCV-IRES	GAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGC
EMCVr	EMCV-IRES	CCTTCAGCCCCTTGTTGAATACG
FCV mlu f	pCH1	CGCGACGCGTTCAATGACTAAATTATGAATTC
FCV seq f 6140	pCH1	GGGGTACCACCTTATGTCTGACAC
seq f 6715	pCH1	AATACCAACTTCAAAGGTATG
FCV r 5390	pCH1	CTAACAGAAAGAAACCTATTGGGG
FCV seq r 5770	pCH1	AGCTGCAGTTGACATTTGGGC
FCV seq r 6780	pCH1	GGCTGCAGTAGTAATAAATGCGG
FCV seq r C-term	pCH1	GGCTGCAGCCCTGGGGTTAGGCGCTAGAG
M13-21		TGTA AAAACGACGGCCAGTGAA
MH98f	= T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAG
pCITE rev	pCITE-2a(+)	CAGCTATGACCATGATTACG
PCL1	pCI	CTTTTGCTGGCCTTTTGCT
PCL2	pCI	GGGAAAGCCGGCGAACGTGGC
PCL19	pCH1	TGTGATAGGATCCACCAAGATTGC
PCL22	pCH1	CTACATGGGATCCCAATTGGCAA
RF100	pRF42_ASIA	TCTCTGTGTGGCCTGTCACTT
RF101	pRF42_ASIA	GGGACACTTTCGGACATCT

RF103	pRF42_ASIA	GTCTGATAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAG
RF104	pRF42_ASIA	CGGAGGTCGACCAGTACTC
RF105	pRF42_ASIA	TCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
RF106	pRF42_ASIA	CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
RF107	pRF42_ASIA	GCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
RF108	pRF42_ASIA	CGACTAGCTTGGCTGTTTTGG
RHD38.1	pRmRNA	GTGGAAACAAGGCCAAGTGAAG
RHD39.2	pRmRNA	GGCACTCCTGCCGCTGCACCTGTG
RHD40	pRmRNA	GATAGGTTTAAGTGTGG

2.9.2 Oligonukleotide für die Mutagenese

Aufgeführt sind die Sequenzen der Oligonukleotide in 5'-3' Richtung sowie die Konstrukte, zu deren Herstellung sie genutzt wurden.

Name	Konstrukt	Sequenz (5' → 3')
FCV		
MH1f	pMH1	GACTAAATTATGAGTTCAATTCTAGG
MH1r	pMH1	CCTAGAATTGAACTCATAATTTAGTC
MH2f	pMH2	GACTAAATTATGACTTCAATTCTAGG
MH2r	pMH2	CCTAGAATTGAAGTCATAATTTAGTC
MH3f	pMH3	CTAAATTATGAACTCAATTCTAGGC
MH3r	pMH3	GCCTAGAATTGAGTTCATAATTTAG
MH4f	pMH4	CTAAATTATGAATTTAATTCTAGGC
MH4r	pMH4	GCCTAGAATTAAATTCATAATTTAG
MH6f	pMH6	CTAAATTATGAATCGAATTCAGGC
MH6r	pMH6	GCCTAGAATTCGATTCATAATTTAG
MH7f	pMH7	CTAAATTATGCCCGAATTCAGGC
MH7r	pMH7	GCCTAGAATTCGGGGCATAATTTAG
MH26f	pMH26	CTAAATTATGAATCCAATTCAGGC
MH26r	pMH26	GCCTAGAATTGGATTCATAATTTAG
MH30f	pMH30	CTAAATTATGTCTTCAATTCTAGG
MH30r	pMH30	CCTAGAATTGAAGACATAATTTAG
MH31f	pMH31	CTAAATTATGTTTTCAATTCTAGG
MH31r	pMH31	CCTAGAATTGAAAACATAATTTAG
MH34f	pMH34	TGAATTCAATTCTACGCTTAATTGATACTG
MH34r	pMH34	ACAGTATCAATTAAGCGTAGAATTGAATTC
MH35f	pMH35	TCAATTCTAGGCTTATTTGATACTGTTAC
MH35r	pMH35	TGTAACAGTATCAAATAAGCCTAGAATTG
MH36f	pMH36	TTCAATTCTAAGCTTAGTTGATACTGTTAC
MH36r	pMH36	TTGTAACAGTATCAACTAAGCTTAGAATTG
MH40f	pMH40	AAATTATGAATTTAGTTCAGGCTTAATTG
MH40r	pMH40	CAATTAAGCCTAGAACTAAATTCATAATTT
MH41f	pMH41	GACTAAATTATGATAACAATTCAGGCTTA
MH41r	pMH41	TAAGCCTAGAATTGTTATCATAATTTAGTC
MH42f	pMH42	TGAATTCAATAATAGGCTTAATTGATACTG
MH42r	pMH42	CAGTATCAATTAAGCCTATTATTGAATTCA
MH44f	pMH44	TGAATTTAATTCTATGCTTATTTGATACTG
MH44r	pMH44	CAGTATCAAATAAGCATAGAATTAATTTCA
MH45f	pMH45	TGAATTCAATTCTAAGCTTATTTGATACTG
MH45r	pMH45	CAGTATCAAATAAGCTTAGAATTGAATTCA
MH46f	pMH46	CTAAATTATGACAATTCAGGCTTAATTG

MH46r	pMH46	CAATTAAGCCTAGAATTGTCATAATTTAG
MH47f	pMH47	AATTATGAATTTTCTAGGCTTAATTGATAC
MH47r	pMH47	GTATCAATTAAGCCTAGAAAATTCATAATT
MH48f	pMH48	TTATGAATTCAATAGGCTTAATTGATACTG
MH48r	pMH48	CAGTATCAATTAAGCCTATTGAATTCATAA
MH49f	pMH49	GAATTC AATTCGCTTAATTGATACTGTTAC
MH49r	pMH49	GTAACAGTATCAATTAAGCGAATTGAATTC
MH50f	pMH50	AATTCTAGTAATTGATACTGTTACAAATAC
MH50r	pMH50	GTATTTGTAACAGTATCAATTACTAGAATT
MH51f	pMH51	AATTCTAGGCTTTGATACTGTTACAAATAC
MH51r	pMH51	GTATTTGTAACAGTATCAAAGCCTAGAATT
MH52f	pMH52	AATTCTAGGCTTAAATACTGTTACAAATAC
MH52r	pMH52	GTATTTGTAACAGTATTTAAGCCTAGAATT
MH53f	pMH53	GGCTTAATTGCTGTTACAAATACAATTGG
MH53r	pMH53	CCAATTGTATTTGTAACAGCAATTAAGCC
MH54f	pMH54	GGCTTAATTGATATTACAAATACAATTGGC
MH54r	pMH54	GCCAATTGTATTTGTAATATCAATTAAGCC
MH55f	pMH55	AATTGATACTGCAAATACAATTGGCAAAGC
MH55r	pMH55	GCTTTGCCAATTGTATTTGCAGTATCAATT
MH56f	pMH56	TTGATACTGTTAATACAATTGGCAAAGCAC
MH56r	pMH56	GTGCTTTGCCAATTGTATTAACAGTATCAA
MH57f	pMH57	ATACTGTTACAACAATTGGCAAAGCACAAAC
MH57r	pMH57	GTTGTGCTTTGCCAATTGTTGTAACAGTAT
MH58f	pMH58f	CTAAATTATGACCCGAATTCTAGGC
MH58r	pMH58r	GCCTAGAATTCGGGTCAATAATTTAG
MH69f	pMH69	AAATTATGATTTCAATTC TAGGCTTAATTG
MH69r	pMH69	CAATTAAGCCTAGAATTGAAATCATAATTT
MH70f	pMH70	AATGACTAAATTATGCCTTCAATTCTAGGC
MH70r	pMH70	GCCTAGAATTGAAGGCATAATTTAGTCATT
MH71f	pMH71	TGAATTCAATTCTATGCTTAATTGATACTG
MH71r	pMH71	CAGTATCAATTAAGCATAGAATTGAATTC
MH72f	pMH72	AATGACTAAATTATGATAGCAATTCTAGGC
MH72r	pMH72	GCCTAGAATTGCTATCATAATTTAGTCATT
MH74f	pMH74	TTCAATTCTAGTAATATTTGATACTGTTAC
MH74r	pMH74	GTAACAGTATCAAATATTACTAGAATTGAA
MH75f	pMH75	TTCAATTCTAATAGTATTTGATACTGTTAC
MH75r	pMH75	GTAACAGTATCAAATACTATTAGAATTGAA
MH77f	pCH1_GFP	GAGTCGACCCAGGGGGCCGCTTCGAGCAG
MH77r	pCH1_GFP	CTGCTCGAAGCGGCCCCCTGGGTCTGACTC
MH78f	pCH1_GFP	TTAATTGATACTCGAGCAAATACAATTGGC
MH78r	pCH1_GFP	GCCAATTGTATTTGCTCGAGTATCAATTAA
MH79f	pMH79	TATGAATTCAAATCTAGGCTTAATTGATAC
MH79r	pMH79	GTATCAATTAAGCCTAGATTTGAATTCATA
MH80f	pMH80	TTCAAATCTAGGCTTATTTGATACTGTTAC
MH80r	pMH80	GTAACAGTATCAAATAAGCCTAGATTTGAA
MH85f	pMH85	AGTTTCTGTGATCTGCCACTTCTTTGTTGC
MH85r	pMH85	GCAACAAAGAAGTGGCAGATCACAGAACT
MH86f	pMH86	CTCCAGCTTTTGGAAACCGTGTGGGATTGC
MH86r	pMH86	GCAATCCCACACGGTTCCAAAAGCTGGGAG
MH87f	pMH87	AGATTCTTTTCAAGGCATCTTTAGGACCAC
MH87r	pMH87	GTGGTCCTAAAGATGCCTTGAAAAGAACTCT

MH88f	pMH88	AATCACAATAACATGTAGTGAGAAGGATGG
MH88r	pMH88	CCATCCTTCTCACTACATGTTATTGTGATT
MH89f	pMH89	GGAGTGACAACACATGTACACCATCCAATG
MH89r	pMH89	CATTGGATGGTGACATGTGTTGTCACCTCC
MH120f	pMH120	AGCACAACAAATCCTCTTGGACAAAGCTGC
MH120r	pMH120	GCAGCTTTGTCCAAGAGGATTTGTTGTGCT
MH121f	pMH121	AGCAATTTAACAACCTCTCTTGAGCAGAGGG
MH121r	pMH121	CCCTCTGCTCAAGAGAGTTGTTAAATTGCT
MH123f	pMH123	ATGCAATTAGACTCGGATATAGAAATCTGT
MH123r	pMH123	ACAGATTTCTATATCCGAGTCTAATTGCAT
MH124f	pMH124	ACTATCATATAACTATCTGTTTAAAAATTG
MH124r	pMH124	CAATTTTAAACAGATAGTTATATGATAGT
MH142f	pMH150	GTTCAATGACTAAATTATGTATTC AATTCT
	pMH153	
	pMH154	
MH142r	pMH150	AGAATTGAATACATAATTTAGTCATTGAAC
	pMH153	
	pMH154	
PCL11f	pMH142	GTTCAATGACTAAATTATGTATTC AATTCT
PCL12r	pMH142	AGAATTGAATACATAATTTAGTCATTGAAC
PCL13	pMH143	TTCAATGACTAAATTATGCATTCAATTCTAGGC
PCL14	pMH143	GCCTAGAATTGAATGCATAATTTAGTCATTGAA
PCL9	pMH144	TTCAATGACTAAATTATGGATTCAATTCTAGGC
PCL10	pMH144	GCCTAGAATTGAATCCATAATTTAGTCATTGAA
MH145f	pMH145	ATGACTAAATTATGGGTTC AATTCTAGGCT
MH145r	pMH145	AGCCTAGAATTGAACCCATAATTTAGTCAT
PCL32f	pMH146	CAATTCTACGCTTATTTGATACTGTTAC
PCL32r	pMH146	GTAACAGTATCAAATAAGCGTAGAATTG
MH147f	pMH147	GACTAAATTATGATGACAATTCTAGGCTTA
MH147r	pMH147	TAAGCCTAGAATTGTCATCATAATTTAGTC
MH148f	pMH148	AAATTATGAATTTGATTCTAGGCTTAATTG
MH148r	pMH148	CAATTAAGCCTAGAATCAAATTCATAATTT
MH149f	pMH149	ATTC AATTCTAGTGATAATTGATACTGTTA
MH149r	pMH149	TAACAGTATCAATTATCACTAGAATTGAAT
MH151f	pMH151	ATTC AATTCTAGTATTAATTGATACTGTTA
MH151r	pMH151	TAACAGTATCAATTAATACTAGAATTGAAT
MH152f	pMH152	CTAAATTATGTTAGTAATTCTAGGCTTAAT
MH152r	pMH152	ATTAAGCCTAGAATTACTAACATAATTTAG
MH155f	pMH155	TGACTAAATTATGATAGGCTTAATTGATAC
MH155r	pMH155	GTATCAATTAAGCCTATCATAATTTAGTCA
MH156f	pMH156	TGACTAAATTATGTTAGGCTTAATTGATAC
	pMH158	
	pMH160	
MH156r	pMH156	GTATCAATTAAGCCTAACATAATTTAGTCA
	pMH158	
	pMH160	
MH162f	pMH162	TAATATTTGACCACCTTACAAATACAATTG
MH162r	pMH162	CAATTGTATTTGTAAGGTGGTCAAATATTA
MH163f	pMH163	CAATTCGGTGGATATTTGACCACCTTACAAATACAATTG
MH163r	pMH163	TTGTAAGGTGGTCAAATATCCACCGAATTGAATTCATAA
MH164f	pMH164	TAGTATTTGCCACCTTACAAATACAATTG

MH164r	pMH164	CAATTGTATTTGTAAGGTGGGCAAATACTA
MH165f	pMH165	TCTAAGGTGGGTGCCCACCTTACAAATACAAATTGG
MH165r	pMH165	GTAAGGTGGGCAACCCACCTTAGAATTGAATTC
MH167f	WTΔCys	AGGTATGTATATCTCTGGATCTTTACAGAG
MH167r	WTΔCys	CTCTGTAAAGATCCAGAGATATACATACCT
MH168f	pMH168	AAATTATGAATTTGTTTCTAGGCTTAATTG
MH168r	pMH168	ATTAAGCCTAGAAACAAATTCATAATTTAG
MH169f	pMH169	AAATTATGTATTTGTTTCTAGGCTTAATTG
MH169r	pMH169	ATTAAGCCTAGAAACAAATACATAATTTAG
MH170f	pMH170	TATGATGTTGTTGTTAGGCTTAATTGATAC
MH170r	pMH170	CCTAACAACAACATCATAATTTAGTCATTG
MH173f	pMH173	ATTATGTCCCCCCCCATTCAATTCTAGGC
MH173r	pMH173	GAATGGGGGGGGACATAATTTAGTCATTG
MH174f	pMH174	TTATGTCCCATTCATTTCTAGGCTTAATTG
MH174r	pMH174	ATTGAATGGGACATAATTTAGTCATTGAAC
MH175f	pMH175	TTATGTCCCCCATTCATTTCTAGGCTTAA
MH175r	pMH175	ATTGAATGGGGGGACATAATTTAGTCATTG
MH176f	pMH176	TCTAGGCTTAATTTATACTGTTACAAATAC
MH176r	pMH176	TTGTAACAGTATAAATTAAGCCTAGAATTG
MH177f	pMH177	TCTACGCTTATTTTATACTGTTACAAATAC
MH177r	pMH177	GTATAAAATAAGCGTAGAATTGAATTCATA
MH178f	pMH178	TTCTGATCTACGCTTATTTTATACTGTTAC
MH178r	pMH178	TATAAAATAAGCGTAGATCAGAATTCATAA
MH179f	pMH179	TCTACGTGAATTTTATACTGTTACAAATAC
MH179r	pMH179	GTATAAAATTCACGTAGAATTGAATTCATA
MH180f	pMH180	TTCTGATCTACGTGAATTTTATACTGTTAC
MH180r	pMH180	TATAAAATTCACGTAGATCAGAATTCATAA
MH181f	pMH181	TTCTGATCTACGTGAATTTGATACTGTTAC
MH181r	pMH181	CAAATTCACGTAGATCAGAATTCATAATTT
PCL2	pMH_IGR1	GGGAAAGCCGGCGAACGTGGC
FCV seq r 5770	pMH_IGR1	AGCTGCAGTTGACATTTGGGC
MH12f	pMH_IGR1	CTCACTATAGGGCCAGATATCTTAATTC
MH12r	pMH_IGR1	GAATTAAGATATCTGGGCCCTATAGTGAG
MH13f	pMH_IGR1	GAATTCCTGGGAAAGCAAAAATGTG
MH14r	pMH_IGR1	GCGTCTTCCATATGATCTTGA
MH28f	pMH_IGR1	CGACTCACTATAGGGAAAGCAAAAATG
MH28r	pMH_IGR1	CATTTTTGCTTTCCCTATAGTGAGTCG
MH109f	pMH_IGR2	ATTTCAAGATCATTGCTGCTCAACCTGCGC
MH109r	pMH_IGR2	GCGCAGGTTGAGCAGCAATGATCTTGAAAT
MH39f	pMH_IGR3	CAATTCACGGTACCAAAGCAAAAATGTG
MH39r	pMH_IGR3	CCCAAAGGATTCTAGATCAATTTTTAAAC

RHDV

MH8f	pMH8	GGGGGGCACAGGCCGCCGCCCAATGGC
MH8r	pMH8	GCCATTGGGGCGGCGGCCTGTGCCCCCC
MH9f	pMH9	CAGCCAATGGCAGCAGCTTTTCTTATG
MH9r	pMH9	CATAAGAAAAGCTGCTGCCATTGGCTG
MH10f	pMH10	GCCAATGGCAGCAGCTATGCTTATGTCTG
MH10r	pMH10	CAGACATAAGCATAGCTGCTGCCATTGGC
RHD-L1 f	L1	GGCTTTTCTTATGAATGAATTCATCGG
RHD-L1 r	L1	CCGATGAATTCATTCATAAGAAAAGCC

RHD-L2 f	L2	TTCTTATGTCTAGCTTCATCGGATTGGG
RHD-L2 r	L2	CCCAATCCGATGAAGCTAGACATAAGAA
RHD-L3 f	L3	TCTTATGTCTGAAGGCATCGGATTGGG
RHD-L3 r	L3	CCCAATCCGATGCCTTCAGACATAAGA
RHD-L1-3 f	L1-3	TCTTATGAATAGCGGCATCGGATTGGGAC
RHD-L1-3 r	L1-3	ATCCGATGCCGCTATTCATAAGAAAAGCC
RHD-R1 f	R1	GTCTGAATTCATCGCCTTGGGACTTGCAGG
RHD-R1 r	R1	CCTGCAAGTCCCAAGGCGATGAATTCAGAC
RHD-R2 f	R2	CTGAATTCATCGGAGCGGGACTTGCAGGTG
RHD-R2 r	R2	CACCTGCAAGTCCCGCTCCGATGAATTCAG
RHD-R3 f	R3	GAATTCATCGGATTGCTTCTTGCAGGTGCC
RHD-R3 r	R3	GGCACCTGCAAGAAGCAATCCGATGAATTC
RHD-R1-3 f	R1-3	GAATTCATCGCCGCGCTTCTTGCAGGTGCC
RHD-R1-3 r	R1-3	CCTGCAAGAAGCGCGGCGATGAATTCAGAC

Sonstige

MH37f	dDNA-Sonde eIF4E	ATGGCGACTGTGGAACCGGAAACCACCCC
MH37r	dDNA-Sonde eIF4E	TTAAACAACAAACCTATTTTTAGTGGTGG
MH38f	dDNA-Sonde eIF5A	ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGG
MH38r	dDNA-Sonde eIF5A	TTATTTTTGCCATGGCCTTGATTGCAACAG
MH140f	dDNA-Sonde eIF5	ATGTCTGTCAACGTCAACCGCAGCGTGTC
MH140r	dDNA-Sonde eIF5	TTAAATGGCGTCAATATCAATGTCATCATC
MH141f	dDNA-Sonde eIF5B	ATGGGGAAAGAAACAGAAAAACAAGAGCG
MH141r	dDNA-Sonde eIF5B	TTAGATGATTTCAAATACTTTCTTCAGCTC
MH84f	pYRL_IGR	GATACCATGAATTCGCCAAAAACATAAAG
MH84r	pYRL_IGR	CTTTATGTTTTTGGCGGAATTCATGGTATC
MH100f	pYRL	AGCCACCATGAATTCGAAAGTTTATGATCC
MH100r	pYRL	TATCATGTCTGGTCGACGCGCCGCTCTAG
FCV mlu f	dDNA-Sonde RL	CGCGACGCGTTCAATGACTAAATATGAATTC
MH99r	dDNA-Sonde RL	GCCGCTCTAAGATCTTTGTTCATTTTTGAG

2.9.3 Oligonukleotide für die shRNA

Aufgeführt sind die Sequenzen der Oligonukleotide in 5'-3' Richtung sowie die Konstrukte, zu deren Herstellung sie genutzt wurden.

Name	Konstrukt	Sequenz (5' → 3')
MHsh4E1f1	sh4E ₁	AGGTCGATCTAAGATGGCGACTGTGTT
MHsh4E1f2	sh4E ₁	CAAGAGACACAGTCGCCATCTTAGATCG
MHsh4E1r1	sh4E ₁	TCTTGAACACAGTCGCCATCTTAGATCG
MHsh4E1r2	sh4E ₁	GGGGCGATCTAAGATGGCGACTGTGTC
MHsh4E2f1	sh4E ₂	AGGTAACCCAGAGCACTATATTA AATT
MHsh4E2f2	sh4E ₂	CAAGAGATTTAATATAGTGCTCTGGGTT
MHsh4E2r1	sh4E ₂	TCTTGAATTTAATATAGTGCTCTGGGTT
MHsh4E2r2	sh4E ₂	GGGGAACCCAGAGCACTATATTA AATC
MHsh4E3f1	sh4E ₃	AGGTAAGCAAACCTTCGATTGATCTTT
MHsh4E3f2	sh4E ₃	CAAGAGAAGATCAATCGAAGGTTTGCTT
MHsh4E3r1	sh4E ₃	TCTTGAAGATCAATCGAAGGTTTGCTT
MHsh4E3r2	sh4E ₃	GGGGAAGCAAACCTTCGATTGATCTTC
MHsh4E4f1	sh4E ₄	AGGTAAGTTTGATACTGTTGAAGACTT
MHsh4E4f2	sh4E ₄	CAAGAGAGTCTTCAACAGTATCAA AACTT
MHsh4E4r1	sh4E ₄	TCTTGAAGTCTTCAACAGTATCAA AACTT

MHsh4E4r2	sh4E ₄	GGGGAAGTTTGATACTGTTGAAGACTC
MHsh5A1f1	sh5A ₁	AGGTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTT
MHsh5A1f2	sh5A ₁	CAAGAGAAGTAGACATCTCGACGATCTT
MHsh5A1r1	sh5A ₁	TCTTGAAAGTAGACATCTCGACGATCTT
MHsh5A1r2	sh5A ₁	GGGGAAGATCGTCGAGATGTCTACTTC
MHsh5A2f1	sh5A ₂	AGGTAAGATATCTGCCCCGTCAACTCTT
MHsh5A2f2	sh5A ₂	CAAGAGAGAGTTGACGGGCAGATATCTT
MHsh5A2r1	sh5A ₂	TCTTGAAAGAGTTGACGGGCAGATATCTT
MHsh5A2r2	sh5A ₂	GGGGAAGATATCTGCCCCGTCAACTCTC
MHsh5A3f1	sh5A ₃	AGGTAAGGAGATTGAGCAGAAGTATTT
MHsh5A3f2	sh5A ₃	CAAGAGAATACTTCTGCTCAATCTCCTT
MHsh5A3r1	sh5A ₃	TCTTGAAATACTTCTGCTCAATCTCCTT
MHsh5A3r2	sh5A ₃	GGGGAAGGAGATTGAGCAGAAGTATTC
MHsh5A4f1	sh5A ₄	AGGTAAGAGATCCTGATCACAGTGCTT
MHsh5A4f2	sh5A ₄	CAAGAGAGCACTGTGATCAGGATCTCTT
MHsh5A4r1	sh5A ₄	TCTTGAAGCACTGTGATCAGGATCTCTT
MHsh5A4r2	sh5A ₄	GGGGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTC
MHsh51f1	sh5 ₁	AGGTAAGAATGACCGTTACATTGTCTT
MHsh51f2	sh5 ₁	CAAGAGAGACAAATGTAACGGTCATTCTT
MHsh51r1	sh5 ₁	TCTTGAAAGACAAATGTAACGGTCATTCTT
MHsh51r2	sh5 ₁	GGGGAAGAATGACCGTTACATTGTCTC
MHsh52f1	sh5 ₂	AGGTAAACAGATCTGCATGTCAATCTT
MHsh52f2	sh5 ₂	CAAGAGAGATTGACATGCAGATCTGTTT
MHsh52r1	sh5 ₂	TCTTGAAGATTGACATGCAGATCTGTTT
MHsh52r2	sh5 ₂	GGGGAAACAGATCTGCATGTCAATCTC
MHsh53f1	sh5 ₃	AGGTAAAGGCGCAGAATGGATGAAATT
MHsh53f2	sh5 ₃	CAAGAGATTTTCATCCATTCTGCGCCTTT
MHsh53r1	sh5 ₃	TCTTGAAATTTTCATCCATTCTGCGCCTTT
MHsh53r2	sh5 ₃	GGGGAAAGGCGCAGAATGGATGAAATC
MHsh54f1	sh5 ₄	AGGTAAGAGCGTGTTAACATCCTGTTT
MHsh54f2	sh5 ₄	CAAGAGAACAGGATGTTAACACGCTCTT
MHsh54r1	sh5 ₄	TCTTGAAACAGGATGTTAACACGCTCTT
MHsh54r2	sh5 ₄	GGGGAAGAGCGTGTTAACATCCTGTTC
MHsh5B1f1	sh5B ₁	AGGTAAGAACGTTTCGAGAGTAACTT
MHsh5B1f2	sh5B ₁	CAAGAGAGTTTACTCTCGAACGTTCTTT
MHsh5B1r1	sh5B ₁	TCTTGAAAGTTTACTCTCGAACGTTCTTT
MHsh5B1r2	sh5B ₁	GGGGAAAGAACGTTTCGAGAGTAACTC
MHsh5B2f1	sh5B ₂	AGGTAAGAAGGAGCAGAGTAAACAGTT
MHsh5B2f2	sh5B ₂	CAAGAGACTGTTTACTCTGCTCCTTCTT
MHsh5B2r1	sh5B ₂	TCTTGAACTGTTTACTCTGCTCCTTCTT
MHsh5B2r2	sh5B ₂	GGGGAAGAAGGAGCAGAGTAAACAGTC
MHsh5B3f1	sh5B ₃	AGGTAAGGAAAGCTGTTAACTAAGTTT
MHsh5B3f2	sh5B ₃	CAAGAGAACTTAGTTAACAGCTTTCCTT
MHsh5B3r1	sh5B ₃	TCTTGAAACTTAGTTAACAGCTTTCCTT
MHsh5B3r2	sh5B ₃	GGGGAAGGAAAGCTGTTAACTAAGTTC
MHsh5B4f1	sh5B ₄	AGGTAAGGAATTACGTGTGAAGAACTT
MHsh5B4f2	sh5B ₄	CAAGAGAGTTCTTCACACGTAATTCCTT
MHsh5B4r1	sh5B ₄	TCTTGAAAGTTCTTCACACGTAATTCCTT
MHsh5B4r2	sh5B ₄	GGGGAAGGAATTACGTGTGAAGAACTC

2.10 Plasmide

2.10.1 Käuflich erworbene Plasmide

pBluescript II SK(-)	Stratagene/ Agilent Technologies, Waldbronn
pcDNA™3.1	Life Technologies, Darmstadt
pCI	Promega, Mannheim
pCITE-2a(+)	Novagen Merck, Darmstadt
pCR®2.1	Life Technologies, Darmstadt
pEGF-N3	Clontech Takara Bio, Frankeich
pRL-CMV	Promega, Mannheim
pYES2	Life Technologies, Darmstadt

2.10.2 Zur Verfügung gestellte Plasmide

pCH1 Dr. C. Luttermann, FLI

Beruh auf dem Vektor pCITE-2a(+) und enthält neben dem T7-Promotor eine EMCV-IRES. Anschließend ist die zur Sequenz der subgenomischen FCV RNA analoge cDNA ab dem Startkodon des VP1 kodiert.

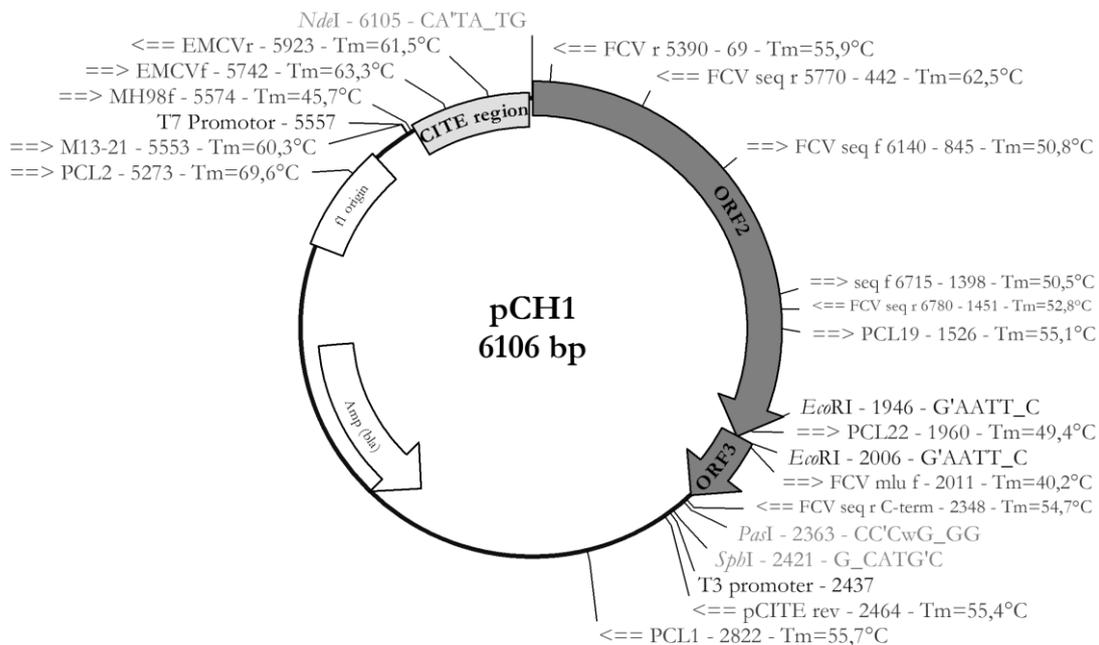


Abb. 2.1: Vektorkarte des pCH1 Expressionsplasmids

pCH74.3

Dr. C. Luttermann, FLI

Basierend auf dem Konstrukt pCH1 ist der Spacerbereich innerhalb der TURBS zwischen Motiv 1 und Motiv 2 deletiert (Δ nt1951-1980).

pCnN20.2

Dr. C. Luttermann, FLI

Ausgehend von dem Konstrukt pCH1 wurde der 5'-terminale Bereich des FCV ORF2 durch die Sequenz des pestiviralen N^{Pro}-Gens substituiert, so dass die TURBS des VP1 erhalten bleibt.

pEJ4

Dr. E. Jan

Enthält die IGR_IRES Sequenz im Rückgrat des Vektors pCR®2.1, flankiert von den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NcoI* (unterstrichen) und gefolgt von der *firefly* Luziferase. Das Kodon für das erste Alanin, an dem initiiert wird, ist fett und unterstrichen.

IGR_IRES Sequenz:

```

1  GAATTCAAAG CAAAAATGTG ATCTTGCTTG TAAATACAAT TTTGAGAGGT
   EcoRI
51 TAATAAATTA CAAGTAGTGC TATTTTTGTA TTTAGGTTAG CTATTTAGCT
101 TTACGTTCCA GGATGCCTAG TGGCAGCCCC ACAATATCCA GGAAGCCCTC
151 TCTGCGGTTT TTCAGATTAG GTAGTCGAAA AACCTAAGAA ATTTACCTGC
201 TACATTTCAA GATACCATGG
      NcoI
    
```

PK13

Dr. C. Fetzner, FLI

Kodiert für ein grün fluoreszierendes Protein (*Green fluorescent protein*, GFP) hinter einem CMV- und einem T7-Promotor. Flankiert von den Restriktionsschnittstellen *NheI*, *AvaI* und *XhoI* am 5'-Ende und *AvaI* am 3'-Ende.

pRmRNA

Prof. Dr. G. Meyers, FLI

Beruhrt auf dem Vektor pBluescript II SK(-) und enthält neben dem T7-Promotor die zur Sequenz der subgenomischen RHDV RNA analoge cDNA.

pRF42_ASIA

Dr. R. Flick, BioProtection Systems Corporation

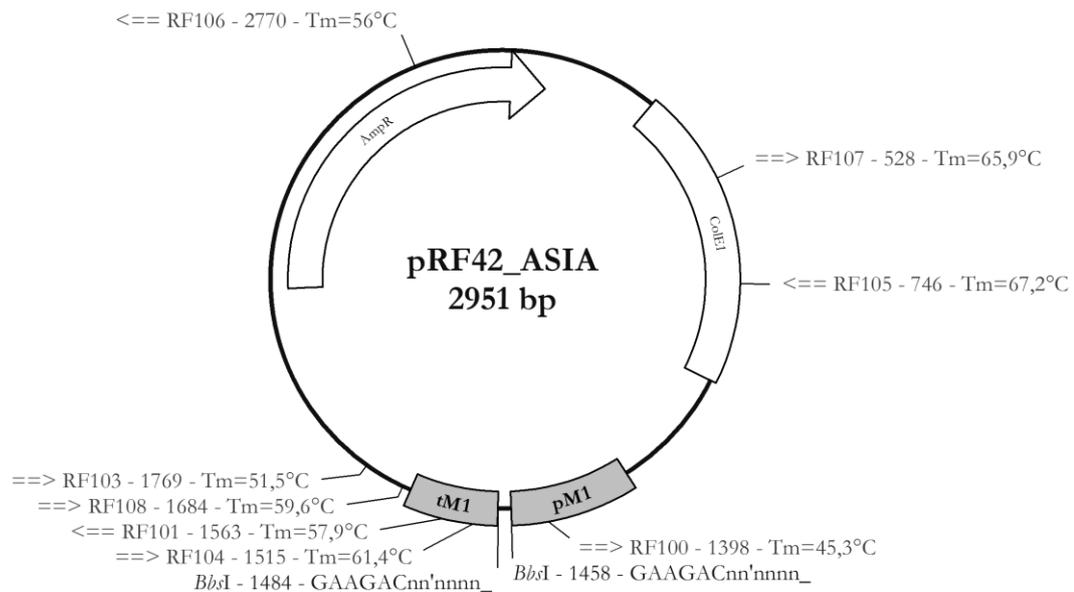


Abb. 2.2: Vektorkarte des RNA-Polymerase-I-Transkriptionsplasmids pRF42_ASIA

pYGFP

Dr. C. Luttermann, FLI

Kodiert im pYES2 für ein GFP stromabwärts von einem Gal1- und einem T7-Promotor. Flankiert von den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* am 5'-Ende und *KpnI*, *PasI* und *SphI* am 3'-Ende.

2.10.3 Plasmide aus eigener Herstellung

Die Konstrukte für die transienten Expressionsstudien im ersten Teil dieser Arbeit wurden basierend auf pCH1 (Luttermann und Meyers, 2007) und pRmRNA (Meyers, 2003) mittels gezielter Mutagenese (QuikChange) und den Oligonukleotiden aus Abschnitt 2.9.2 erstellt. Für die globale Interaktionsbetrachtung wurden auf dieselbe Weise Mutanten erzeugt, ausgehend von den Vektoren pCnN20.2 ($\Delta\text{FCV_ORF2}_{\text{N-term}} \rightarrow \text{N}^{\text{Pro}}$) und pCH74.3 ($\Delta\text{SpacerM1-M2}$). Für die Konstrukte mit substituiertem FCV ORF3 C-Terminus wurde das Grundkonstrukt pCH1_GFP etabliert, in dem die ersten 30 Nukleotide des ORF3 erhalten sind und der Rest durch die GFP kodierende Sequenz ersetzt wurde ($\Delta\text{FCV_ORF3}_{\text{C-term}} \rightarrow \text{GFP}$). Dazu wurde das GFP aus dem Plasmid PK13 durch *AvaI* und die mit den Oligonukleotiden MH77f/r eingefügte Restriktionsschnittstelle *PasI* in den Wildtypvektor pCH1 umklontiert. Der Vektor pCH1 enthält stromabwärts des ORF3 bereits eine *PasI* Schnittstelle. Die im Leseraster des ORF3 gelegene *AvaI* Schnittstelle wurde durch Mutagenese mit den Oligonukleotiden MH78f/r eingefügt.

pYRL +/-IGR Für die Tests zur Funktionalität der IGR_IRES wurden die beiden Konstrukte pYRL und pYRL_IGR erzeugt. Dazu wurde zunächst mit den Oligonukleotiden MH84f/r die IGR_IRES aus dem Plasmid pEJ4 amplifiziert und durch Einfügen in das Konstrukt pYGFP der Zwischenklon pYGFP_IGR erzeugt. Die Renilla-Luziferase wurde mit den Oligonukleotiden MH100f/r aus dem Vektor pRL-CMV amplifiziert und ersetzte nach Restriktion im Konstrukt pYRL_IGR das GFP. Durch Restriktion der IGR_IRES entstand das Konstrukt pYRL.

pMH_IGR1 Die IGR_IRES wurde mit den Oligonukleotiden MH13f/14r aus dem Vektor pEJ4 heraus amplifiziert und in den Zwischenklon pMH12 (nach gezielter Mutagenese von pCH1 mit MH12f/r) übertragen, so dass sie im Zwischenklon pMH14 die EMCV_IRES ersetzte. Nach Reparatur des T7-Promotors durch gezielte Mutagenese mit den Oligonukleotiden MH28f/r entstand das Konstrukt pMH_IGR1.

pMH_IGR2

Mittels gezielter Mutagenese mit den Oligonukleotiden MH109f/r wurde das Startkodon des FCV ORF2 im Plasmid pMH_IGR1 zu dem Kodon TGC mutiert.

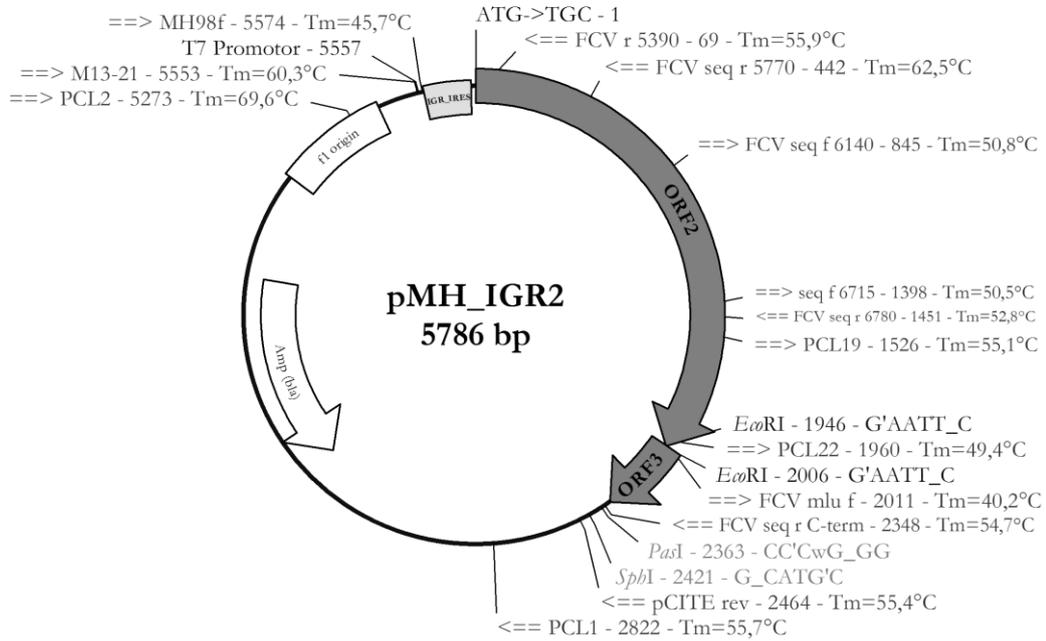


Abb. 2.3: Vektorkarte des Expressionsplasmids pMH_IGR2

pMH_IGR3

Ausgehend vom oben beschriebenen Zwischenklon pMH14 wurde die Gesamtsequenz von IGR_IRES, FCV ORF2 und ORF3 durch Restriktion in den Basisvektor pCI überführt. Abgeleitet von diesem Konstrukt wurde die gleiche Sequenz mit Hilfe der Oligonukleotide MH39f/r in den Vektor pcDNA3.1 gesetzt, wodurch das Konstrukt pMH_IGR3 entstand.

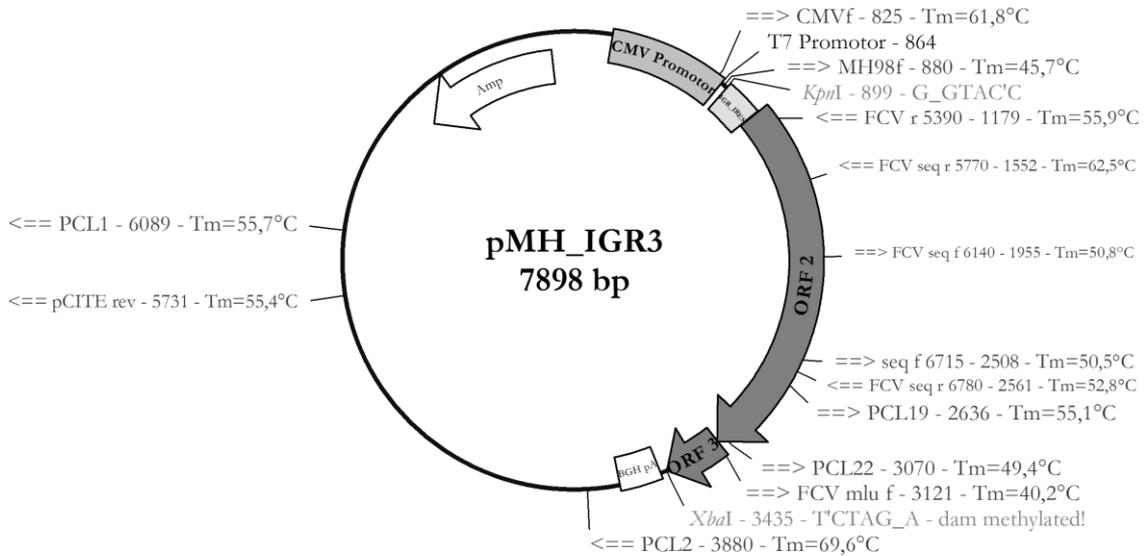


Abb. 2.4: Vektorkarte des Expressionsplasmids pMH_IGR3

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden routinemäßig in mittleren Zellkulturschalen (Ø10cm) mit BFA-34(T)- bzw. ZB5d-Medium supplementiert mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin (BFA-34(T)+FCS bzw. ZB5) bei 37°C und 7% CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden gemäß ihrem Wachstum alle drei bis vier Tage passagiert. Dazu wurden sie zweimal mit Trypsin gewaschen und sodann mit oder ohne weitere Zugabe von Trypsin für circa 3min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen durch sanftes Klopfen vom Boden der Schale lösen ließen. Durch Zugabe von frischem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden vereinzelt und im zellartspezifischen Verhältnis in 10ml Medium in neue Zellkulturschalen ausgesät.

Für alle Experimente wurden die Zellen am Vortag in kleinen Zellkulturschalen (Ø3,5cm) in 2ml Medium und geeigneten Verdünnungen ausgesät. Für die Immunfluoreszenz wurden die Schalen zuvor mit je einem Deckglas bestückt, so dass der Zellrasen auf diesen heranwachsen konnte.

3.1.2 Verschiedene Transfektionsmethoden

Um Fremdproteine in eukaryotischen Zellen transient zu exprimieren, wurden die Zellen mit gereinigter Plasmid-DNA transfiziert. Die Transfektion kann durch Lipofektion, auf chemischem oder physikalischem Weg erfolgen. Bei der Lipofektion wird die Plasmid-DNA mit Hilfe von Lipiden, die im Transfektionsreagenz enthalten sind, komplexiert und membrangängig gemacht. Durch Endozytose kann sie dann von den Zellen aufgenommen werden. In dieser Arbeit wurden die Transfektionsreagenzien FuGENE[®] HD, Lipofectamine[™] 2000 und SuperFect gemäß dem Herstellerprotokoll genutzt.

Für die chemische Transfektion wurde CaPO₄ eingesetzt (Graham und van der Eb, 1973). Das durch CaPO₄ gebildete Präzipitat ermöglicht die Transfektion, indem es die Adsorption der Plasmid-DNA an die Zellen fördert, wodurch die Aufnahme erleichtert wird. Es wurde entweder das "Mammalian Transfection Kit" entsprechend den Herstellerangaben oder ein Protokoll aus dem Haus verwendet. Bei letzterem wurden 5µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA mit 450µl 1x TE und 50µl Calciumchlorid-Transfektionslösung gemischt und tropfenweise 500µl 2x HEBS zugesetzt und für 30min bei RT inkubiert. Währenddessen entstand ein trübes Präzipitat. Die am Vortag ausgesäten und zu circa 75% konfluenten Zellen wurden zweimal mit BFA-34(T) gewaschen und frisches BFA-34(T) zugegeben. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben, diese geschwenkt und über Nacht bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert.

Die physikalische Transfektion erfolgte durch Elektroporation (EP) oder Nucleofektion. Für die Elektroporation wurden die zu verwendenden Zellen am Vortag frisch umgesetzt, so dass sie am Tag der Elektroporation in mittleren Zellkulturschalen (Ø10cm) in einem dichten Zellrasen vorlagen. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Behandlung mit BFA-35 (Trypsinlösung) von der Schale gelöst und in BFA-34(T)+FCS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1.200UpM, 8min) und mit PBS-A gewaschen. Das Zellpellet einer mittleren Zellkulturschale (Ø10cm) wurde in 1,6ml PBS-A aufgenommen und je Elektroporationsansatz 0,5ml eingesetzt. Die Zellsuspension wurde mit 5µg Plasmid-DNA gemischt, in die EP-Küvette überführt und für 1sec einem Puls von 180V und 980µF ausgesetzt. Daraufhin ruhten die Zellen für 2-3min und wurden dann mit BFA-34(T)+FCS aus der Küvette gespült und in kleine Zellkulturschalen (Ø3,5cm) überführt.

Die Nucleofection der Zellen wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dieses entspricht in weiten Teilen dem für die Elektroporation. Die Zellen wurden jeweils über Nacht bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert.

3.1.3 Nachweis exprimierter Proteine durch direkte Fluoreszenz

Für Untersuchungen zur Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden wurden die Zellen mit einem GFP-kodierenden Plasmid transfiziert. Dafür wurden die am Vortag in kleinen Zellkulturschalen (Ø3,5cm) ausgesäten Zellen zweimal mit PBS-A gewaschen und fixiert. Die Fixierung auf den Deckgläschen erfolgte entweder durch 4% PFA (20min, 4°C) oder mit einem Methanol/Aceton-Gemisch (1:1, 10min, -20°C). Die PFA fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in Mowiol[®] eingebettet und getrocknet. Die Methanol/Aceton fixierten Zellen wurden zunächst im kalten Luftstrom getrocknet. Danach ist eine Rehydrierung der Zellen durch PBS und weitere Bearbeitung möglich. Hier wurden die Zellen direkt in Mowiol[®] eingedeckelt. Nachfolgend konnten die Proben am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

3.1.4 Transiente Proteinexpression in BHK-21 Zellen mit Hilfe von Vacciniavirus MVA-T7

Das MVA-T7-Expressionssystem ermöglicht es, Proteine im Zytoplasma eukaryotischer Zellen ausgehend von transfizierter DNA zu exprimieren. Das rekombinante MVA-T7 Vacciniavirus (*Modified Virus Ankara*) exprimiert in der infizierten Zelle zytoplasmatisch die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Dadurch kann transfizierte DNA unter Kontrolle eines T7-Promotors zytoplasmatisch transkribiert werden.

Für die Analysen zur Proteinexpression wurden die am Vortag ausgesäten und zu 80% konfluenten BHK-21 Zellen mit BFA-34(T)-Medium zweimal gewaschen. Die Infektion mit dem Vacciniavirus MVA-T7 und einer MOI (*Multiplicity of Infection*) von 5 in 500µl BFA-34(T)-Medium erfolgte für 1h bei 37°C und 7% CO₂. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Transfektionsansatz in 600µl BFA-34(T)+FCS versetzt. Der Transfektionsansatz bestand aus 5µg DNA, 75µl BFA-34(T) und 10µl SuperFect und wurde zuvor gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Für eine erfolgreiche Transfektion wurden die Zellen 4h mit dem Transfektionsmedium bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert und anschließend weiter analysiert.

3.1.5 Radioaktive metabolische Markierung transient transfizierter Zellen

Nach der vierstündigen Inkubation der BHK-21 Zellen mit dem Transfektionsansatz (Abschnitt 3.1.4) wurde die der Immunpräzipitation vorausgehende radioaktive Markierung der Proteine durch [³⁵S]-L-Methionin/Cystein vorgenommen. Zur Depletion von Cystein und Methionin wurden die Zellen zunächst mit Markierungsmedium (ohne Cystein und Methionin) gewaschen und für 1h bei 37°C damit inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit Markierungsmedium wurden die Zellen für 14-16h mit 350µCi [³⁵S]-L-Methionin oder 580µCi [³⁵S]-L-Cystein in 500µl Markierungsmedium bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Alle während dieser Inkubationszeit synthetisierten Proteine wurden radioaktiv markiert.

Für die Experimente zur Untersuchung der an der Reinitiation beteiligten Translationsinitiationsfaktoren betrug die Markierungszeit nur 30min.

3.1.6 Vaccinia MVA-T7 Virusanzucht

Zur Anzucht neuer Vaccinia MVA-T7 Viren wurden 14 große Zellkulturschalen (Ø14cm) BHK-21 Zellen benötigt, welche am Vortag aus sieben großen Zellkulturschalen (Ø14cm) im Verhältnis 1:2 frisch ausgesät worden waren. Vor der Infektion wurden die Zellen zweimal mit BFA-34(T) gewaschen. Die Infektion erfolgte mit 10ml Mediumüberstand aus einer älteren Vermehrung. In einem Gesamtansatz wurden diese 10ml alter Zellüberstand mit 60ml BFA-34(T) gemischt, so dass jede große Zellkulturschale (Ø14cm) mit circa 5ml infiziert wurde. Nach einer einstündigen Inkubation wurden jeder großen Zellkulturschale (Ø14cm) 20ml BFA-

34(T)+FCS zugesetzt und die Zellen weiter bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen konnte ein zytopathischer Effekt (*cytopathogenic effect*, CPE) beobachtet werden. Sobald sich möglichst viele Zellen abgekugelt und abgelöst hatten, wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden alle noch haftenden Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Schale gelöst und mit dem Mediumüberstand in sterile 50ml Reaktionsgefäße überführt. Für die nächste Vermehrung wurden 12ml des Mediumüberstandes abgenommen und bei -70°C weggefroren. Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert (2.000UpM, 10min, 4°C) und alle Zellpellets in einem Gesamtvolumen von 1,5ml BFA-34(T) aufgenommen und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Durch dreimaliges Gefriertauen und eine Ultraschall-Behandlung wurden die Zellen lysiert und die angezüchteten Viren freigesetzt. Das Vacciniavirus-Extrakt wurde in Portionen von je 100µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.1.7 Titration von Vaccinia MVA-T7 Viren und Titerberechnung

Zur Bestimmung der kulturinfektiösen Dosis 50 (KID50) einer Virussuspension wurde eine Titration mit zehn Verdünnungsstufen von 1:10 im Doppelansatz in einer 24-well-Platte durchgeführt. Für jeden Verdünnungsschritt wurden in Reaktionsgefäße 1350µl BFA-34(T) vorgelegt. In das erste Reaktionsgefäß wurden 15µl der zu testenden Virussuspension zu 1485µl BFA-34(T) gegeben und gründlich gemischt (Verdünnungsfaktor 10⁻³). Durch fortlaufende Übertragung von 150µl aus einer Verdünnungsstufe auf die nächste wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 10 erstellt (10⁻³-10⁻¹¹). Zu den am Vortag ausgesäten BHK-21 Zellen einer 24-well-Platte wurde je Vertiefung genau 1ml der entsprechenden Virusverdünnung gegeben und der Ansatz bis zu 5d bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Der Fortschritt des CPE wurde täglich verfolgt.

Der Titer wurde nach der Formel von Spearman und Kaerber berechnet (Spearman, 1908):

$$-\left(x_0 - \frac{d}{2} + d * \sum \frac{r}{n}\right)$$

x_0	\log_{10} des reziproken Wertes der niedrigsten Verdünnung, bei der alle Vertiefungen positiv sind
d	\log_{10} des Verdünnungsfaktors
n	Zahl der Vertiefungen pro Verdünnung
r	Anzahl der positiven Vertiefungen pro Verdünnungsstufe
$\sum \frac{r}{n}$	Beginn der Summation bei der Verdünnungsstufe x_0

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation von Bakterien setzt eine Behandlung voraus, die diese für DNA zugänglich macht (Chung *et al.*, 1989). Aus einer Glycerinkultur der transformationskompetenten *E. coli* Bakterien wurde eine Vorkultur mit LB-Medium angeimpft und im Thermoschüttler bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Hauptkultur wurde am nächsten Morgen aus der Vorkultur so angeimpft, dass die optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) zum Wachstumsbeginn zwischen 0,05 und 0,1 lag. Die Inkubation erfolgte weiterhin wie beschrieben im Thermoschüttler bei 37°C. Das Bakterienwachstum wurde durch die OD_{600} regelmäßig kontrolliert, bis ein Wert von 0,6-0,7 erreicht war. Die Bakterien wurden zentrifugiert (3.000UpM, 10min, 4°C) und das Pellet in 1/4 des Ausgangsvolumens des vorgekühlten Transformationspuffers (TFB) aufgenommen und 40min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien noch einmal wie oben zentrifugiert und sodann in 1/20 des Ausgangsvolumens des eiskalten TFB resuspendiert und aliquotiert. Nach erneuter Inkubation für 1-3h auf Eis wurden die 50 und 200µl Aliquots der transformationskompetenten Zellen bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.2.2 Hitzeschock Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Durch einen Hitzeschock kann die Effizienz der Aufnahme von Fremd-DNA in kompetente Bakterien erhöht werden. Dazu wurden für jeden Transformationsansatz 50µl des kompetenten *E. coli* Bakterienstamms Top-10 auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes (20-30µl) oder 0,5-2µg Plasmid-DNA wurden die Zellen für 20min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA in die Zellen wurde der Ansatz für 2min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort für weitere 2min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit 200µl LB⁺⁺-Medium versetzt und für 45-60min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Erfolgreich transformierte Bakterien können über eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz selektioniert werden. Deshalb wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Isolierung erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Für die Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab wurden je 5ml LB^{Amp}-Medium mit einer *E. coli* Einzelkolonie einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1,5ml der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5.000UpM, 10min). Das Bakterienpellet wurde zur Zellwandlyse mit 100µl kalter MiniPräp-Lösung I durch Schütteln resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl ebenfalls kalter MiniPräp-Lösung II wurde das Gefäß gevortext und 5min auf Eis inkubiert bis ein klares Zelllysate entstand. Durch die Zugabe von 150µl kühler MiniPräp-Lösung III, Invertierung und einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat neutralisiert. Die unlöslichen Bestandteile (bestehend aus Proteinen, der DNA und Resten) wurden anschließend durch Zentrifugation (14.000UpM, 10min) abgetrennt und der Plasmid-DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 400µl Isopropanol gefällt und abschließend mit 200µl 70% (v/v) Isopropanol gewaschen. Die im Vakuum getrocknete Plasmid-DNA wurde in 30µl H₂O aufgenommen.

Größere Präparationen reinerer Plasmid-DNA wurden mit dem „NucleoBond® Xtra Midi Kit“ von Macherey-Nagel durchgeführt. Dazu wurden für Plasmide in hoher Kopienzahl (*high copy* Plasmide) 100ml LB^{Amp}-Medium mit 200µl Vorkultur angeimpft. Für Plasmide mit niedriger Kopienzahl (*low copy* Plasmide) wurden sogar 200ml LB^{Amp}-Medium beimpft. Dann wurden die Kulturen circa 16h im Thermo- oder Wasserbadschüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Präparation nach Herstellerprotokoll. Die DNA-Konzentration der Lösungen wurde photometrisch bestimmt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde auf Grundlage des Lambert Beer'schen Gesetzes photometrisch mit einem UV-Spektrometer ermittelt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde die Extinktion der Lösung (in der Regel 1:100 verdünnte Probe) bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm gegen einen Leerwert (H₂O) gemessen. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration. Aus dem Messwert konnte die Konzentration nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{OD_{260} * V * U}{1000}$$

OD₂₆₀ gemessene Adsorption bei 260nm

V Verdünnungsfaktor (zum Beispiel 100)

U Umrechnungsfaktor (Eine Extinktion bei 260nm von 1,0 entspricht bei einer Schichtdicke von 1cm nach dem Lambert Beer'schen Gesetz einer Konzentration von 50µg/ml bei doppelsträngiger DNA (U=50), 33µg/ml bei einzelsträngiger DNA (U=33), 40µg/ml bei einzelsträngiger RNA (U=40) und 20µg/ml bei Oligonukleotiden (U=20).)

Als ein Maß für die Reinheit der DNA/RNA Präparation wurde das Verhältnis der optischen Dichte bei 260nm und 280nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) bestimmt. Für reine DNA Proben beträgt der Quotient OD_{260/280} 1,8 und für reine RNA Proben 2,0.

3.3.2 Gelfiltration von Nukleinsäuren über Sephadex® G-50-Säulen

Um einzelne Nukleotide oder kurze Oligonukleotide von längeren Nukleinsäuremolekülen zu trennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden 1ml Spritzen mit zwei passend zugeschnittenen Glasfaser Mikrofiltern gestopft und abgedichtet und sodann mit Sephadex® G-50 (für Moleküle mit mehr als 50 Nukleotiden) gefüllt. Das Säulenmaterial wurde zuvor in 1x TE-Puffer äquilibriert und autoklaviert. Das Gelbett wurde durch Zentrifugation im Ausschwingrotor (2.000UpM, 2min) verdichtet. Die Probe mit einem Gesamtvolumen von 100µl wurde auf die Säule aufgetragen und ebenfalls zentrifugiert (2.000UpM, 2min). Der Säulendurchfluss wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Durch eine Wiederholung des Zentrifugationsschrittes konnte die Ausbeute teilweise erhöht werden. Abschließend wurden die Proben mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

3.3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur weiteren Aufreinigung von DNA oder RNA wurden wässrige Nukleinsäurelösungen mit Phenol/Chloroform extrahiert. Damit erreicht man eine Entfernung der Proteine aus den Lösungen, da die Proteine durch Kontakt mit Phenol denaturieren und sich aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit in zweiphasigen Emulsionen nach der Zentrifugation in der Interphase befinden. Dazu wurde die DNA/RNA mit einem Volumenanteil Phenol durch Vortexen gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (14.000UpM, 5min). Nach Überführung der nukleinsäurehaltigen, wässrigen, oberen Phase in ein neues Gefäß wurde in gleicher Weise noch einmal mit demselben Volumenanteil Chloroform extrahiert. Durch die anschließende Ethanol-fällung wurde die Nukleinsäure weiter aufgereinigt und konzentriert.

3.3.4 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Für die Reinigung und Konzentrierung von DNA/RNA wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 1/8 Volumen einer 3M Natriumacetatlösung (pH 5,3) für DNA oder einer 3M Kaliumacetatlösung (pH 5,6) für RNA und dann mit dem 2,5fachen Volumen 100% EtOH

versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubation (für RNA bei -70°C oder auf Trockeneis) wurde die Nukleinsäure durch Zentrifugation (14.000UpM, 20min) pelletiert. Vorhandene Salzreste wurden durch Waschen mit 80% EtOH entfernt. Danach wurde die Nukleinsäure im Vakuum getrocknet und in Wasser aufgenommen (RNA in RNase-freiem $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$).

3.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die Amplifikation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit definierter Länge und Sequenz durch Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Mullis und Faloona, 1987). Für die gezielte Mutagenese von Plasmidsequenzen wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene genutzt. Zunächst wurden die jeweils notwendigen Oligonukleotide mit einer definierten Sequenz synthetisiert (Metabion oder Biomers) und in Wasser gelöst, so dass eine Gebrauchslösung von 10pmol/ μl entstand. Als Ausgangs-DNA diente Plasmid-DNA. Die Amplifikation erfolgte aufgrund ihrer Genauigkeit mit der *Pfu* Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 μl .

Schritt	Reaktion	Amplifikation von DNA-Fragmenten		Gezielte MutagenesePCR	
		Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Dauer	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Dauer
Initialdenaturierung	Denaturierung	95	2min	95	30s
Synthesezyklen	Denaturierung	95	30s	95	30s
	Primeranlagerung	55	30s	55	2min
	DNA-Synthese	72	1min/ kb	68	2min/ kb
Endstrangsynthese	DNA-Synthese	72	10min	68	10min
		4	∞	4	∞

Die methylierte Ausgangs-DNA im Ansatz für die gezielte Mutagenese PCR wurde durch Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* (1h, 37°C) entfernt. Im Gegensatz zum Amplifikat ist die Ausgangs-DNA methyliert und deshalb *DpnI* sensitiv. Die *in vitro* neu synthetisierte, unmodifizierte DNA wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll in *E. coli* Bakterien transformiert (1-10 μl) und im Anschluss die Plasmid-DNA aus den Bakterienklonen extrahiert.

3.3.6 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die Amplifikation von komplementärer doppelsträngiger DNA (*complementary* DNA, cDNA) aus gereinigter RNA erfolgte in der RT-PCR mit dem Qiagen „OneStep RT-PCR Kit“ entsprechend dem Herstellerprotokoll und folgenden Zyklusparametern:

Amplifikation von cDNA aus RNA (RT-PCR)			
Schritt	Reaktion	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Dauer
Reverse Transkription		50	30min
Initialdenaturierung	Inaktivierung der RT/ Denaturierung	95	15min
Synthesezyklen (37x)	Denaturierung	94	1 min
	Primeranlagerung	45	1 min
	DNA-Synthese	72	2min
Endstrangsynthese	DNA-Synthese	72	10min
		4	∞

3.3.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten oder zirkulärer Plasmid-DNA. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente (0,1-6kb) wurde eine Agarosekonzentration von 0,8-2,0% in TAE-Puffer gewählt (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Proben wurden mit 1/5 DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 80-110V in TAE-Puffer aufgetrennt. Als Größenstandard wurde eine 1Kb DNA-Größenleiter verwendet. Die Detektion bei einer Wellenlänge von 254nm erfolgte durch das im Gel und Laufpuffer enthaltene Ethidiumbromid oder durch anschließende Inkubation im GelRed™ Färbebad. GelRed™ ist ein neuer, nicht toxischer, umweltfreundlicher Farbstoff zur Anfärbung von Nukleinsäuren, der an Stelle von Ethidiumbromid genutzt werden kann.

3.3.8 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA-Fragmente wurden die entsprechenden DNA-Banden nach der Trennung im Agarosegel auf einem UV-Lichttisch (302nm) mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels „NucleoSpin® Extract II Kit“ von Macherey-Nagel nach dem Herstellerprotokoll aus dem Gel aufgereinigt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der reversiblen Bindung der DNA an eine Silikamembran unter hohen Salzkonzentrationen und bei einem pH-Wert von über 7,5 (Vogelstein und Gillespie, 1979). Verunreinigungen wie Salze, Enzyme oder Oligonukleotide mit einer Größe von bis zu 100bp binden unter diesen Bedingungen nicht und werden durch Waschschrte mit ethanolhaltigen Lösungen entfernt. Das Kit wurde auch benutzt, um DNA nach PCR-Reaktionen, Restriktionsenzymspaltungen oder Minipräparationen zu reinigen.

3.3.9 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Für die Gewinnung von spezifischen Spaltfragmenten im Rahmen von Klonierungen und zur Analyse und Identifizierung von Plasmid-DNA wurden Restriktionsenzymspaltungen durchgeführt. Die analytische oder präparative Restriktion fand in einem Gesamtvolumen von 10-100µl statt. Die Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers mit den entsprechenden Puffern in einer Konzentration von 2-40U/Ansatz eingesetzt. Die Ansätze wurden bei der empfohlenen Temperatur unterschiedlich lang inkubiert. Die Größe der entstandenen Fragmente und die Vollständigkeit der Reaktion wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die gleichzeitige Spaltung mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen erfolgte im vom Hersteller angegebenen Puffer für den entsprechenden Doppelrestriktionsansatz oder andernfalls getrennt nacheinander.

Für die Ligation nicht kompatibler Enden nach Restriktionsenzymspaltung ist es teilweise notwendig, aus DNA mit Einzelstrang-Überhängen glatte Enden zu erzeugen. Hierzu kann das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) verwendet werden, dem die 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Mit Hilfe der im Enzym vorhandenen 3'→5'-Exonukleaseaktivität und der 5'→3'-Polymeraseaktivität können aus nicht kompatiblen Enden durch Abbau eines 3'-Überhangs bzw. Auffüllen eines 5'-Überhangs glatte Enden hergestellt werden. Eine andere Möglichkeit bietet die *Mung Bean Nuklease*, eine einzelstrangspezifische Endonuklease. Diese baut Einzelstrang-Überhänge von DNA und RNA Molekülen ab, so dass glatte Enden entstehen. Sowohl das Klenow-Fragment als auch die *Mung Bean Nuklease* wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

3.3.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei der Ligation eine Religation von linearisierten Plasmiden mit kohäsiven Enden zu verhindern, wurden die 5'-Phosphate der Plasmid-DNA durch eine Behandlung mit der *Calf intestine* alkalischen Phosphatase (CIP) oder der *Antarctic* Phosphatase abgespalten.

Zur Dephosphorylierung wurde der Ansatz mit der linearisierten DNA nach der Restriktionsenzymspaltung direkt mit 1U Phosphatase versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine Extraktion der DNA mittels „NucleoSpin® Extract II Kit“ durchgeführt.

3.3.11 Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die Synthese der shRNA Plasmide erfolgte durch das Einbringen komplementärer, synthetischer Oligonukleotide in das RNA-Polymerase-I-Transkriptionsplasmid pRF42_ASIA (Kassettenmutagenese). Dazu wurden die 5'-Enden der komplementären, einzelsträngigen DNA-Stücke phosphoryliert, anschließend hybridisiert und somit doppelsträngige DNA erzeugt. Aufgrund der kreuzkomplementären Eigenschaften der shRNA Oligonukleotide war es notwendig, in zwei getrennten Ansätzen (#1 und #2) zunächst die Oligonukleotide 1 und 3 sowie 2 und 4 und dann erst in einem weiteren Schritt die doppelsträngigen DNA-Stücke miteinander zu hybridisieren (Abb. 4.14.A). Für die Phosphorylierung wurden in beiden Ansätzen je 50pmol der komplementären, synthetischen Oligonukleotide mit 10U T4-Polynukleotidkinase, 10mM ATP und dem T4-Polynukleotidkinase-Puffer versetzt. Die Gesamtansätze von jeweils 30µl wurden für 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Hybridisierungsansätze in einem kochenden Wasserbad einer Temperatur von 96°C für 10min ausgesetzt und dann im Wasserbad langsam auf RT abgekühlt. Nach 5min wurden Ansatz #1 und #2 miteinander vereinigt und daraufhin weiter im erkaltenden Wasserbad inkubiert bis sie auf RT abgekühlt waren. Zur Ligation wurden 3µl des Hybridisierungsprodukts und 0,5µl des *BbsI* restringierten Vektors pRF42_ASIA eingesetzt.

3.3.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation verschiedener DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase entsprechend den Herstellerangaben vorgenommen. Das Verhältnis von Vektor und Insert wurde anhand der Bandenintensität nach Auftrennung im Agarosegel bestimmt. Im Ansatz befand sich ein genereller Überschuss des Inserts zum Vektor je nach Größe des Inserts (2-5:1). Der Ligationsansatz von 20-30µl wurde unterschiedlich inkubiert: über Nacht im 14°C Wasserbad, für 1h bei 37°C im Brutschrank oder bei 4°C für drei Tage. Nach der Ligation wurde das Produkt zur Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen verwendet.

3.3.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von DNA-Proben erfolgte durch Sequenzierung nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) und mit dem „BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit“ von Applied Biosystems. Die Sequenzierreaktionen wurden gemäß der Herstelleranleitung angesetzt und die zu sequenzierende DNA im Thermocycler mit folgenden Zyklusparametern amplifiziert:

Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Sequenzierung			
Schritt	Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer
Initialdenaturierung	Denaturierung	96	2 min
Synthesezyklen (25x)	Denaturierung	96	10 s
	Primeranlagerung	50	5 s
	DNA-Synthese	60	4 min
		4	∞

Im Anschluss daran wurden die Proben mit Ethanol gefällt und im „AB Hitachi 3130 Genetic Analyzer“ sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm pDRAW32 und der Software des NCBI.

3.3.14 Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurden verschiedene Methoden eingesetzt: Zum einen wurde die RNA mittels peqGold TriFast™ entsprechend dem Herstellerprotokoll extrahiert. Die Aufarbeitung verlief ausgehend von einer kleinen Zellkulturschale (Ø3,5cm). Nach Abnahme des Mediumüberstandes wurden die Zellen durch Zugabe von 1ml peqGold TriFast™ lysiert und in vorbereitete Reaktionsgefäße aufgenommen. Durch Zusatz von 200µl Chloroform und fünfminütiger Inkubation bei RT wurde nach Zentrifugation (14.000UpM, 5min) eine Phasentrennung erreicht. Die RNA-haltige, farblose und wässrige, obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Isopropanol 10min auf Eis präzipitiert. Das nach Zentrifugation (14.000UpM, 10min, 4°C) erhaltene Präzipitat wurde zweimal mit 75% EtOH gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Alternativ wurde das „NucleoSpin® RNA II Kit“ von Macherey-Nagel gemäß dem Herstellerprotokoll genutzt.

Die Isolation von hochreiner RNA erfolgte schließlich mit Hilfe einer Zentrifugation im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten. Dafür wurden die Zellen einer kleinen Zellkulturschale (Ø3,5cm) mit dem RNA-Lysis-Mix lysiert und dann in Zentrifugenröhrchen auf ein 5,7M CsCl-Kissen geschichtet. Die hochreine Gesamt-RNA wurde durch Zentrifugation (32.000UpM, 21h) gewonnen. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Überstände weitgehend abgezogen und die Röhrchen zügig dekantiert. Die Böden der umgedrehten Zentrifugenröhrchen wurden mit einem heißen Skalpell abgetrennt. Das in 320µl RNase-freiem H₂O_{DEPC} gelöste RNA-Pellet wurde mit Ethanol präzipitiert.

In allen Fällen wurde die isolierte RNA in circa 20µl RNase-freiem H₂O_{DEPC} aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.3.15 *in vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurden 5µg Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym am 3'-Ende der zu transkribierenden Sequenz linearisiert und durch Elution aus einem Agarosegel gereinigt. Die DNA wurde in 40µl RNase-freiem H₂O_{DEPC} gelöst und in einem Gesamtansatz von 100µl als Matrize für die *in vitro*-Transkription verwendet. Dazu wurde das „RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7“ von Promega genutzt und nach Herstellerangaben Puffer, NTPs sowie der Enzym-Mix mit der T7-RNA-Polymerase zugegeben. Um 5'-Cap-haltige mRNAs zu erzeugen, wurde zu Beginn der Reaktion GTP im Unterschuss und das m⁷G-Cap-Strukturanalogon im Überschuss zugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Menge an GTP erhöht. Die Gesamtinkubation betrug 4h bei 37°C. Danach wurde der Ansatz mit der im Kit enthaltenen DNase für 15min ebenfalls bei 37°C behandelt, um die Matrizen-DNA zu entfernen. Darauf wurde die transkribierte RNA über eine Sephadex® G-50-Säule aufgereinigt. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-fällung wurde die mRNA-Probe in circa 25µl RNase-freiem H₂O_{DEPC} aufgenommen. Zur Kontrolle wurden 3µl der Probe in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die RNA wurde für *in vitro*-Translationsexperimente eingesetzt.

3.3.16 Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Als einzelsträngiges Molekül ist RNA in der Lage, durch intramolekulare Basenpaarungen eine Sekundärstruktur auszubilden, die die Auftrennung nach der Molekülgröße verfälscht. Zur Vermeidung intramolekularer Rückfaltungen und damit verbundenem geänderten Laufverhalten im Agarosegel wurde die RNA vor dem Auftragen mit Glyoxal behandelt (Carmichael und McMaster, 1980) und ein formaldehydhaltiges Agarosegel verwendet. In einem Gesamtansatz von 12,3µl wurde die RNA mit 1x Phosphatpuffer und 1,3M Glyoxal für 45min bei 56°C denaturiert und anschließend mit 3µl RNA-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte im 0,9%igen Agarosegel mit 13% Formaldehyd in 1x Phosphatpuffer bei 140V. Die Glyoxylierung zusammen mit der hohen Formaldehydkonzentration im Gel gewährleistet die

vollständige Denaturierung der RNA bei der Elektrophorese. Während des Laufs wurde der verwendete Phosphatpuffer kontinuierlich in der Kammer umgewälzt. Nach dem Ende des Gellaufes wurde das Gel in einer Acridinorangelösung 5-10min gefärbt und dann dreimal über 15min in 1x Phosphatpuffer entfärbt. Am Ende konnte die RNA bei 254nm detektiert werden.

3.3.17 Northern Blot

RNA kann nach elektrophoretischer Auftrennung vom Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert und kovalent an diese gebunden werden (Northern Blot; Thomas, 1980). An die Membran gebundene RNA können markierte, komplementäre DNA-Sonden durch spezifische Basenpaarung hybridisieren. Hierdurch ist die Detektion von speziellen RNA-Abschnitten einer Gesamt-RNA möglich.

Dazu wurde die RNA im Anschluss an die Färbung des RNA-Gels transferiert. Es wurde eine Gelgiesskammer mit der offenen Seite nach unten in eine große Wanne gestellt und etwa 1cm hoch mit 20x SSC-Transferpuffer gefüllt. Auf die Gelkammer wurden zwei Lagen mit 20x SSC-Transferpuffer befeuchtetes Filterpapier gelegt, dessen Länge so bemessen war, dass die Enden des Filterpapiers in die Transferlösung tauchten. Das Formaldehyd-Agarosegel wurde mit den Taschen nach oben auf das Filterpapier platziert. Als nächste Schicht folgte der in der Größe dem Gel entsprechende Nylonfilter, welcher zuvor in 3x SSC-Transferpuffer geschwenkt worden war. Darauf wurden zwei gleich große Filterpapiere, die ebenfalls mit 20x SSC angefeuchtet waren, deponiert. Abschließend wurde ein Stoß trockenes, saugfähiges Papier aufgelegt und mit Gewicht beschwert. Über die Kapillarkräfte des Papiers wurde der Transferpuffer durch das Gel gesaugt und die RNA über Nacht auf die Nylonmembran übertragen. Nach dem Transfer wurde der RNA-Marker auf der Membran mit Hilfe einer UV-Lampe (254nm) sichtbar gemacht und markiert. Zur Zerstörung des Glyoxals, das die Hybridisierung beeinträchtigt, sowie zur Fixierung der RNA auf der Membran wurde diese für 4h bei 80°C im Vakuum gebacken und konnte anschließend trocken aufbewahrt werden.

3.3.18 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Bei der radioaktiven Markierung durch „Nick Translation“ werden durch das Enzym DNase I zufallsmäßig offene Phosphodiesterbindungen (Brüche, *nicks*) in einem doppelsträngigen DNA-Molekül erzeugt. Mit Hilfe der 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I werden weitere Nukleotide entfernt und gleichzeitig aufgrund der Polymeraseaktivität durch neue Nukleotide ersetzt. Da die eingesetzten dCTP-Nukleotide [α -³²P]-markiert sind, wird die neu synthetisierte DNA radioaktiv markiert (Rigby *et al.*, 1977). Die Markierungsreaktion wurde mit dem „Nick Translation Kit“ von Amersham GE Healthcare durchgeführt.

Die zu markierenden cDNA-Fragmente wurden zuvor mittels RT-PCR von Gesamt-RNA gewonnen und durch Elution aus einem Agarosegel aufgearbeitet. Im Markierungsansatz von je 20µl wurden maximal 50ng des Fragments mit 4µl dNTP-Mix, 20µCi [α -³²P]-dCTP und 2µl Enzymlösung für 90min im 15°C Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 80µl TES-Puffer wurde die Reaktion im Folgenden gestoppt und die freien Nukleotide über eine Sephadex[®] G-50-Säule abgetrennt. Die Messung der radioaktiven Markierung erfolgte im β -Counter (Mini Assay Typ 6-20). Vor der Zugabe zum ZETA-Hybridisierungsmix wurde die Sonde für 3min auf 95°C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge zu trennen.

3.3.19 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden-DNA an membrangebundene RNA

Die Hybridisierungen wurden in einem Glasrohr im temperierten Rollerschrank (Hybridisierofen, 6UpM) bei 68°C durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 65°C vorgewärmt. Die Nylonmembran mit der fest gebundenen RNA wurde in 3x SSC-Transferpuffer angefeuchtet. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen und Auswaschen von Acridinorange-Rückständen wurde diese dann zweimal mit circa 20ml ZETA-Hybridisierungsmix bei 68°C vorinkubiert (1x 1h, 1x 15min). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in 10ml ZETA-

Hybridisierungsmix, dem die hitzedenaturierte, radioaktive Sonde zugesetzt wurde. Am folgenden Tag wurde der Filter 30min mit ZETA-Waschlösung (5%) und zweimal 30min mit ZETA-Waschlösung (1%) gewaschen und anschließend auf einem Filterpapier luftgetrocknet. Zur autoradiographischen Detektion wurde ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie, je nach Strahlungsintensität der Membran, für ein bis sieben Tage bei -70°C exponiert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Aufarbeitung der Gesamtproteine aus transfizierten Zellen

Die Gesamtproteine wurden aus transient exprimierenden Zellen gewonnen. Dazu wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, bevor sie zum Lysieren bei -70°C schockgefroren wurden. Danach wurden die Zellen in $500\mu\text{l}$ RIP-Lösung I von der Schale gelöst und lysiert. Die Proben wurden mit $50\mu\text{l}$ 10%iger SDS-Lösung versetzt, 10min bei 95°C erhitzt und auf Eis gekühlt. Nach einer Ultraschallbehandlung von zweimal 20s bei 4°C wurden die Proben zentrifugiert (5.000UpM , 5min) und grobe Zellreste pelletiert. Der Überstand wurde ultrazentrifugiert (45.000UpM , 1h, 4°C), um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Für den Einsatz der denaturierten Proben in der Immunpräzipitation wurden diese mit dem vierfachen Volumen an RIP-Lösung I verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.4.2 Immunpräzipitation

Für den quantitativen Nachweis von (metabolisch radioaktiv markierten) Proteinen wurden diese durch Fällung mit spezifischen Antikörpern angereichert. Von den isolierten Gesamtproteinen wurden abhängig von dem zu fällenden Protein jeweils $200\text{-}1.000\mu\text{l}$ ($1/5$ Vol FCV VP1, 1 Vol FCV VP2) mit dem entsprechenden Antikörper (Verdünnung siehe Abschnitt 2.1) versetzt und 1h bei 37°C sowie eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe einer fixierten *Staphylococcus aureus*-Suspension (Kessler, 1981) wurden die Antikörper mit den gebundenen Proteinen an das Protein A von *Staphylococcus aureus* gebunden. Nach Zugabe der Bakteriensuspension wurden die Proben 30min bei RT gehalten, dabei mehrfach gevortext und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Folgenden wurden die Ansätze nach erneutem Vortexen mit $200\text{-}500\mu\text{l}$ RIP-Sucrose-Lösung unterschichtet und die Aggregate aus Zielprotein, Antikörper und Protein A pelletiert (5.000UpM , 10min). Der Überstand wurde einer weiteren Präzipitation unterzogen oder entsorgt und das pelletierte Material mit $700\mu\text{l}$ RIP-Lösung II gewaschen. Nach einem erneuten Waschschrift der Proben mit $700\mu\text{l}$ RIP-Lösung III wurden diese in $5\text{-}10\mu\text{l}$ RIP-Lösung IV aufgenommen und resuspendiert. Mit $20\text{-}40\mu\text{l}$ zugesetztem SDS-Probenpuffer wurden die Proben für 5min bei 95°C denaturiert. Die Aggregate aus Protein A und Antikörper wurden durch Zentrifugation (14.000UpM , 10min) abgetrennt und die im Überstand gelösten Proteine in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Immunpräzipitation der *in vitro* translatierten Proteine erfolgte direkt nach der Inkubation bei 30°C bzw. nach der RNase A-Behandlung. Dafür wurden die Proben mit $500\mu\text{l}$ RIP-Lösung I versetzt und diese wie oben beschrieben mit Antikörpern und der *Staphylococcus aureus*-Suspension behandelt. Anschließend wurden die Präzipitate gewonnen, gereinigt, denaturiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

3.4.3 *in vitro*-Translation

Die *in vitro*-Translation wurde mit der durch *in vitro*-Transkription gewonnenen mRNA im Kaninchen-Retikulozytenlysate („Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated“ oder „Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System“ von Promega) gemäß Herstellerprotokoll

durchgeführt. Der Reaktionsansatz betrug 12,5-25 μ l und die translatierten Proteine wurden mit [³⁵S]-L-Methionin markiert. Nach einer Inkubationszeit von 1-1,5h bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10mM EDTA und RNase A (100 μ g/ml) sowie einer 20minütigen Inkubation bei RT abgestoppt und die Proben anschließend wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben immunpräzipitiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE.

3.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE diente zur Prüfung der transienten Proteinexpression in Zellen. Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Schagger und von Jagow (1987) zuerst im Sammelgel konzentriert und danach im Trenngel entsprechend ihrer apparenten molekularen Masse aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden 6-16%ige SDS-Gele verwendet. Vor dem Gießen der Gele wurden die Glasplatten (Abmessung: 16cm x 14cm x 0,15cm) mit Aceton gereinigt. Trenn- und Sammelgel wurden jeweils vor dem Gießen frisch angesetzt (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.8). Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von APS-Lösung und TEMED gestartet. Zuerst wurde das Trenngel in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen, bis circa 3/4 der Endhöhe erreicht waren, und sodann vorsichtig mit H₂O überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Vor dem Gießen des Sammelgels wurde das auspolymerisierte Trenngel zweimal mit H₂O gewaschen. Dann wurde das Sammelgel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels, wurden SDS-Reste durch viermaliges Waschen mit H₂O aus den Taschen gespült. Durch zwei weitere Waschschrte mit Jagow-Kathodenpuffer wurde das Gel für den Probenauftrag vorbereitet. Danach wurde es in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Proben vor dem Auftragen für 5min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 45-100V über Nacht. Für Gele mit radioaktiv markierten Proben diente der [¹⁴C] High-Range Rainbow Molekularmarker als Molekulargewichtsstandard. Die Gele wurden nach dem Lauf mit Coomassie-Lösung (Coomassie-Stocklösung/Fixierlösung: 15ml/1l) für 30min gefärbt und fixiert und danach 4h mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Anschließend wurden die Gele für 2,5h unter Vakuum getrocknet, was mit 65°C Hitze für 2h unterstützt wurde. Zur autoradiographischen Detektion wurde entweder ein Röntgenfilm für drei bis sieben Tage oder eine *imaging-plate* (des PhosphorImager) über Nacht auf den getrockneten Gelen exponiert. Für nicht radioaktive Gele wurde der PageRuler™ Prestained Protein Standard als Molekulargewichtsstandard verwendet. Diese wurden vor dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Membranen für circa 30min in Transferpuffer äquilibriert.

3.4.5 Western Blot

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE erfolgte der Elektrotransfer dieser Moleküle auf eine Nitrozellulose-Membran (Western Blot). Dabei wurden die Proteine in Transferpuffer und einer mit 4°C kaltem Wasser gekühlten Transferapparatur bei 50-80V für circa 3h aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Danach wurde die Membran für die Immundetektion vorbereitet.

3.4.6 Immundetektion der Proteine nach dem Western Blot

Die Proteine auf der Nitrozellulose-Membran wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für den Nachweis sehr kleiner Proteine wurden die Membranen in einigen Fällen zunächst nach Angabe des Herstellers mit den Lösungen des „Qentix™ Western Blot Signal Enhancer Kits“ von Pierce Thermo Scientific inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für 1h mit Blockpuffer (5% Magermilchpulver in PBS-Tween) bei RT inkubiert und anschließend dreimal 10min mit PBS-T gewaschen. Der Erstantikörper für das nachzuweisende Protein (Verdünnung siehe Abschnitt 2.1) wurde in PBS-T oder Blockpuffer auf die Membran gegeben und mit dieser über Nacht bei 4°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt und die

Membran für mindestens 2h mit dem Zweitantikörper (Verdünnung siehe Abschnitt 2.1) in PBS-T bei 4°C geschwenkt. Danach wurde die Membran erneut dreimal 10min mit PBS-T gewaschen. Da alle sekundären Antikörper direkt mit der Meerettich-Peroxidase gekoppelt waren, konnten die Antikörper gebundenen Proteinbanden durch eine Lumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Dabei katalysiert die Meerettich-Peroxidase in alkalischer Lösung mit Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol, was zu einer Emission von Licht führt. Für diese Reaktion wurde das „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit“ von Pierce Thermo Scientific genutzt. Beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt (gelegentlich verdünnt mit PBS) und die Nitrozellulose-Membran im Dunkeln kurz darin inkubiert. Die Lichtemission wurde mit CL-XPosure™ Filmen detektiert.

3.4.7 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS)

Zur Analyse der Transfektionsrate verschiedener Transfektionsmethoden wurden Zellen mit einem Plasmid (pEGFP-N3) transfiziert, das für ein nach Rot verschobenes grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*, GFP) EGFP kodiert. Die EGFP exprimierenden und fluoreszierenden Zellen wurden mit einem Durchflusszytometer, das mit einem Argon- und Helium-Neon-Laser ausgerüstet war, analysiert. Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen wurden mit Hilfe spezifischer Detektoren gemessen. Die Streulichtparameter enthalten das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) definiert Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) stellt ein relatives Maß für die Granulation der Zellen dar. Das Fluoreszenzsignal von GFP wird bei einer Wellenlänge von 509nm detektiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle wurde gespeichert und die Daten anschließend mit Hilfe des Programms BD CellQuest Pro™ ausgewertet.

Für die durchflusszytometrische Messung wurden die in kleinen Zellkulturschalen (Ø3,5cm) transfizierten Zellen nach 24 oder 48h zweimal mit Trypsin gewaschen und dann mit 0,5ml Trypsin vom Boden der Schale gelöst. Die Zellen wurden in 1ml FACS-Puffer II aufgenommen, zentrifugiert (1.200UpM, 5min) und einmal mit 1ml eiskaltem FACS-Puffer I gewaschen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit 150-500µl FACS-Puffer I in FACS-Reaktionsgefäßen resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten weiterführende Untersuchungen zum Terminations/Reinitiations-Mechanismus (Meyers 2003 und 2007) vorgenommen werden. Dieser führt zur Translation des minoren Kapsidproteins VP2 beim *Felinen Calicivirus* (FCV) und *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus* (RHDV).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Sequenzen stromab der Start/Stopppregion hinsichtlich ihrer Rolle bei der Reinitiation in transienten Expressionsstudien analysiert. Die Bedeutung verschiedener Translationsinitiationsfaktoren für die FCV Reinitiation wurde im zweiten Teil mittels RNA-Interferenz geprüft.

4.1 Bedeutung von im 5'-Bereich des VP2 kodierten Sequenzen für die Translationsreinitiation des FCV

Daten aus vorausgegangenen Mutationsanalysen hatten gezeigt, dass die 5'-Region der VP2 kodierenden Sequenz des FCV und RHDV modulierend auf die Translationsreinitiationsrate wirkt. Dies sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage, ob neben den bereits beschriebenen Motiven der FCV *termination upstream ribosomal binding site* (TURBS) (Luttermann und Meyers, 2007), welche in der VP1 kodierenden Sequenz liegt, zumindest ein weiteres Motiv innerhalb der VP2 kodierenden Sequenz vorhanden ist, das einen Einfluss auf den Termination/Reinitiations-Mechanismus hat (Abb. 4.1). Dazu wurden Mutationsanalysen durchgeführt, wobei die Sequenzveränderungen sowohl primäre Sequenzmotive als auch putative Sekundärstrukturelemente betrafen.

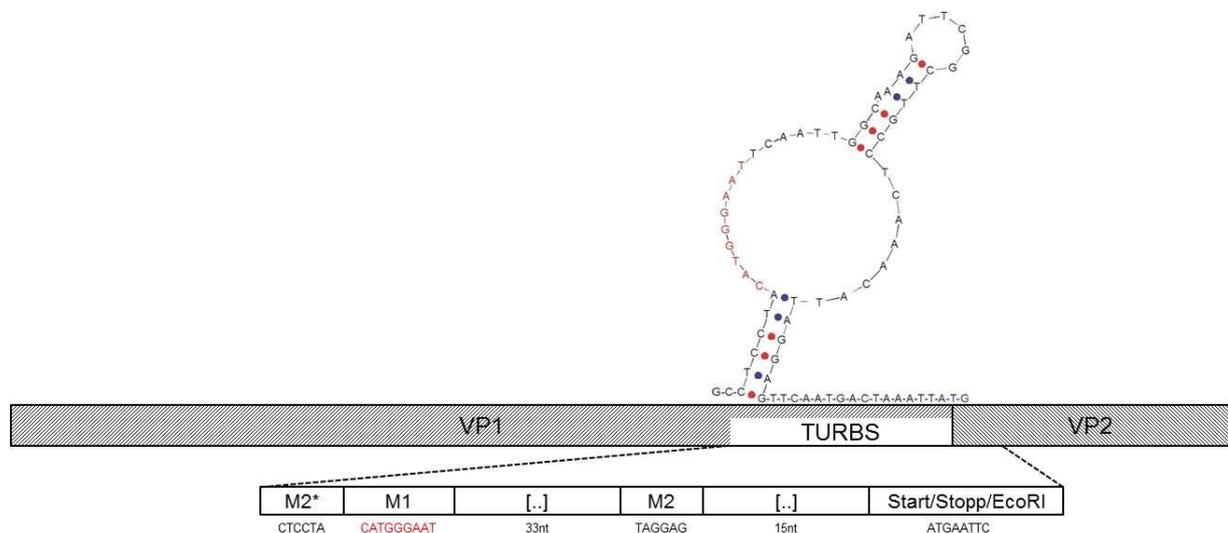


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der FCV TURBS

Die Abbildung veranschaulicht die Lage der verschiedenen Sequenzmotive, welche für den Termination/Reinitiations-Mechanismus eine Rolle spielen. Gezeigt ist die Position der circa 70nt langen FCV TURBS am 3'-Ende des ORF2 mit den essentiellen Motiven M2*, M1 und M2 sowie der Start/Stopppregion. Oberhalb des (die Protein kodierende Sequenz symbolisierenden) grauen Balkens ist die mögliche Sekundärstruktur der TURBS dargestellt. Motiv 2* ist komplementär zum Motiv 2 und kann daher mit diesem paaren. Dadurch wird das Motiv 1 (rot) präsentiert und kann die 18S rRNA binden. GC-Paarungen sind mit einem roten, AT-Paarungen mit einem blauen Punkt markiert. ORF2 und 3 überlappen um vier Nukleotide (Start/Stopppregion) mit anschließender EcoRI-Restriktionsschnittstelle.


```

FCV2024      UACUCAUACACAAAUCAAAAUUUUUAUGACGAUCAAUUGAAUGCAAUUAGACUAUCAUUAU 300
F9           UACUCAUACACAAAACCAAACUUUUUAUGACGAUCAAUUAAAUGCAAUUAGACUAUCAUUAU 300
Urbana       UACUCAUACACAAAUCAAAAUUUUUAUGAUGAUCAAUUGAAUGCAAUUCGGCUAUCUUAU 300
FCV/DD/2006/GE UACUCAUACACAAAUCAGAAUUUUUAUGACGAUCAAUUGAAUGCAAUUCGGCUUUCUUAU 300
Japanese_F4  UACUCAUACACAAAUCAGAAUUUUUAUGACGAUCAAUUGAAUGCAAUUAGGCUAUCAUUAU 300
CFI/68_FIV   UACUCAUACACAAAUCAAAACUUUUUAUGACGAUCAAUUAAAUGCAAUCAGACUAUCAUUAU 300
***** **.* ***** ***** .***** .* ** ** **

FCV2024      AGAAAUCUGUUUAAAAAUUGA 321
F9           AAAAAUUUGUUUAAAAAUUGA 321
Urbana       AGGAAUUUGUUUAAGAAUUGA 321
FCV/DD/2006/GE AGGAAUUUGUUUAAGAAUUGA 321
Japanese_F4  AGGAAUUUGUUUAAAAAUUGA 321
CFI/68_FIV   AGAAAUUUGUUCAAGAAUUGA 321
*..*** **** **.* ****

```

Abb. 4.2: Multipler Sequenzvergleich

der VP2 kodierenden RNA-Sequenzen aller NCBI gelisteten FCV Stämme mittels Clustal W (Version Omega). Für die dieser Arbeit zugrunde liegende Sequenz (Stamm FCV2024) sind die Start/Stopregion sowie die Stoppkodone #2, #3 und #4 fett markiert. Das Symbol (*) kennzeichnet vollständig konservierte Nukleotide. Außerdem sind Bereiche mit überwiegend gleichen Sequenzen durch (.) angegeben.

4.1.2 Mutationsanalysen

4.1.2.1 Deletionen

Als erstes wurden einfache Deletionen mit einer Länge von drei Nukleotiden im VP1 Leseraster stromab des Stoppkodons erzeugt (Abb. 4.3). Als Ausgangsplasmid (Wildtyp, WT) diente das Konstrukt pCH1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Luttermann), das auf dem pCITE2a-Vektor basierte. Es besitzt einen T7-Promotor und die IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) und kodierte für die subgenomische FCV mRNA ab dem Startkodon des VP1.

Die Deletionsmutanten wurden in *baby hamster kidney* (BHK-) Zellen transfiziert, welche zuvor mit dem Vacciniavirus MVA-T7 infiziert worden waren, um die T7-RNA-Polymerase bereitzustellen. Da alle in diesem Teil der Arbeit verwendeten Konstrukte einen T7-Promotor besaßen, ermöglichte die Infektion mit dem Vacciniavirus MVA-T7 die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase, wodurch die VP1 Gesamtexpression erhöht und in Folge auch die Menge des durch Reinitiation gebildeten Proteins gesteigert wurde.

Die mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin markierten Proteine wurden nach der Aufarbeitung der Gesamtproteine mit VP1- und VP2-spezifischen Antiseren immunpräzipitiert und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Nach autoradiografischer Detektion wurde die VP2 Menge quantifiziert. Die Normierung erfolgte auf die VP1 Proteinmenge, da der VP2 immer die VP1 Translation vorausgeht (Luttermann und Meyers, 2007). Alle Konstrukte wurden mindestens dreimal exprimiert und abschließend der Mittelwert und die Standardabweichung der VP2 Menge ermittelt.

Bei der Expression von VP1 und VP2 war zu beobachten, dass das FCV VP2 Protein in einem stöchiometrischen Verhältnis von circa 1:20 zum VP1 exprimiert wurde, d.h. eine Reinitiation fand nur in 5% der möglichen Fälle statt. Die durch die anfängliche Infektion mit dem Vacciniavirus MVA-T7 gesteigerte Translationseffizienz erleichterte somit die Detektion des VP2.

Die in Abbildung 4.3.B dargestellte VP2 Expressionsrate schwankte bei den Mutanten pMH47, 48, 49, 51 und 54 bis 57 nur leicht im Vergleich zum Wildtypkonstrukt pCH1. Bei den Mutanten pMH46 und 52 sank die VP2 Expression auf 60% bzw. 53%. Diese beiden Deletionen betrafen

das Kodon nach der Start/Stopstelle bzw. nach dem Stoppkodon #3 im ORF2. Die Mutanten pMH50 und 53 zeigten eine erhöhte VP2 Expression mit 218% bzw. 176% bezogen auf den Wildtyp. Bei diesen Konstrukten war das Kodon zwischen Stoppkodon #2 und #3 bzw. das zweite Kodon nach dem Stoppkodon #3 im ORF2 deletiert.

Da sich die VP2 Expression ab der Mutante pMH54 kaum noch veränderte, wurde im Folgenden der zu untersuchende 5'-Bereich auf die ersten 31 Nukleotide der VP2 kodierenden Sequenz verkleinert (Vgl. Abb. 4.3.A und 4.4.A).

A

WT/pCH1	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTGTTACAAATACAATTGG	100%
pMH46	ATGA---CAATTCTAGGCTTAATTGATACTGTTACAAATACAATTGG	60%
pMH47	ATGAATT---TTCTAGGCTTAATTGATACTGTTACAAATACAATTGG	101%
pMH48	ATGAATTCAA---TAGGCTTAATTGATACTGTTACAAATACAATTGG	88%
pMH49	ATGAATTCAATTC---GCTTAATTGATACTGTTACAAATACAATTGG	76%
pMH50	ATGAATTCAATTCTAG---TAATTGATACTGTTACAAATACAATTGG	218%
pMH51	ATGAATTCAATTCTAGGCT---TTGATACTGTTACAAATACAATTGG	78%
pMH52	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAA---ATACTGTTACAAATACAATTGG	53%
pMH53	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTG---CTGTTACAAATACAATTGG	176%
pMH54	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATA---TTACAAATACAATTGG	90%
pMH55	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTG---CAAATACAATTGG	114%
pMH56	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTGTTA---ATACAATTGG	88%
pMH57	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTGTTACAA---CAATTGG	82%

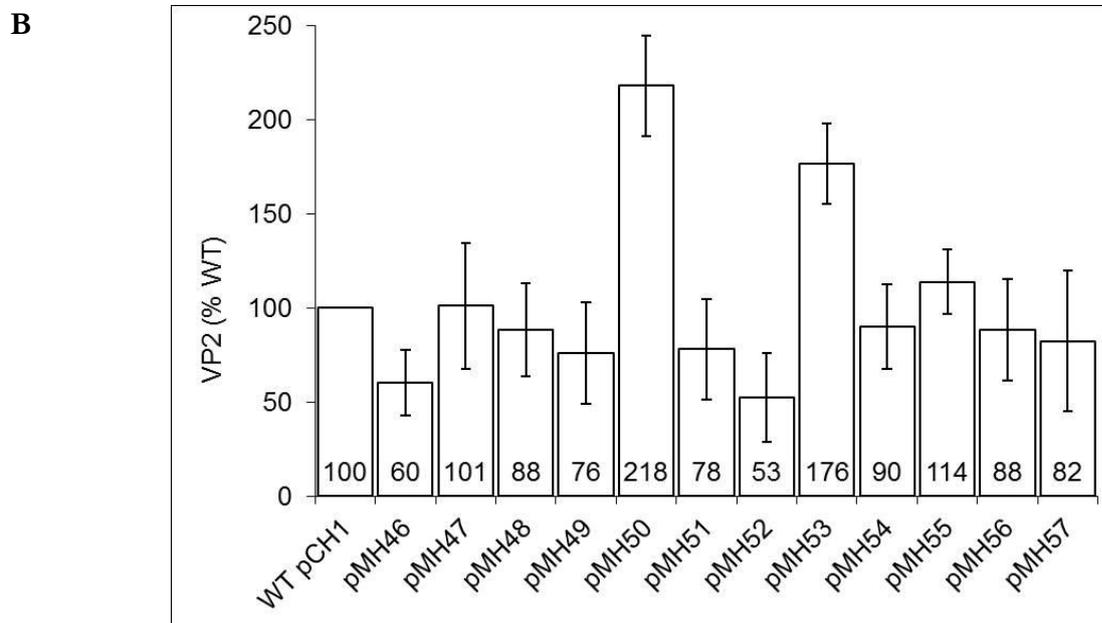


Abb. 4.3: Drei-Nukleotid-Deletionen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region

(A) Übersicht über die Position der drei-Nukleotid-Deletionen in der Plasmidsequenz, wobei sich die Deletionen im verlängerten ORF2 befinden. In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die Start/Stopregion sowie die Stoppkodone #2, #3 und #4 fett markiert. (B) Grafische Gegenüberstellung der VP2 Translationsreinitiationrate normiert auf die VP1 Translation, bezogen auf den Wildtyp (pCH1). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Werte auch in (A) angegeben.

4.1.2.2 Substitutionen

Die Deletionsanalysen zeigten, dass bereits das erste Kodon stromab der Start/Stoppstelle einen starken Einfluss auf das VP2 Expressionslevel besaß. Daher wurde dieser Bereich zunächst mit Punktmutationen weiter charakterisiert. Dazu wurden verschiedene Substitutionsmutanten (Abb. 4.4.A) analog zu den Deletionsmutanten (Abschnitt 4.1.2.1) hergestellt und exprimiert.

Durch die Einzelsubstitutionen, welche das dritte Nukleotid des ersten Stoppkodons des VP1 bzw. das vierte Nukleotid im ORF3 veränderten (pMH142-144), verringerte sich die VP2 Expression nur geringfügig um etwa 25%. Die Einzelsubstitutionen des ersten Nukleotids nach der Start/Stoppstelle bzw. des fünften Nukleotids im ORF3 (pMH69, 1 und 2) hatten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Translationsreinitiationsrate: Der Austausch des Adenosins zu Thymin erhöhte die VP2 Rate auf 136%, während sie durch das Cytidin auf 73% und beim Austausch zu Guanin sogar auf 51% sank. Die drei weiteren Einzelsubstitutionsmutanten pMH3, 26 und 4 veränderten das VP2 Level nur wenig wie auch die Doppelsubstitutionsmutante pMH6. Der Austausch von Nukleotid vier und fünf im ORF3 (beides Adenosin) zu Thymin (pMH31) führte zu einer Verringerung der VP2 Expression auf 73%. Dagegen sank das VP2 Level bei Substitution zu zweimal Guanin auf 36% (pMH145), bei Substitution zu Thymin und Cytidin auf 18% (pMH30) und sogar auf nur 2%, wenn die zwei Adenosine durch zweimal Cytidin ersetzt wurden (pMH70).

Während die VP2 Expression im Vergleich zu pMH143 (71%) und pMH2 (73%) bei pMH70 auf 2% absank, konnte dieser hemmende Effekt durch weitere Cytidinsubstitutionen nicht weiter verstärkt werden. Im Gegenteil, durch die zusätzliche Veränderung des sechsten bis achten Nukleotids im ORF3 zu zweimal Cytidin und anschließendem Guanin wurde das VP2 Level wieder auf 27% erhöht.

Der Vergleich der VP2 Translationsrate der Konstrukte pMH7 (27%) und pMH58 (90%) ließ den Schluss zu, dass die Substitution des vierten Nukleotids im ORF3 zu Cytidin für das Absinken des VP2 Levels verantwortlich war. Dies wurde aber widerlegt durch die Einzelmutante pMH143, bei der wie bereits beschrieben eine VP2 Translation von 71% des Wildtypniveaus zu verzeichnen war.

Insbesondere die Substitutionen durch Cytidin zeigten hier, dass verschiedene Effekte einen Einfluss auf die VP2 Translationsreinitiationsrate haben (Abb. 4.4.B).

Einige der Mutationen innerhalb der Start/Stoppstelle (pMH142-145, 30/31, 70, 7) betrafen die ideale Startsequenz nach Kozak $\left(\frac{A}{G}XXAUGG\right)$. Diese Konsensussequenz beschreibt die am häufigsten auftretenden Nukleotide im Bereich des Startkodons einer mRNA (Kozak, 1987). Abweichungen der Startsequenz von der optimalen Kozak-Folge können eine schlechtere Translationsrate zur Folge haben. Bereits im Wildtypkonstrukt pCH1 liegt diese ideale Startsequenz nur teilweise vor: An Nukleotidposition -3 befindet sich ein Adenosin an Position +4 dagegen fehlt das hier optimale Guanin und es findet sich stattdessen ein Adenosin. Das Konstrukt pMH144 zeigte, dass die Generierung des optimalen Translationsstarts die VP2 Menge herabsetzte (75%) anstatt erhöhte.

Die eben beschriebenen Mutationen (pMH142-145, 30/31, 70, 7), welche die Kozak Sequenz veränderten, bewirkten auch den Verlust des Stoppkodons der Start/Stoppstelle. Dadurch führten diese Mutationen zur Reduktion der VP2 Translation, wie schon bei Luttermann und Meyers (2007) beschrieben. Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss der im VP2 kodierenden Bereich liegenden Stoppkodone systematisch analysiert.

A

WT/pCH1	ATGA ATTCAATTCTAGGCT TAATTG ACTG	100%
pMH142	ATG <u>T</u> ATTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	75%
pMH143	ATG <u>C</u> ATTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	71%
pMH144	ATG <u>G</u> ATTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	75%
pMH69	ATG <u>A</u> TTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	136%
pMH2	ATGACTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	73%
pMH1	ATGAGTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	51%
pMH30	ATG <u>T</u> CTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	18%
pMH31	ATG <u>T</u> TTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	73%
pMH70	ATG <u>C</u> CTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	2%
pMH145	ATG <u>G</u> GTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	36%
pMH3	ATGA <u>A</u> CTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	84%
pMH26	ATGAAT <u>C</u> CAATTCTAGGCTTAATTGACTG	68%
pMH6	ATGAAT <u>C</u> GAATTCTAGGCTTAATTGACTG	71%
pMH4	ATGAAT <u>T</u> AATTCTAGGCTTAATTGACTG	125%
pMH7	ATG <u>C</u> CCCGAATTCTAGGCTTAATTGACTG	27%
pMH58	ATG <u>A</u> CCCGAATTCTAGGCTTAATTGACTG	90%

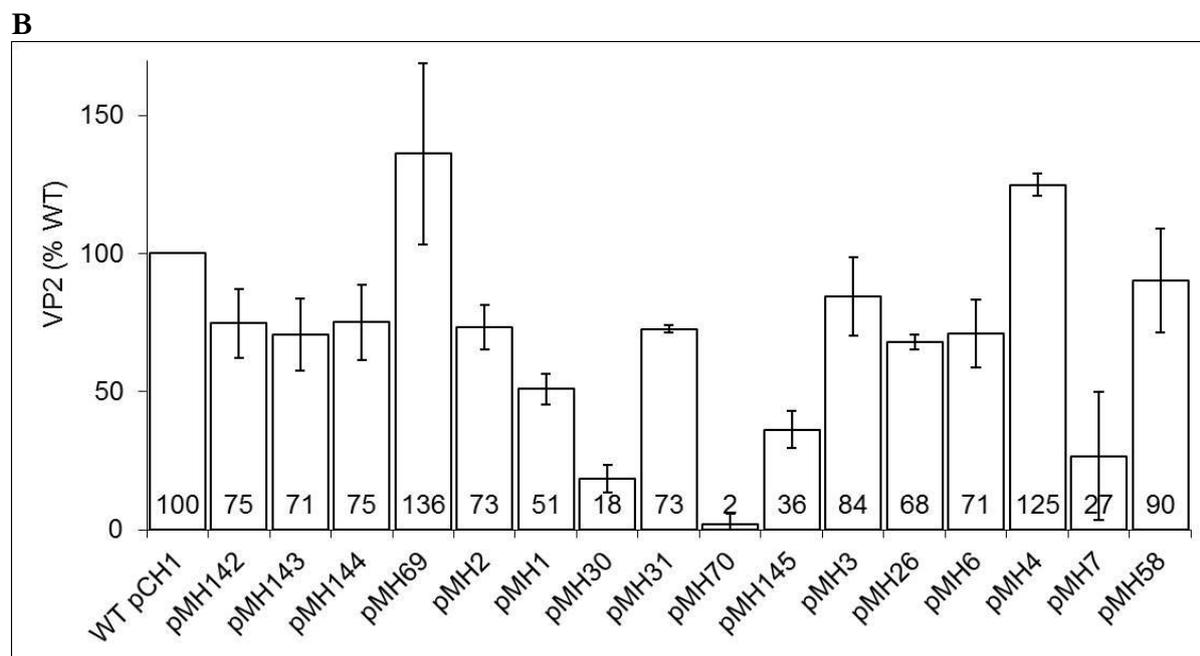


Abb. 4.4: Substitutionen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region

(A) Übersicht über die Position der Substitutionen in der Plasmidsequenz. Ausgetauschte Nukleotide sind unterstrichen. In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die Start/Stoppreion sowie das Stoppkodon #2, #3 und #4 fett markiert. (B) Grafische Gegenüberstellung der VP2 Translationsreinitiationsrate normiert auf die VP1 Translation, bezogen auf den Wildtyp (pCH1). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Werte auch in (A) angegeben.

4.1.2.3 Stoppmutationen

In vorangegangenen Untersuchungen war gezeigt worden, dass eine Termination der VP1 Translation für eine VP2 Expression unerlässlich ist (Luttermann und Meyers, 2007). Dennoch spielt das Stoppkodon #1 des ORF2 bzw. der Start/Stoppstelle nicht allein die entscheidende Rolle für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus. Dies wurde insbesondere ersichtlich durch die Analyse von pMH142, einer Mutante mit Substitution im Stoppkodon (TGA→TGT), welche eine gering verminderte VP2 Expression von 75% aufwies. Die genauere Betrachtung der stromab gelegenen Sequenz, nahe der Start/Stoppstelle, zeigte aber bereits, dass dem Stoppkodon #1 noch zwei weitere Stoppkodone #2 und #3 im Leseraster des ORF2 folgen (Abb. 4.5.A, fett markiert im Wildtypkonstrukt pCH1). Der mögliche Einfluss dieser oder anderer Stoppkodone auf die VP2 Translationsreinitiationsrate wurde im Folgenden durch entsprechende Mutationen untersucht. Die Stoppmutanten (Abb. 4.5.A) wurden analog zu den Deletionsmutanten (Abschnitt 4.1.2.1) hergestellt und exprimiert.

Der Verlust von Stoppkodon #2 und #3 (pMH146) verursachte eine starke Verminderung der VP2 Menge auf 33%. Ein Tausch der Stoppkodone #2 (TAG→TAA) und #3 (TAA→TAG) hatte keinen Einfluss (pMH36). Die Mutation des Stoppkodons #2 führte zu einem divergenten Ergebnis: Wurde das Guanosin an Nukleotidposition drei des Stoppkodon durch ein Cytidin ersetzt, sank das VP2 Level auf 74% (pMH34). Bei Substitution durch Thymidin dagegen stieg die VP2 Rate auf 138% (pMH71). Im Vergleich dazu sank die VP2 Expression bei Mutation des Stoppkodons #3 unabhängig von der Sequenz des Stoppkodons #2 (TAG oder TAA) auf fast 50% (pMH35 und pMH45). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Stoppkodon #2 und #3 eine Rolle bei der Translationsreinitiation spielen könnten.

Die Mutanten pMH173 bis 175 zeigten, dass eine Mutation von Stoppkodon #1 mit gleichzeitiger Insertion von drei, sechs oder neun Cytidinen hinter der ursprünglichen Start/Stoppstelle eine deutliche Abnahme der VP2 Menge auslöste, unabhängig von den stromabwärts gelegenen Stopps. Die Deletion von neun Nukleotiden im Anschluss an die eigentliche Start/Stoppstelle bewirkte, auch hier unabhängig vom ersten Stoppkodon, ebenfalls eine starke Verminderung der VP2 Expression (pMH155/156). Dadurch wurde die oben genannte These, dass Stoppkodon #2 und #3 eine Bedeutung bei der Reinitiation zukommt, unterstützt, da die Verschiebungen der Stoppkodone #2 und #3 ebenfalls das VP2 Level beeinflussten.

Bei den Mutanten pMH158/160 war das Stoppkodon #1 substituiert und genauso die neun Nukleotiddeletion vorhanden. Außerdem wurde das Stoppkodon #3 substituiert und stattdessen ein Stoppkodon zwischen #2 und ursprünglichem #3 eingeführt. Das Stoppkodon #2 entsprach dem Wildtypkodon (pMH158) oder hatte die Kodonsequenz TAA (pMH160). Bei diesen Konstrukten stieg die VP2 Expression nur wenig auf 157% bzw. 119%.

Mutanten, die ein zusätzliches Stoppkodon stromabwärts der Start/Stoppstelle beinhalteten, zeigten erhöhte Translationsinitiationsraten von bis zu 188% (pMH147, 72, 41, 148, 40, 4, 42). Bei dem Konstrukt pMH44 wurden - neben der Einführung des zusätzlichen Stoppkodons - die Stoppkodone #2 und #3 ausgeschaltet, wodurch es zu einem Anstieg der VP2 Menge auf 274% kam. Die Insertion von zwei Stoppkodons im direkten Anschluss an die Start/Stoppstelle rief sogar eine Erhöhung auf 387% hervor.

Den größten Effekt zeigten die Stoppmutanten, bei denen die drei Nukleotide zwischen Stoppkodon #2 und #3 mutiert waren: Allein die Mutation der ersten zwei Nukleotide reichte aus, um die VP2 Expression auf 325% zu erhöhen (pMH151). Die Substitution aller drei Nukleotide zu einem Stoppkodon führte unabhängig von der Unversehrtheit des Stoppkodon #1 oder #3 immer zu einer Steigerung der VP2 Translation (pMH149, 74, 75, 150, 154, 153).

Zusammenfassend strebten die Ergebnisse der Stoppmutationen weit auseinander (Abb. 4.5.B). Mutationen von Stoppkodon #2 und #3 erniedrigten größtenteils die Reinitiationsrate, wohingegen zusätzlich inserierte Stoppkodone diese oftmals sehr stark erhöhen konnten. Da aber auch ein Austausch von Sequenzen unter Beibehaltung der Stoppkodone (pMH36: TAG→TAA und TAA→TAG) möglich war, ohne die VP2 Menge zu beeinflussen, wurde offensichtlich, dass

nicht jede Änderung der Primärsequenz an diesen Positionen zu signifikanten Änderungen der Reinitiationsrate führt. Eine klare Korrelation der Reinitiationsrate mit dem Vorhandensein zusätzlicher Stoppkodone stromab der Start/Stoppstelle konnte nicht bewiesen werden.

A			
	WT/pCH1	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	100%
	pMH142	ATGTATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	75%
	pMH147	ATGATGACAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	96%
	pMH72	ATGATAGCAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	183%
	pMH41	ATGATAACAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	188%
	pMH148	ATGAATTTGATTCTAGGCTTAATTGATACTG	106%
	pMH40	ATGAATTTAGTTCTAGGCTTAATTGATACTG	86%
	pMH4	ATGAATTTAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	125%
	pMH44	ATGAATTTAATTCTATGCTTATTTGATACTG	274%
	pMH152	ATGTTAGTAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	387%
	pMH79	ATGAATTCAAATCTAGGCTTAATTGATACTG	107%
	pMH80	ATGAATTCAAATCTAGGCTTATTTGATACTG	76%
	pMH42	ATGAATTCAAATAATAGGCTTAATTGATACTG	112%
	pMH34	ATGAATTCAAATCTACGCTTAATTGATACTG	74%
	pMH71	ATGAATTCAAATCTATGCTTAATTGATACTG	138%
	pMH35	ATGAATTCAAATCTAGGCTTATTTGATACTG	55%
	pMH146	ATGAATTCAAATCTACGCTTATTTGATACTG	33%
	pMH45	ATGAATTCAAATCTAAGCTTATTTGATACTG	53%
	pMH36	ATGAATTCAAATCTAAGCTTAGTTGATACTG	102%
	pMH151	ATGAATTCAAATCTAGTATTAATTGATACTG	325%
	pMH149	ATGAATTCAAATCTAGTGATAATTGATACTG	438%
	pMH75	ATGAATTCAAATCTAATAGTATTTGATACTG	388%
	pMH74	ATGAATTCAAATCTAGTAAATATTTGATACTG	347%
	pMH150	ATGTATTCAATTCTAGTGATAATTGATACTG	505%
	pMH154	ATGTATTCAATTCTAATAGTATTTGATACTG	431%
	pMH153	ATGTATTCAATTCTAGTAAATATTTGATACTG	526%
	pMH155	ATGA-----TAGGCTTAATTGATACTG	56%
	pMH156	ATGT-----TAGGCTTAATTGATACTG	50%
	pMH158	ATGT-----TAGTAAATATTTGATACTG	157%
	pMH160	ATGT-----TAATAGTATTTGATACTG	119%
	pMH173	ATGTCCCCCCCCATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	24%
	pMH174	ATGTCCCATTCATTCTAGTAAATATTTGATACTG	38%
	pMH175	ATGTCCCCCATTCATTCTAATAGTATTTGATACTG	40%

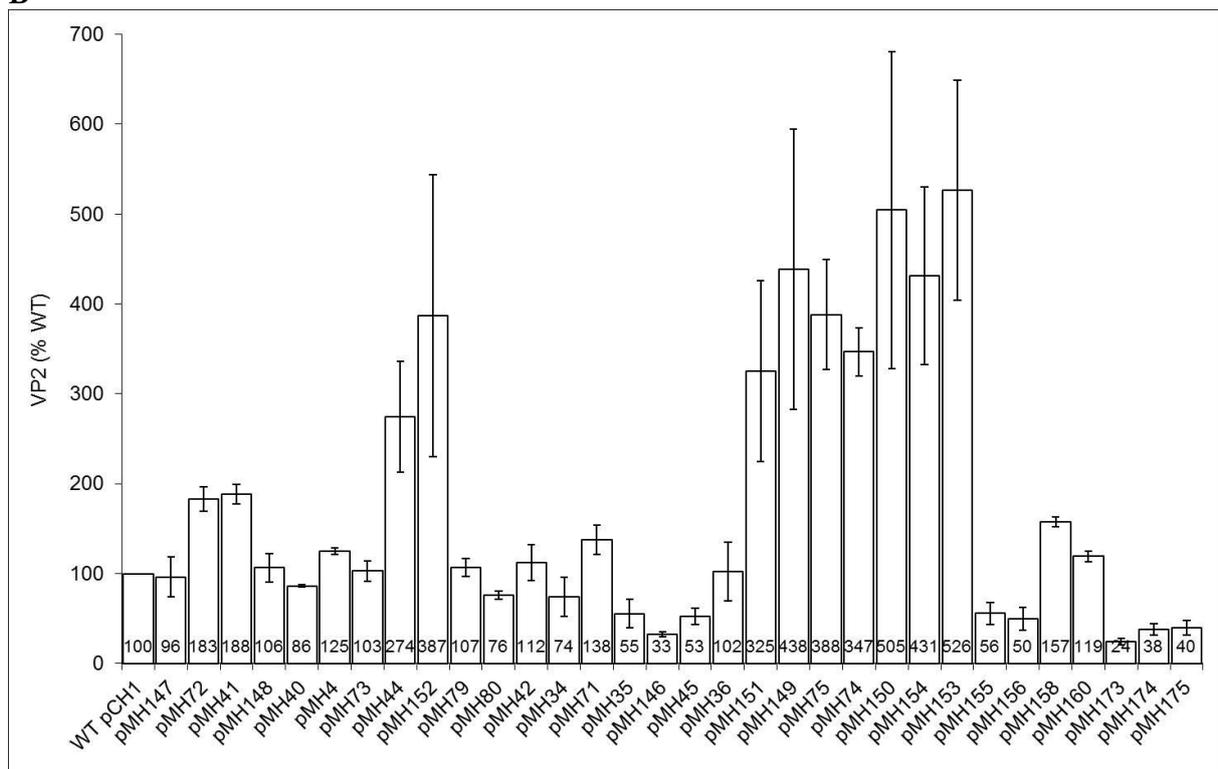
B

Abb. 4.5: Stoppmutationen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region

(A) Übersicht über die Position der mutierten Stoppkodone in der Plasmidsequenz. Veränderte Nukleotide sind unterstrichen und außerdem alle Stoppkodone fett gekennzeichnet. In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die Start/Stoppreion sowie das Stoppkodon #2, #3 und #4 fett markiert. (B) Grafische Darstellung der VP2 Translationsreinitiationsrate normiert auf die VP1 Translation, bezogen auf den Wildtyp (pCH1). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Werte auch in (A) angegeben.

4.1.3 Die Rolle von Stoppkodon #2 und #3

Aus den Analysen der Stoppmutanten ergab sich die Frage, ob die Termination der Translation am Stoppkodon #1 der Start/Stoppstelle unvollständig und deshalb auch eine Termination am Stoppkodon #2 oder #3 möglich ist. Solch eine Situation hätte erklären können, warum Mutationen, die das Stoppkodon #2 und/oder #3 veränderten, zu einer geringeren Reinitiationsrate führten.

Um dies zu untersuchen, wurden im Wildtypkonstrukt pCH1 alle Cysteine im ORF2 durch Serin ersetzt (WT Δ Cys). Anschließend wurden Mutationen eingeführt, die zu einem oder mehreren Cysteinen an verschiedenen Positionen im ORF2 stromab des Stoppkodons #1 führten (Abb. 4.6.A). Die Konstrukte wurden in zwei unterschiedlichen Ansätzen exprimiert: Im ersten Ansatz erfolgte die radioaktive Markierung der Proteine mit [35 S]-Methionin zur Expressionskontrolle. Bei allen Mutanten konnte das mit [35 S]-Methionin markierte VP1 detektiert werden (Abb. 4.6.B, linke Seite).

Um die Termination des VP1 Proteins zu untersuchen, wurden im zweiten Ansatz die Proteine mit [35 S]-Cystein markiert und daraufhin versucht, VP1 zu detektieren. Im Ausgangsplasmid pCH1 konnte wie erwartet im Unterschied zum Konstrukt Δ Cys [35 S]-Cystein markiertes VP1 nachgewiesen werden (Abb. 4.6.B, rechte Seite). In den Konstrukten pMH168 und 170 konnte nach [35 S]-Cysteinmarkierung keine VP1 Expression gezeigt werden. Als weitere Kontrolle diente die Mutante pMH169, bei der das Stoppkodon #1 mutiert wurde und somit nicht als

Translationsterminationssignal fungieren konnte. Das Ribosom nutzt wahrscheinlich das Stoppkodon #2. Bei diesem Konstrukt konnte das VP1 aufgrund des eingefügten Cysteins nach [³⁵S]-Cysteinmarkierung detektiert werden. Durch diese Versuche wurde bestätigt, dass das Ribosom bei der VP1 Translation am Stoppkodon #1 terminiert und nicht darüber hinaus liest. Die Frage nach der molekularen Grundlage für den beobachteten Einfluss von Stoppkodon #2 und #3 auf die Effizienz der VP2 Expression blieb daher offen.

A

WT/pCH1	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTG
WTΔCys	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTGATACTG
pMH168	ATGAATTTGTTTCTAGGCTTAATTGATACTG
pMH169	ATGTATTTGTTTCTAGGCTTAATTGATACTG
pMH170	ATGATGTTGTTGTTAGGCTTAATTGATACTG

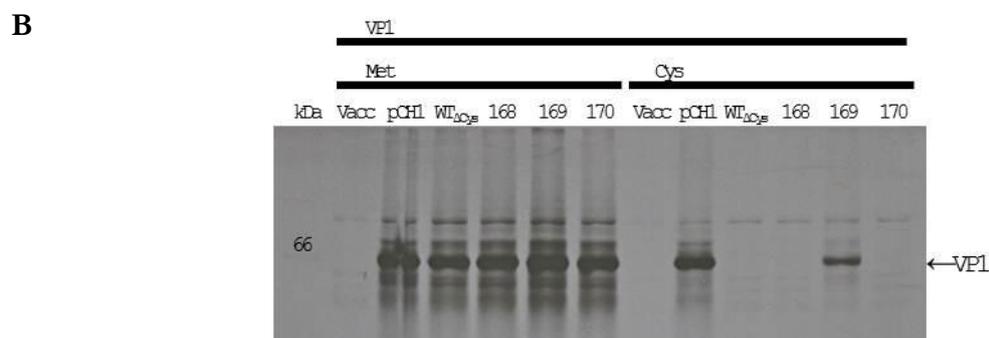


Abb. 4.6: Cysteinmutationen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region

(A) Übersicht über die Position der eingefügten Mutationen in der Plasmidsequenz. Veränderte Nucleotide sind unterstrichen. In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die Start/Stopregion sowie das Stoppkodon #2, #3 und #4 fett markiert. (B) Detektion des immunpräzipitierten Kapsidproteins VP1 nach Transfektion der in (A) beschriebenen Konstrukte in mit Vacciniavirus MVA-T7 infizierte BHK Zellen und anschließender radioaktiver Markierung mit [³⁵S]-Methionin (links) und -Cystein (rechts).

4.1.4 Stoppkodon #4 im dritten Leseraster

Stromabwärts von Stoppkodon #3 ist mit einem Abstand von einem Nucleotid ein Stoppkodon #4 zu finden, das im dritten Leseraster liegt. Das heißt in beiden Leserastern, die nicht für das VP2 kodieren (ORF1 und 2), finden sich kurz nach der Start/Stopstelle ein oder mehrere Translationsterminationssignale. Vorstellbar ist, dass diese dazu dienen, falsch initiierte Ribosomen abzustoppen, so dass sie aufgrund der TURBS/18S rRNA Interaktion erneut im richtigen Leseraster reinitiiieren können. Die zusätzlichen Terminationssignale würden, wie auch die in Abschnitt 4.1.2.3 artifiziell eingefügten Stoppkodone, dazu führen, dass mehr Ribosomen im Leseraster für das VP2 die Translation starten und dadurch zu einer Steigerung der VP2 Expression beitragen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die in Abb. 4.7.A dargestellten Konstrukte erzeugt und exprimiert.

Zunächst wurde nur das Stoppkodon #4 mutiert (pMH176). Dies führte entgegen der obigen Theorie zu keiner Reduktion der VP2 Expression, sondern bewirkte einen Anstieg auf 184%. Ebenso senkte die Substitution der drei Stoppkodone #2 bis #4 (pMH177) die Translationsreinitiationsrate nicht, obwohl die Substitution von Stoppkodon #2 und #3 (pMH146) bereits zu einer Reduktion auf 33% des VP2 Levels geführt hatte (Abb. 4.5).

Das zusätzlich mutierte Stoppkodon #4 im dritten Leseraster (ORF1) steigerte die Translationseffizienz auf 152% bzw. 113% (pMH178/179). Die Veränderung von mehreren Stoppkodons im ORF1 (gepaart mit der Substitution der Stoppkodone #2 und #3) reduzierte die VP2 Expression auf 87% bzw. 65% (pMH180/181). Damit konnte ein effizientes Abstoppen von Ribosomen in den nicht für VP2 kodierenden Leserahmen und eine darauf zurückzuführende Erhöhung der VP2 Translationsinitiationsrate nicht nachgewiesen werden. Das Stoppkodon #4 schien demnach anders als #2 und #3 keine Funktion bei der Translationsreinitiation zu haben.

A	WT/pCH1	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAAT <i>TGATACTG</i>	100%
	pMH176	ATGAATTCAATTCTAGGCTTAATTT <u>T</u> ACTG	184%
	pMH177	ATGAATTCAATTCTACGCTTATTTTACTG	124%
	pMH178	ATGAATTCTGATCTACGCTTATTTTACTG	152%
	pMH179	ATGAATTCAATTCTACGTGAATTTTACTG	113%
	pMH180	ATGAATTCTGATCTACGTGAATTTTACTG	87%
	pMH181	ATGAATTCTGATCTACGTGAATTTGACTG	65%

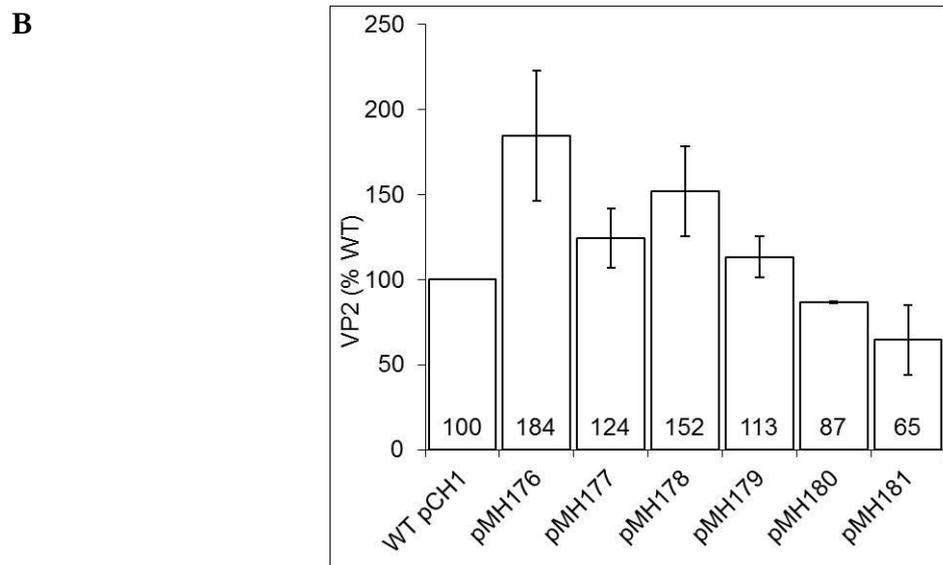


Abb. 4.7: Mutationen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region zur Analyse von Stoppkodon #4

(A) Übersicht über die Position der mutierten Stoppkodone in der Plasmidsequenz. Veränderte Nukleotide sind unterstrichen. In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die Start/Stoppreion sowie das Stoppkodon #2 und #3 des ORF2 fett markiert und das Stoppkodon #4 des ORF1 fett und kursiv gekennzeichnet. (B) Grafische Darstellung der VP2 Translationsreinitiationsrate normiert auf die VP1 Translation, bezogen auf den Wildtyp (pCH1). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Werte auch in (A) angegeben.

Die bisher beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass Mutationen innerhalb der Start/Stopstelle zu sehr unterschiedlichen VP2 Expressionsleveln führten.

Veränderungen der Stoppkodone #2 und #3 bewirkten meist eine Reduktion der VP2 Expression, wenn ein oder beide Stopps zerstört wurden (Ausnahmen pMH177 und 179). Die VP2 Menge stieg größtenteils, sobald Stoppkodon #2 und #3 nach vorne verschoben oder zusätzliche Terminationssignale inseriert wurden. Das „Wildtyp“ Stoppkodon #1 wurde jedoch nicht überlesen, wodurch die Rolle von Stoppkodon #2 und #3 unklar bleibt.

4.1.5 Gibt es Interaktionen mit anderen Bereichen der subgenomischen mRNA, die die Translationsreinitiation beeinflussen?

Nachdem die Bedeutung der 5'-terminalen Region der VP2 kodierenden Sequenz für die Effizienz der Reinitiation durch die vorangegangenen Experimente nicht geklärt werden konnte, lag es nahe, dass nicht die Primärstruktur der RNA, sondern Sekundärstrukturelemente für die beobachteten, unterschiedlichen VP2 Expressionsraten verantwortlich waren. Im Folgenden sollte deshalb ermittelt werden, ob andere Bereiche innerhalb der subgenomischen mRNA mit Teilen der zuvor untersuchten Sequenz interagieren.

Angenommen, es gäbe einen Interaktionspartner in anderen Bereichen der subgenomischen mRNA bzw. ein weiteres Motiv, dessen Wechselwirkung mit der Region stromab der Start/Stoppstelle durch die Mutationen in Abschnitt 4.1.2 beeinflusst würde, so müsste durch die Deletion des Interaktionspartners diese Verbindung gestört und die VP2 Translationsreinitiationsrate verändert werden. Das bedeutet, fände eine Interaktion statt, so würden Mutationen stromab der Start/Stoppstelle diese verstärken oder verschlechtern und so zu einer Erhöhung oder Reduktion der VP2 Syntheserate führen. Die Folge wäre, dass bei einem Wegfall des Bindungspartners dieser durch die inserierten Mutationen hervorgerufene Effekt verschwinden würde.

Um dies zu analysieren wurde in drei verschiedenen Mutanten

- I. der 5'-Bereich der VP1 kodierenden Sequenz durch die für die pestivirale Protease N^{pro} kodierende Sequenz substituiert ($\Delta\text{FCV_ORF2}_{5'\text{-term}} \rightarrow \text{N}^{\text{pro}}$, pCnN20.2, Dr. C. Luttermann),
- II. der Spacerbereich innerhalb der TURBS zwischen Motiv 1 und Motiv 2 deletiert ($\Delta\text{SpacerM1-M2}$, pCH74.3, Dr. C. Luttermann) und
- III. der 3'-Bereich der VP2 kodierenden Sequenz durch eine GFP kodierende Sequenz ersetzt ($\Delta\text{FCV_ORF3}_{3'\text{-term}} \rightarrow \text{GFP}$, pCH1_GFP) (Abb. 4.8.1.A).

Im Anschluss wurde aus den gesamten, bereits hergestellten Konstrukten eine interessante Auswahl an Mutanten getroffen (Abb. 4.8.1.B) und diese mit den Varianten I bis III kombiniert und exprimiert. Zu den ausgewählten Mutationen zählten eine Substitutionsmutante (pMH30), vier Stoppmutanten (pMH4, 40, 41, 44) und vier Deletionsmutanten (pMH47, 50, 52, 53). Bei fast allen stieg oder sank in den oben betrachteten Analysen die VP2 Expression aufgrund der Mutation erheblich, außer bei den Konstrukten pMH4 und 47, bei denen das VP2 Level vergleichbar zum Wildtyp (pCH1) blieb.

Bei den in Abb. 4.8.1.B und C dargestellten VP2 Expressionsanalysen der ausgewählten Mutanten in den drei neuen Sequenzhintergründen I-III (normiert auf den jeweiligen Wildtyp) fanden sich nur fünf Konstrukte, bei denen gegenüber der Ausgangsmutante eine sehr starke Senkung der Expression auftrat (fett markiert) und damit eine potentielle Interaktion gestört würde. Für die Spacerregion schien es keine funktionell wichtige Interaktion mit anderen FCV Sequenzen zu geben. Dies steht im Einklang damit, dass eine Deletion der Spacerregion zu keiner Reduktion der Translationsreinitiationsrate führt (Luttermann und Meyers, 2007). Infolge des Austauschs der 5'-kodierenden Region des VP1 gegen die N^{pro} kodierende Sequenz sank das VP2 Level für die Konstrukte pMH44 und 53 im Vergleich zu den Ausgangsmutanten enorm. Der Austausch der 3'-kodierenden Region des VP2 gegen eine GFP kodierende Sequenz reduzierte die VP2 Expression für die Konstrukte pMH4, 41, 44 verglichen mit dem VP2 Level des Ausgangskonstrukts pCH1 nur moderat.

Zur weiteren Betrachtung wurde anschließend die Sequenz der subgenomischen mRNA *in silico* nach einer möglichen umgekehrt komplementären Sequenz zu der jeweiligen Mutation durchsucht (freundlicherweise programmiert in Python durch Dr. D. Aberle). Dazu wurden dem Programm die Wildtyp- (pCH1) und Motivsequenz sowie eine Fenstergröße (Mindestanzahl an Nukleotiden der gesuchten Sequenz, hier: sechs) als Parameter vorgegeben. Nach dem Programmstart wurde die TURBS gesucht und der Bereich stromauf- und abwärts durch das Programm definiert, um danach im jeweiligen Bereich nach einer invertierten und komplementären Motivsequenz zu suchen. Die Ausgabe enthielt die mindestens sechs Nukleotid

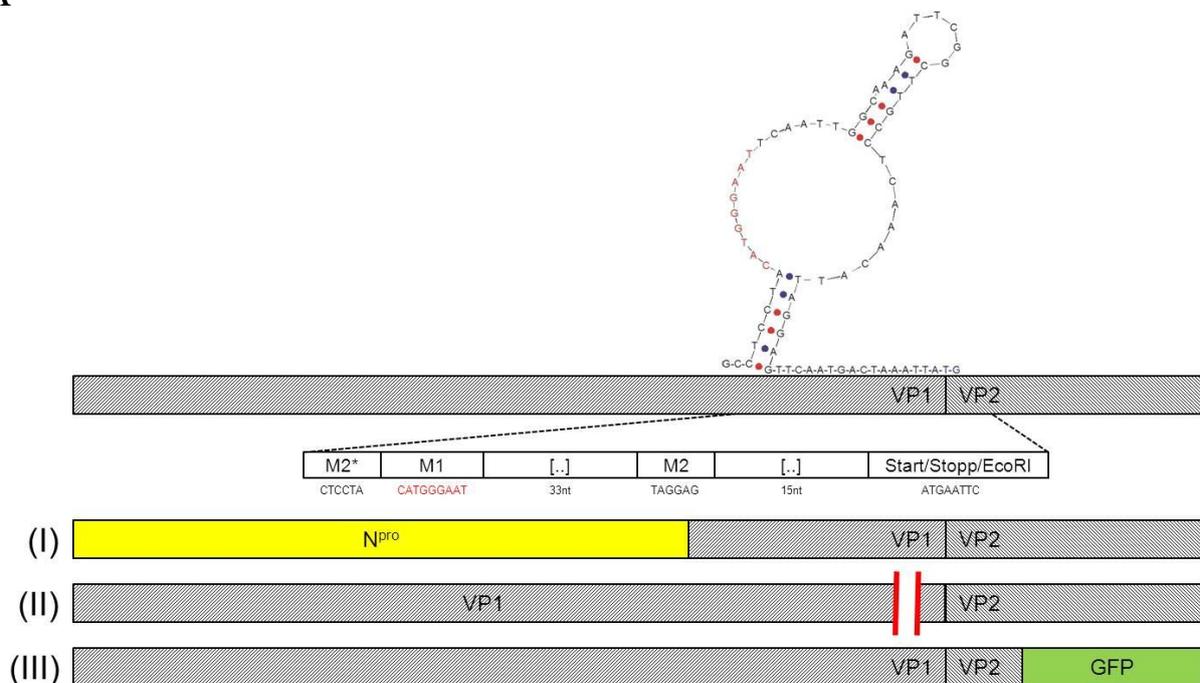
lange Motivsequenz (Abb. 4.8.2.A und B, Spalte 3) sowie die fünf stromauf und -abwärts gelegenen Nukleotide.

Für das Konstrukt pMH44 wurden im 5'-Bereich der VP1 kodierenden Sequenz die revers komplementären Motive -ATAAGC- und -AGAATT- gefunden (Abb. 4.8.2.A, Zeile 3 und 4). Für pMH53 ermittelte das Programm drei mögliche Interaktionssequenzen im 5'-Bereich: -AGCAAT-, -CAAUUA- (Pos. 1181) und -CAAUUA- (Pos. 1487) (Abb. 4.8.2.A, Zeile 5-7). Zur Kontrolle wurden dann im jeweiligen Ausgangskonstrukt pMH44 oder 53 diese Motive mutiert wie in Abb. 4.8.2.A Spalte 6 angegeben (Konstrukte pMH85-89), indem jeweils die mittleren beiden Nukleotide des sechs Nukleotide langen Motivs substituiert wurden. In der letzten Spalte ist die VP2 Menge gezeigt, die von diesen letztgenannten Konstrukten exprimiert wurde. Diese unterschied sich nicht signifikant von der Menge an VP2 Protein, welche durch die ursprünglichen Mutationskonstrukte pMH44 und 53 translatiert wurde (Spalte 7).

Analog wurde oben beschriebenes Programm für die drei interessanten Substitutionsmutanten im 3'-kodierenden Bereich der VP2 Sequenz pMH4, 41, 44 ausgeführt. Für pMH4 und 41 wurde je ein Motiv entdeckt: -AAATTC- und -TATCATA- (Abb. 4.8.2.B, Zeile 3 und 4). Zwei Motivsequenzen wurden für pMH44 gefunden: -ATAGAATT- und -ATAGAA- (Abb. 4.8.2.B, Zeile 5 und 6). Auch diese vier Motive wurden in den Ursprungskonstrukten entsprechend verändert (Abb. 4.8.2.B, Spalte 5 und 6) und anschließend die neu gewonnenen Mutationskonstrukte exprimiert (Abb. 4.8.2.B, Spalte 7). Anders jedoch als die Motive im 5'-terminalen Ansatz, blieb die VP2 Expression im Vergleich zum Expressionslevel der Ausgangskonstrukte nicht unverändert, sondern sank in diesem Vergleich sehr deutlich ab, teilweise unter 100% des Wildtyplevels. Damit wurde gezeigt, dass die VP2 Expression bei den Mutanten pMH4, 41 und 44 stieg, aber andererseits sank, wenn gleichzeitig die Motive im VP2 mutiert waren.

Die gefundenen Motive im 5'-Bereich der VP1 kodierenden Sequenz hatten folglich keine Bedeutung für die VP2 Translationsreinitiation, wohingegen die Motive im 3'-Bereich der VP2 kodierenden Sequenz diese anscheinend durchaus beeinflussten.

A



B

		WT	5'-term	Spacer	3'-term
WT/pCH1	ATGAATTC AATTCTAGGCT TAATTG ACTG	100%	100%	100%	100%
pMH4	ATGAAT T AATTCTAGGCTTAATTGACTG	125%	94%	102%	69%
pMH30	ATGTCTTCAATTCTAGGCTTAATTGACTG	18%	13%	61%	
pMH40	ATGAAT T AGTTCTAGGCTTAATTGACTG	86%	71%	123%	72%
pMH41	ATGATA ACA AATTCTAGGCTTAATTGACTG	188%	147%	243%	79%
pMH44	ATGAAT T AATTCTATGCTT A TTTGACTG	274%	89%	314%	78%
pMH47	ATGAAT T ---TTCTAGGCTTAATTGACTG	101%	98%	124%	80%
pMH50	ATGAATTC A ATTCTAG---TAATTGACTG	218%	129%	285%	
pMH52	ATGAATTC A ATTCTAGGCTTAA---ATACTG	53%	42%	91%	
pMH53	ATGAATTC A ATTCTAGGCTTAATTG---CTG	176%	69%	207%	

C

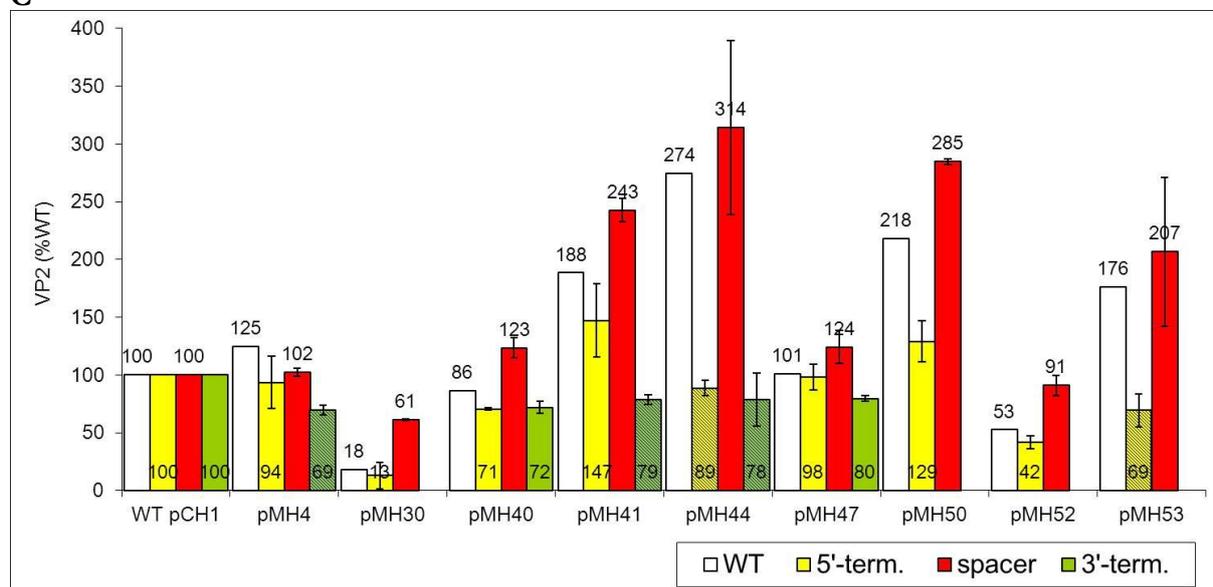


Abb. 4.8.1: Untersuchung der subgenomischen RNA des FCV nach interagierenden Sequenzen

(A) Übersicht über die drei jeweils einzeln ausgetauschten Bereiche. Die Abbildung veranschaulicht neben dem Wildtyp (I, gelb) die Substitution des 5'-Bereichs der VP1 kodierenden Sequenz durch die für die pestivirale Protease N^{pro} kodierende Sequenz (5'-terminal), (II, rot) die Deletion des Spärbereichs innerhalb der TURBS (spacer) und (III, grün) den Austausch des 3'-Bereichs der VP2 kodierenden Sequenz durch eine GFP kodierende Sequenz (3'-terminal). Die circa 70nt lange FCV TURBS am 3'-Ende des ORF2 bleibt davon unberührt. (B) Ausgewählte Mutanten mit Angabe der Plasmidsequenz sowie der VP2 Expressionsrate unter Wildtypbedingungen oder in Kombination mit einer der Modifikationen (I) - (III). (C) Grafische Darstellung der VP2 Translationsreinitiationsrate normiert auf die VP1 Translation, bezogen auf den jeweiligen Wildtyp.

(A) 5'-terminal

Konstrukt	Sequenz	Motiv	nt Pos. im Plasmid	Subst.- mutante	Subst.	Mutante	5'-term Subst. zu N ^{pro}	Motiv Subst.
WT/pCH1	ATGAATTC AATTCTAGGCT TAAT TGATACTG					100%	100%	100%
pMH44	ATGAATTTAATTCTATgcttatTTGATACTG	ATAAGC	101	pMH85	ATCTGC	274%	89%	254%
pMH44	ATGAATTTaattctATGCTTATTTGATACTG	AGAATT	138	pMH86	AGCTTT	274%	89%	222%
pMH53	ATGAATTC AATTCTAGGCTTA aattg---ctG	AGCAAT	569	pMH87	AGGCAT	176%	69%	155%
pMH53	ATGAATTC AATTCTAGGCT taattg---CTG	CAATTA	1181	pMH88	CATGTA	176%	69%	188%
pMH53	ATGAATTC AATTCTAGGCT taattg---CTG	CAATTA	1487	pMH89	CATGTA	176%	69%	199%

(B) 3'-terminal

Konstrukt	Sequenz	Motiv	nt Pos. im Plasmid	Subst.- mutante	Subst.	Mutante	3'-term Subst. zu GFP	Motiv Subst.
WT/pCH1	ATGAATTC AATTCTAGGCT TAAT TGATACTG					100%	100%	100%
pMH4	ATgaatttAATTCTAGGCTTAATTGATACTG	AAATTC	2167	pMH121	ACTCTC	125%	69%	79%
pMH41	tatgata ACAATTCTAGGCTTA AATTGATACTG	TATCATA	2296	pMH123	TCGGATA	188%	79%	107%
pMH44	ATGAATTTaattctatGCTTATTTGATACTG	ATAGAATT	2064	pMH120	ATCCCTTT	274%	78%	66%
pMH44	ATGAATTTAattctatgCTTATTTGATACTG	ATAGAA	2302	pMH124	TAACTA	274%	78%	75%

Abb. 4.8.2: Veränderung der gefundenen potentiellen Interaktionsmotive

Die Tabellen zeigen die *in silico* identifizierten Motive im (A) 5'-Bereich der VP1 und (B) 3'-Bereich der VP2 kodierenden Sequenz. Dargestellt sind zunächst die Ausgangskonstrukte mit ihrer Plasmidsequenz beginnend mit der Start/Stoppstelle (Spalte 1 und 2). In der Wildtypsequenz sind die Start/Stoppstelle sowie die zusätzlichen Stoppkodone #2, #3 und #4 fett markiert. Für die Sequenzen der Mutanten sind die substituierten Nukleotide unterstrichen und die Deletionen durch „-“ symbolisiert. Die zu den Mutationen passenden, *in silico* ermittelten, revers komplementären Motivsequenzen sowie die Position innerhalb der subgenomischen mRNA sind in Spalte 3 und 4 angegeben. Innerhalb der Ausgangssequenz wird die Motivsequenz mittels Kleinbuchstaben verdeutlicht. In den Spalten 5 und 6 folgen die Mutanten (pMH85-89 bzw. pMH120, 121, 123, 124) nebst Sequenz, in welchen das in Spalte 3 angegebene Motiv durch Substitution von zwei bis vier Nukleotiden zerstört wurde. Abschließend sind die VP2 Expressionen jeweils gegenübergestellt: in Spalte 7 für die Ausgangskonstrukte mit Mutation stromab der Start/Stoppstelle und in Spalte 8 für die selbigen Konstrukte mit zusätzlicher Substitution des (A) 5'-Bereichs der VP1 oder (B) 3'-Bereichs der VP2 kodierenden Sequenz (Vgl. beschriebene Modifikation I oder III). Die VP2 Mengen für die Konstrukte mit substituierter Motivsequenz im (A) 5'-Bereich der VP1 oder (B) 3'-Bereich der VP2 kodierenden Sequenz sind in Spalte 9 aufgeführt.

Zusammenfassend behinderten Modifikationen im 5'-Bereich der VP1 kodierenden Sequenz die Reinitiation nicht. Gleiches galt für Veränderungen in der Spacerregion zwischen Motiv 1 und 2. Im 3'-Bereich der VP2 kodierenden Sequenz schienen mehrere Sequenzabschnitte eine Rolle zu spielen. Diese potentiellen Interaktionspartner waren über den gesamten VP2 kodierenden Bereich (Position 2004-2324nt) verteilt.

Ein definiertes Motiv, das über längere Sequenzabschnitte der FCV RNA hinweg mit der Start/Stoppreion interagiert, ist vermutlich nicht vorhanden. Vorstellbar ist aber, dass die gefundenen Motive innerhalb der VP2 Sequenz zu einer Sekundärstruktur beitragen, welche ihrerseits auf die VP2 Translation wirkt.

4.1.6 Strukturvorhersage und Bedeutung der Struktur für die Translationsreinitiation

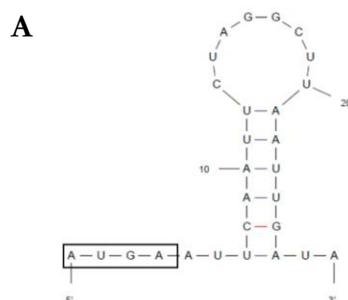
Die Sekundärstruktur der TURBS am 3'-Ende der VP1 kodierenden Sequenz bestimmt höchstwahrscheinlich den Startpunkt der Reinitiation. Sekundärstrukturelemente in anderen Bereichen der RNA könnten aber auch die Reinitiation beeinflussen. Entsprechende Strukturen nahe der Start/Stopppregion wären möglicherweise in der Lage, die Reinitiation zu inhibieren oder zu fördern, indem sie die Bewegung des Ribosoms behindern.

Um einen ersten Eindruck von der Sekundärstruktur im 5'-terminalen Bereich der VP2 kodierenden Sequenz zu erhalten, wurden ausgewählte Sequenzbereiche *in silico* mit Hilfe des RNA Strukturvorhersageprogramms *mfold* (Zuker, 2003) gefaltet. Das Programm ermittelte meist mehrere, alternative Strukturen. Die Struktur mit der größten negativen Änderung der freien Energie (ΔG , ausgegeben durch *mfold*) war die nach der Berechnung thermodynamisch stabilste und wird in dieser Arbeit ausschließlich angegeben und berücksichtigt (Mathews *et al.*, 1999).

Für alle Mutanten wurden zunächst die ersten 28 Nukleotide der VP2 kodierenden Sequenz verwendet, wodurch die Anzahl der möglichen Strukturen überschaubar gehalten wurde. Für diesen Sequenzabschnitt des Wildtypkonstrukts pCH1 wurde mit $\Delta G = -2,10$ kcal/mol die in Abb. 4.9.A dargestellte Struktur als stabilste berechnet. Im Teil (B) dieser Abbildung sind beispielhaft die erhaltenen Strukturen des 5'-terminalen Bereichs für die acht Mutationskonstrukte pMH40, 41, 44, 47, 50, 52, 53 und 70 dargestellt. Im Fall eines positiven ΔG wie bei pMH44, 47, 52 und 53 war es relativ unwahrscheinlich, dass sich diese Struktur ausbildet, da diese instabil ist. In allen anderen Fällen (negatives ΔG), auch den hier nicht gezeigten Konstrukten, kam es zur Ausbildung einer Haarnadelschleife am 5'-Ende der VP2 kodierenden Region. Dies ging mit der in Abschnitt 4.1.1 gemachten Beobachtung einher, dass es zwei gegenseitig komplementäre Bereiche am Anfang der VP2 kodierenden Sequenz gibt. Beim Vergleich der Strukturen und Werte für die Änderung der freien Energie war erkennbar, dass viele verschiedene Faktoren die Stabilität der Haarnadelschleife beeinflussen. Dazu gehören die Anzahl der GC-Paarungen, die Größe des Stamms und die Stabilität der Schleife. Nicht zuletzt war bei diesen Überlegungen zu berücksichtigen, dass hier nur zweidimensionale Strukturen dargestellt sind und sich dreidimensional noch deutlich mehr und komplexere Strukturen ausbilden könnten.

Eine Korrelation zwischen Struktur und VP2 Expressionsrate erschien beim Vergleich der VP2 Werte in Bezug zu den Werten für die Änderung der freien Energie jedoch fragwürdig (Abb. 4.9.C). Für die Mutanten pMH40 und 50, mit einer ähnlichen Stabilität der Haarnadelschleife, variierten die VP2 Mengen zwischen 86% und 218%. Ebenso lagen die VP2 Level für die Konstrukte pMH44 und 52 trotz der in beiden Fällen äußerst geringen Stabilität der Haarnadelstruktur weit auseinander. Für pMH44 war die VP2 Expression stark erhöht (274%) und sank dagegen für pMH52 (53%).

Für die gesamten in dieser Arbeit gezeigten Mutanten bleibt festzuhalten, dass, ungeachtet der Einführung unterschiedlicher Veränderungen, die Haarnadelschleife zumeist erhalten blieb, wenn auch oft in einer anderen Form und Stabilität.



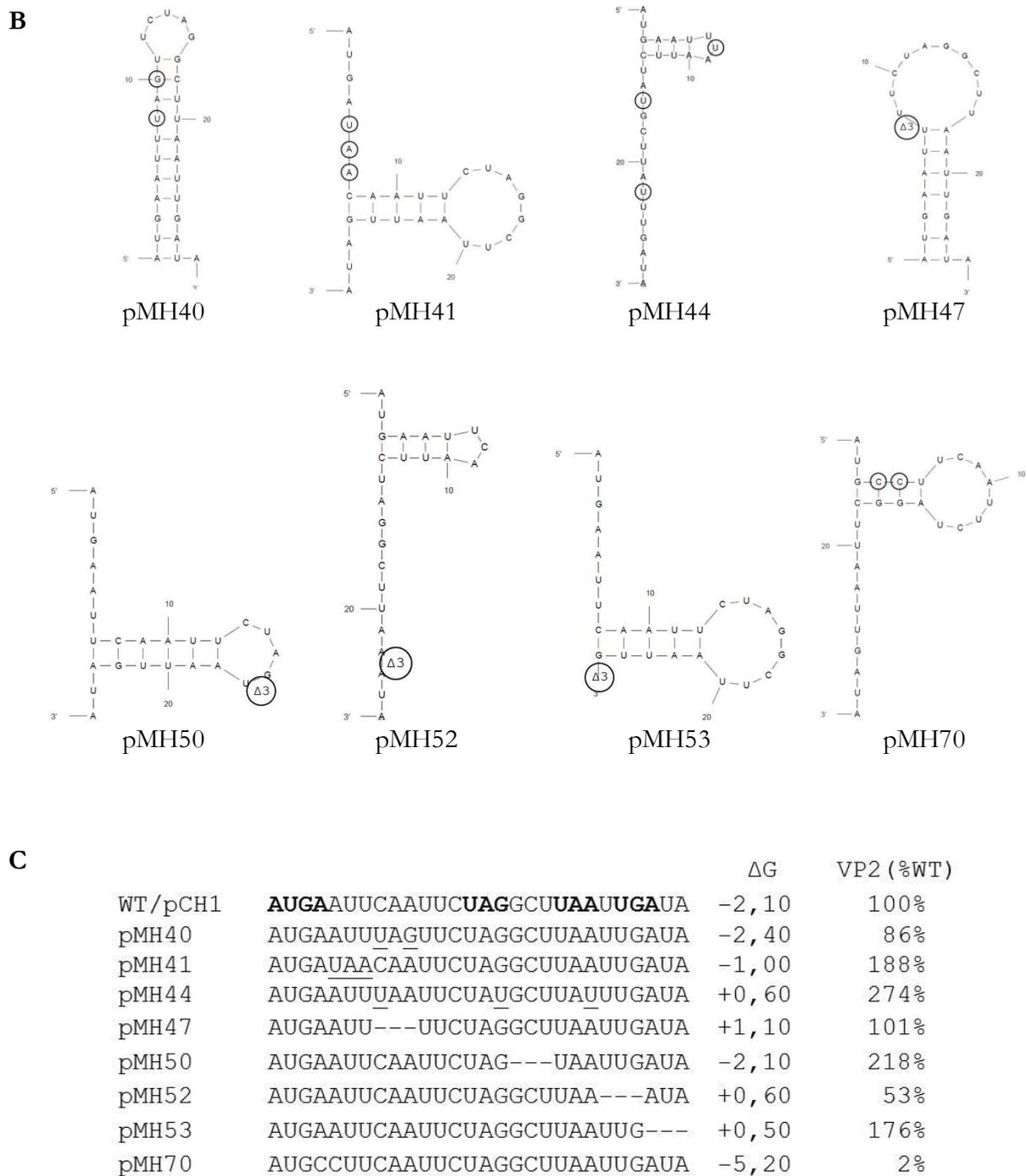


Abb. 4.9: Strukturvorhersage mittels *mfold*

(A) RNA-Struktur des Wildtypkonstrukts pCH1. Die Start/Stoppstelle ist markiert. (B) RNA-Struktur von ausgewählten Beispielkonstrukten. Die zugehörigen Mutationen sind jeweils umrandet. (C) RNA-Sequenzen zu den in (A) und (B) gezeigten Strukturen mit dazugehöriger Änderung der freien Energie (ΔG) (Ausgabe durch *mfold*) und der VP2 Expression (normiert auf die VP1 Translation und bezogen auf den Wildtyp pCH1). In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die Start/Stoppreion sowie das Stoppkodon #2, #3 und #4 fett markiert. Mutierte Nucleotide sind unterstrichen, Deletionen durch (-) gekennzeichnet.

In einem weiteren Analyseansatz wurden die Strukturen einzelner Konstrukte von Nukleotid 13 bis 52 der VP2 kodierenden Sequenz ermittelt. Es ist davon auszugehen, dass die zuvor analysierte Haarnadelstruktur aufgelöst würde, wenn das Ribosom die Start/Stoppreion erreicht und dabei sowohl mit dem stromauf- wie stromabwärts gelegenen Bereich der mRNA überlappt. Durch die Untersuchung möglicher Strukturen in der weiter stromab der Start/Stoppstelle gelegenen Region sollte festgestellt werden, ob sich in diesem Bereich ebenso Strukturelemente ausbilden und diese ggf. mit der VP2 Reinitiationsrate in Einklang gebracht werden können. Es konnte gezeigt werden, dass sich in diesem Bereich der VP2 kodierenden Sequenz bei allen ausgewählten Konstrukten ebenfalls eine Haarnadelschleife bildete, welche aufgrund der Werte für die Änderung der freien Energie sehr stabil sein sollte. Eine Verbindung zwischen Struktur und VP2 Expressionsrate war aber auch hier nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

4.1.6.1 Einfluss der Haarnadelschleife

Die Ergebnisse, die für das in Abb. 4.9.B und C dargestellte Konstrukt pMH70 erhalten wurden, unterstützten die Theorie, dass das Ribosom bei der Reinitiation aufgrund des Vorhandenseins einer stabilen Haarnadelschleife (hier $\Delta G = -5,2$) behindert wird und die VP2 Expression daher stark reduziert war (hier 2%). Um diesen möglichen Einfluss der Haarnadelschleife auf die VP2 Expression zu untersuchen, wurde die Stabilität dieser Struktur durch unterschiedliche Veränderungen in der gepaarten Sequenz herabgesetzt. Dazu wurden die Konstrukte pMH74 und 75 verwendet, die ein sehr hohes VP2 Level von 347% bzw. 388% aufwiesen. Für beide Konstrukte wurde die stromabwärts gelegene Sequenz des gepaarten Bereichs fast vollständig durch Cytidine und Guanosine ersetzt und dadurch die Mutanten pMH162 und 164 erzeugt (Abb. 4.10.A). Obgleich durch *mfold* für beide Mutanten eine Haarnadelstruktur ausgegeben wurde (Abb. 4.10.B), war die Ausbildung dieser Faltungszustände unter natürlichen Bedingungen aufgrund ihrer gesenkten Stabilität kaum anzunehmen. Diese geschwächte Stabilität zeigte sich in den nicht negativen Werten für die Änderung der freien Energie (ΔG).

Obwohl die Haarnadelschleife sich also bei den Konstrukten pMH162 und 164 im Vergleich zu pMH74 und 75 wahrscheinlich nicht bildete, führten die Substitutionen nicht zu einer eindeutig geänderten VP2 Expression. Für die Mutante pMH162 sank die VP2 Menge (254%), wohingegen sie für pMH164 sogar auf 537% anstieg (Abb. 4.10.A und C).

In einem folgenden Versuch wurde die Haarnadelschleife durch zu den eingeführten Mutationen reziproke Veränderungen in der stromaufwärts gelegenen Sequenz der gepaarten Regionen wiederhergestellt (pMH163 und 165). Aufgrund der erhöhten Anzahl an GC-Paarungen besaßen die berechneten Strukturen eine große Stabilität bzw. hohe negative Werte für die Änderung der freien Energie (Abb. 4.10.A und B) im Vergleich zu den Ausgangskonstrukten pMH74 und 75. Die VP2 Expression der Konstrukte pMH163 und 165 lag bei 24% bzw. 19%. Dies ließ, wie bereits beschrieben, vermuten, dass das Ribosom diese Haarnadelstruktur nicht auflösen konnte und daher die Reinitiation inhibiert oder sogar blockiert wurde.

C

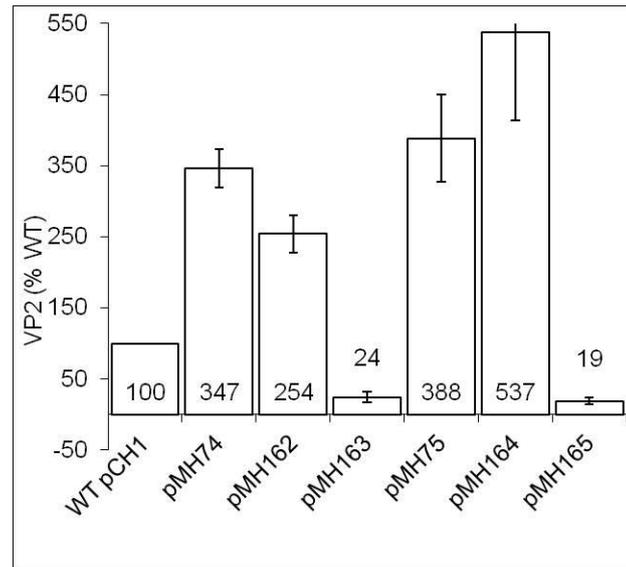


Abb. 4.10: Destabilisierung und Rekonstruktion der Haarnadelschleife

(A) RNA-Struktur der Ausgangskonstrukte pMH74 und 75 sowie der Mutanten pMH162 bis 165. Mutierte Nukleotide in den Ausgangskonstrukten pMH74 und 75 sind umrandet. Zusätzlich eingeführte Mutationen, die die Sequenz der gepaarten Struktur verändern, sind edgig umrandet. (B) RNA-Sequenzen zu den in (A) gezeigten Strukturen mit dazugehöriger Änderung der freien Energie (ΔG) (Ausgabe durch *mfold*) und der VP2 Expressionsrate (normiert auf die VP1 Translation, bezogen auf den Wildtyp pCH1). In der Wildtypsequenz (pCH1) sind die Start/Stoppreion sowie das Stoppkodon #2, #3 und #4 fett markiert. Mutierte Nukleotide, die auf den Veränderungen in den Ausgangskonstrukten pMH74 und 75 beruhen, sind unterstrichen. Mutationen, die die Sequenz der gepaarten Struktur verändern, sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. (C) Grafische Darstellung der VP2 Translationsreinitiationsrate.

Diese Untersuchungen zeigten, dass trotz aller Veränderungen die Haarnadelstruktur im 5'-terminalen Bereich der VP2 kodierenden Sequenz zumeist erhalten blieb. Eine Beeinträchtigung der Haarnadelschleife beeinflusste die Translationsreinitiationsrate in den ausgewählten Beispielen in Abb. 4.9 nicht. Andererseits war bei den Rekonstruktionen der Haarnadelstruktur durch reziproke Mutationen eine klare Tendenz erkennbar: Mutanten mit einer stabileren Haarnadelformation als der Wildtyp ($\Delta G < WT$) wiesen eine deutlich reduzierte VP2 Expression auf, wohingegen Mutanten mit einer weniger stabilen Haarnadelstruktur als der Wildtyp ($\Delta G > WT$) ebenso deutlich stark erhöhte VP2 Expressionsraten besaßen.

Die Frage nach einer möglichen Funktion der Haarnadelformation blieb daher unklar. Denkbar wäre, dass diese Struktur nicht notwendig ist, aber möglicherweise die Verlangsamung des Ribosoms für den Prozess der Termination/Reinitiation fördert und dadurch modulierend auf die Reinitiationsrate wirkt. Eine deutlich erhöhte Stabilität der Haarnadelschleife schien dagegen das Ribosom zu behindern.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die VP2 kodierende Sequenz signifikant die Reinitiationsrate beim FCV beeinflusste. Ein klares Modell zum molekularen Mechanismus lässt sich jedoch weder bezüglich der primären Sequenz noch der ermittelten Sekundärstruktur ableiten.

4.1.7 Vergleichende Analysen zum RHDV

Die VP2 Sequenz verschiedener RHDV Stämme und Isolate weist eine Homologie von 92% auf (Abb. 4.11). Werden nur die im NCBI verzeichneten Sequenzen betrachtet wie zuvor für FCV (ohne die Isolate AST89 und BS89), so liegt die Übereinstimmung sogar bei fast 95%. Damit ist die Sequenz des minoren Kapsidproteins des RHDV deutlich stärker konserviert als die des FCV (71%).

Anders als für FCV finden sich für RHDV direkt im Anschluss an die Start/Stoppstelle keine weiteren Stoppkodone innerhalb der ersten 20 bis 25 Nukleotide. Erst an Position 44 ist ein weiteres Stoppkodon vorhanden, welches sich jedoch im dritten Leseraster (ORF1, weder kodierend für VP1 noch VP2) befindet.

FRG	AUGUCUGAAUUC AUCGGAUUGGGACUUGCAGGUGCCGGUGUCCUGAGCAAUGCAUUGCUC	60
V-351	AUGUCUGAAUUC AUUGGAAUUGGGACUUGCAGGUGCCGGUGUCCUGAGCAAUGCAUUGCUC	60
BS89	AUGUCUGAAUUC AUUGGAAUUGGGACUUGCAGGUGCCGGUGUCCUGAGCAAUGCAUUGCUC	60
AST89	AUGUCUGAAUUC AUUGGAAUUGGGACUUGCAGGUGCCAGCGUUUUGAGCAAUGCAUUGCUC	60
SD	AUGUCUGAAUUC AUUGGAAUUGGGACUUGCAGGUGCCAGCGUUUUGAGCAAUGCAUUGUUC	60
	***** ** *	
FRG	CGCAGGCAAGAGCUGCAACUACAAAAACAAGCUAUGGAGAAUGGGUUGGUUUUGAAAGCC	120
V-351	CGCAGGCAAGAGCUGCAACUACAAAAACAAGCUUUGGAGAAUGGGUUGGUUUUGAAAGCC	120
BS89	CGCAGGCAAGAGCUGCAGCUACAAAAACAAGCUUUGGAGAAUGGGUUGGUUUUGAAAGCC	120
AST89	CGCAGGCAAGAGCUGCAACUACAAAGACAAGCUUUGGAGAAUGGGUUGGUUUUGAAAGCC	120
SD	CGCAGGCAAGAGCUGCAACUACAAAGACAAGCUUUGGAGAAUGGGUUGGUUCUGAAAGCC	120
	*****.*****.***** ***** *****	
FRG	GACCAAUUAGGUAGGUUAGGUUUUAUCCAAUUGAAGUUAAGAAUGUGAUUGUAGGUAAU	180
V-351	GACCAAUUAGGUAGGUUAGGUUUUAUCCAAUUGAAGUUAAGAAUGUGAUUGUAGGUAAU	180
BS89	GACCAAUUAGGUAGGUUAGGUUUUAUCCAAUUGAAGUUAAGAAUUGAUUGUAGGUAAU	180
AST89	GACCAAUUAGGUAGGUUAGGUUUUAUCCAAUUGAAGUUAAGAAUGUGAUUGUAGGUAAU	180
SD	GACCAAUUAGGUAGGUUAGGUUUUAUCCAAUUGAAGUUAAGAAUGUGAUUGUAGGUAAU	180
	*****.*****.***** ***** *****	
FRG	AGUUUUAGUAGUAAUGUUAGAUUAAGCAAUAUGCAUAAUGAUGCUAGUGUAGUUAUUGCU	240
V-351	AGUUUUAGUAGUAAUGUUAGAUUAAGCAAUAUGCAUAAUGAUGCUAGUGUAGUUAUUGCU	240
BS89	AGUUUUAAUAGUAAUGUUAGGUUAAGUAAUAUGCAUAAUGAUGCUAGUGUAGUUAUUGCU	240
AST89	AGUUUUAGUAGUAAUGUUAGAUUAAGUAAUAUGCAUAAUGAUGCUAGUGUAGUUAUUGCU	240
SD	AGUUUUAGUAGUAAUGUUAGAUUAAGUAAUAUGCAUAAUGAUGCUAGUGUAGUUAUUGCU	240
	*****.*****.***** ***** *****	
FRG	UAUAAUGUGUAUAAUCCCGCUAGCAAUGGCAUUAAGAAAGAAAAUUAAGAGUUUGAAUAAU	300
V-351	UAUAAUGUGUAUAAUCCCGCUAGCAAUGGCAUUAAGAAAGAAAAUUAAGAGUUUGAAUAAU	300
BS89	UAUAAUGUGUAUAAUCCUGCCAGCAAUGGCAUUAAGAAAGAAAAUUAAGAGUUUAAUAAU	300
AST89	UAUAAUGUGUAUAAUCCUGCCAGCAAUGGCAUUAAGAAAGAAAAUUAAGAGUUUGAAUAAU	300
SD	UAUAAUGUGUAUAAUCCUGCCAGCAAUGGCAUUAAGAAAGAAAAUUAAGAGUUUGAACAAU	300
	***** ** ***** ***** ** **	
FRG	AGUGUUAAGAUUUUAUAAUACCACAGGCGAGUCCAGUGUUUGA	342
V-351	AGUGUUAAGAUUUUAUAAUACCACUGGCGAGUCCAGUGUUUAA	342
BS89	AGUGUUAAGAUUUUAUAAUACCACUGGCGAGUCCAGUGUUUAA	342
AST89	AGUGUUAAGAUUUUAUAAUACCACUGGGGAGUCCAGUGUUUAA	342
SD	AGUGUUAAGAUUUUAUAAUACCACUGGGGAAUCCAGUGUUUAA	342
	***** ***** ** ** ***** *	

Abb. 4.11: Multipler Sequenzvergleich

der VP2 kodierenden RNA-Sequenzen aller NCBI gelisteten RHDV Stämme und Isolate mittels Clustal W (Version Omega). Für die dieser Arbeit zugrunde liegende Sequenz (Stamm RHDV_FRG) sind das Start- und Stoppkodon fett markiert. Das Symbol (*) kennzeichnet vollständig konservierte Nukleotide. Außerdem sind Bereiche mit überwiegend gleichen Sequenzen durch (.) angegeben.

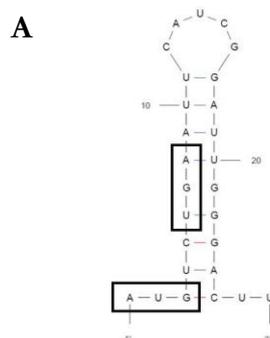
4.1.7.1 Strukturvorhersage für die 5'-terminale Region der VP2 kodierenden Sequenz des RHDV

Die in Abb. 4.12.A dargestellte RNA-Struktur war die laut *mfold* stabilste Form für den 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region des RHDV Wildtyps. Wie beim FCV Wildtyp wurde auch hier eine Haarnadelstruktur prognostiziert. Beim RHDV umfasste diese jedoch sogar das Start- und Stoppkodon, während sie beim FCV zwei Nukleotide nach der Start/Stoppstelle lokalisiert war. Desweiteren war der Stamm der Haarnadelformation beim RHDV länger und die Schleife kleiner. Die Stabilität der RHDV Haarnadelschleife ist mit $\Delta G = -7,70$ kcal/mol wesentlich höher als die beim FCV.

Davon ausgehend wurden verschiedene Konstrukte mit Mutationen im gepaarten Bereich etabliert. Als Ausgangsplasmid (Wildtyp) diente das Konstrukt pRmRNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. G. Meyers), das auf dem Vektor pBluescript II SK(-) basiert. Es besitzt einen T7-Promotor und kodiert für die subgenomische RHDV RNA. Die Konstrukte wurden in BHK Zellen exprimiert, welche zuvor mit dem Vacciniavirus MVA-T7 infiziert worden waren. Die Normierung erfolgte wie zuvor auf die VP1 Proteinmenge. Alle Konstrukte wurden mindestens dreimal exprimiert und abschließend der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen VP2 Mengen ermittelt. Bei der RHDV Expression von VP1 und VP2 war zu beobachten, dass das VP2 Protein in einem stöchiometrischen Verhältnis von circa 1:5 zum VP1 exprimiert wurde. D.h. eine Reinitiation findet bei RHDV zu etwa 20% statt (Meyers, 2003).

Die *in silico* erhaltenen RNA-Strukturen der Konstrukte sind in Abb. 4.12.B dargestellt. In der Mehrzahl waren die Haarnadelformationen der RHDV Konstrukte stabiler als die der FCV Konstrukte.

Ebenso war festzustellen, dass die freie Energie (ΔG) bei den Konstrukten R1 und R2 im Vergleich zum Wildtyp anstieg (Abb. 4.12.C). Das bedeutete, dass beide Strukturen (Abb. 4.12.B) weniger stabil waren als die des Wildtyps. Die experimentell bestimmten VP2 Mengen waren bei der Mutante R1 reduziert (auf 41%). Im Gegensatz dazu stieg die VP2 Translationsrate beim Konstrukt R2 auf 129% (Abb. 4.12.C). Wie auch beim FCV konnte also keine direkte Korrelation zwischen Struktur und VP2 Expression abgeleitet werden.



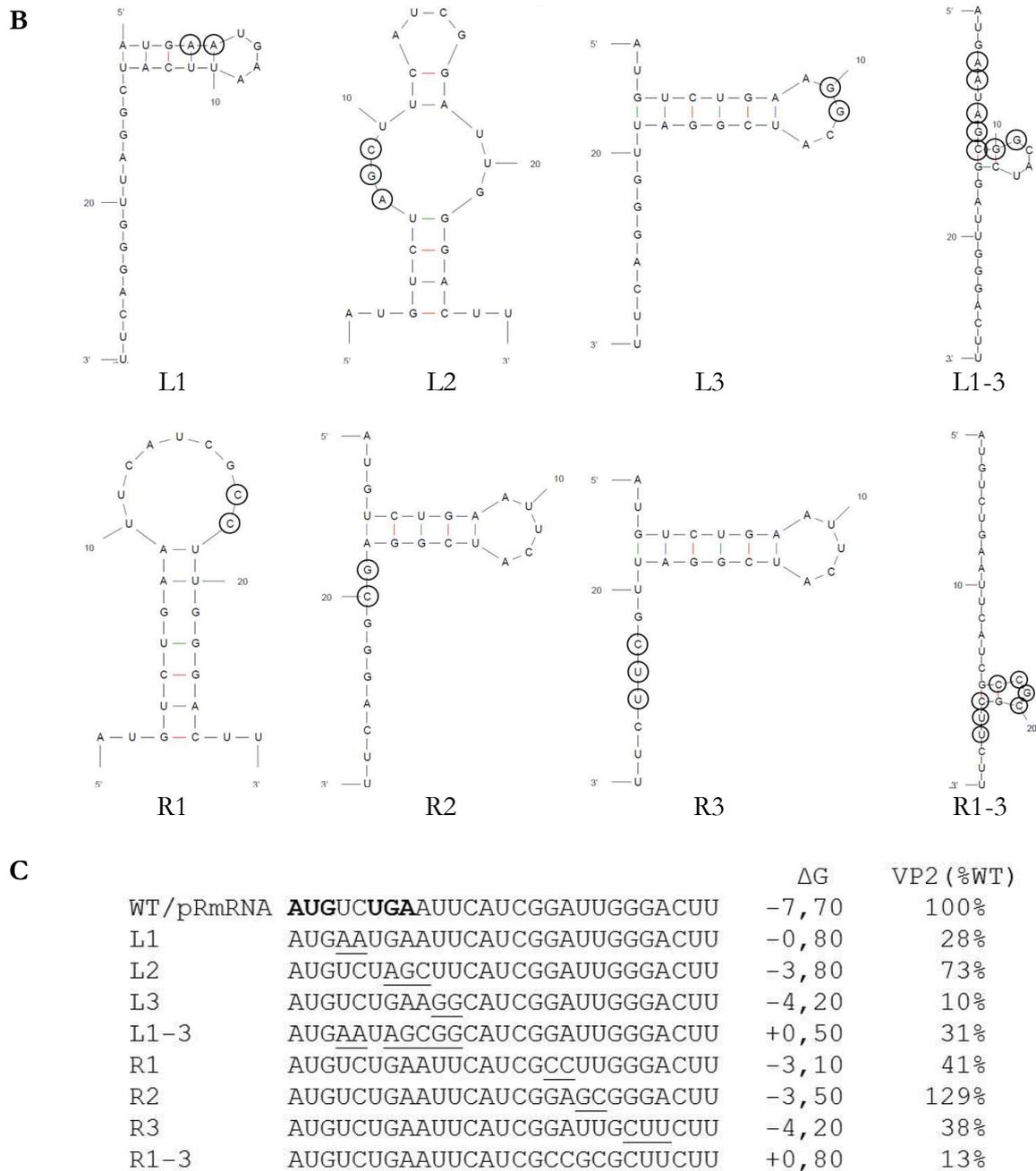


Abb. 4.12: Strukturvorhersage mittels *mfold*

(A) RNA-Struktur des Wildtypkonstrukts pRmRNA. Start- und Stoppkodon sind gekennzeichnet. (B) RNA-Strukturen von ausgewählten mutierten Konstrukten. Die zugehörigen Mutationen sind jeweils umrandet. (C) RNA-Sequenzen zu den in (A) und (B) gezeigten Strukturen mit dazugehöriger Änderung der freien Energie (ΔG) (Ausgabe durch *mfold*) und der VP2 Expression (normiert auf die VP1 Translation, bezogen auf den Wildtyp pRmRNA). In der Wildtypsequenz (pRmRNA) sind das Start- und Stoppkodon fett markiert. Mutierte Nukleotide sind unterstrichen.

Ebenso wie für FCV wurden für die RHDV Konstrukte die Strukturen der VP2 kodierenden Sequenz von Nukleotid 13 bis 52 *in silico* ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass sich in diesem Bereich der VP2 kodierenden Sequenz bei allen acht Konstrukten wie beim FCV eine Haarnadelschleife bildete, welche aufgrund der Werte für die Änderung der freien Energie relativ stabil war ($\Delta G < -8,00$). Eine Verbindung zwischen Struktur und VP2 Expression war aber erneut nicht erkennbar (Daten nicht gezeigt).

4.1.7.2 Bedeutung der Abstandssequenz zwischen Motiv 2 und der Start/Stoppstelle

Wie bereits zuvor gezeigt wurde, hat die Sequenz des Bereichs zwischen TURBS Motiv 2 und der Start/Stoppstelle keinen Einfluss auf die VP2 Expression, wohingegen die Länge des Spacers durchaus entscheidend ist, da Deletionen die VP2 Menge drastisch herabsetzten.

Um zu untersuchen, ob weitere Parameter eine Rolle spielen, wurden Konstrukte hergestellt, in denen der Spacer durch zusätzliche Sequenzen verlängert wurde (Abb. 4.13.A). Unter anderem wurde in einem Konstrukt (pMH10) zusammen mit der verlängerten Sequenz ein weiteres Startkodon eingefügt, so dass der kritische Abstand zwischen Motiv 2 und dem Translationsstart für das VP2 erhalten blieb, wenn die Translation am ersten Startkodon beginnen würde.

Die transiente Expression in BHK Zellen zeigte, dass die Insertion von neun Nukleotiden zwischen Motiv 2 und der Start/Stoppstelle (pMH8) zu einer Reduktion der VP2 Expression auf 10% des Wildtyplevels führte (Abb. 4.13.B). Der Einfluss einer sechs statt neun Nukleotide langen Insertion (pMH9) war weniger stark, aber immer noch signifikant (Abnahme auf 62%). Interessanterweise konnte die Einführung eines alternativen Startkodons im Wildtypabstand zum Motiv 2 kombiniert mit der sechs Nukleotid langen Insertion (pMH10) das Wildtyp VP2 Expressionslevel nicht wiederherstellen. Die VP2 Expression verringerte sich sogar weiter als im Konstrukt pMH9 auf 55%.

Diese Daten zeigten, dass nicht ausschließlich der Abstand zwischen Motiv 2 und dem Startkodon entscheidend für die Reinitiation ist. Vorausgehende Untersuchungen beim RHDV (Meyers, 2007) und analoge Experimente für FCV (Luttermann und Meyers, 2007) bestätigten dieses Ergebnis. Da die Position des Stoppkodons flexibel ist, muss es auch für RHDV weitere Parameter neben dem Abstand zwischen Motiv 2 und der Start/Stoppstelle geben, die den Startpunkt für die Reinitiation definieren.

A	WT/pRmRNA	-CTGGGGGGCACAG	CCAATG	GCTTTTCTTATGTCTGAATTCATCGGATTGGGACTT	100%
	pMH8	-CTGGGGGGCACAGGCCGCCGCCCAATG		GCTTTTCTTATGTCTGAATTCATCGGATTGGGACTT	10%
	pMH9	-CTGGGGGGCACAG	CCAATGGCAGCAGCTTTTCTTATGTCTGAATTCATCGGATTGGGACTT		62%
	pMH10	-CTGGGGGGCACAG	CCAATGGCAGCAGCTATGCTTATGTCTGAATTCATCGGATTGGGACTT		55%

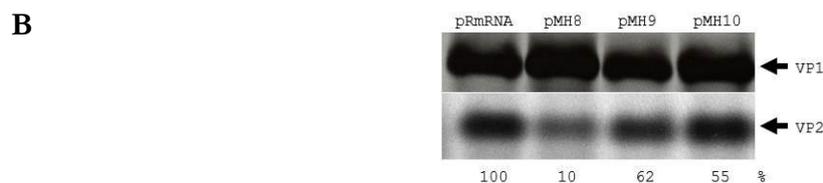


Abb. 4.13: Insertionen zwischen Motiv 2 und dem Start/Stoppbereich beim RHDV

(A) Übersicht über die Position der eingefügten Veränderungen in der Plasmidsequenz. Veränderte Nukleotide sind unterstrichen. In der Wildtypsequenz (pRmRNA) sind das Motiv 2 sowie das Start- und Stoppkodon fett markiert.
(B) Detektion der immunpräzipitierten Kapsidproteine VP1 und VP2 nach Transfektion der in (A) beschriebenen Konstrukte in Vacciniavirus MVA-T7 infizierten BHK Zellen und anschließender radioaktiver Markierung mit [³⁵S]-Methionin.

4.2 Einfluss verschiedener Translationsinitiationsfaktoren auf die Translationsreinitiation des FCV

Alternative Mechanismen der Translationsinitiation erfordern oft nur einen Teil der üblichen Translationsinitiationsfaktoren. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte deshalb analysiert werden, welche Faktoren für die Reinitiation notwendig sind.

Die Methode der Wahl war, einzelne Translationsinitiationsfaktoren im zellulären System durch RNA-Interferenz (RNAi) auszuschalten und die Auswirkung dieser Manipulation auf die Reinitiation zu untersuchen. Als Grundlage diente die Arbeit von Edgil *et al.* (2006), die beschreibt, wie die intrazelluläre Konzentration des Translationsinitiationsfaktors eIF4E erfolgreich mittels siRNA herabgesetzt wurde. Bei den Analysen der vorliegenden Arbeit wurde eIF4E daher als bekannte Kontrolle genutzt. Zusammen mit drei weiteren Translationsinitiationsfaktoren sollte dieser Faktor ebenfalls mittels shRNA herunterreguliert werden. Zusätzlich ausgewählt wurden die Translationsinitiationsfaktoren eIF5B, eIF5 und eIF5A. EIF5B ist für die Bindung der großen ribosomalen 60S Untereinheit an die 40S Untereinheit verantwortlich. Die Frage nach der Abhängigkeit der Reinitiation von eIF5B beinhaltete die Kernfrage, ob nach erfolgreicher VP1 Translation die große ribosomale Untereinheit dissoziiert und unter Mithilfe von eIF5B wieder neu binden muss, um ein funktionell intaktes Ribosom für die VP2 Translation zu erhalten. Daneben wurde der Translationsinitiationsfaktor eIF5 als aktivierender Faktor der GTPase eIF2 – und damit unabdingbar für die GTP-Spaltung im Zuge der Translationsinitiation – ausgesucht. Als vierter Faktor sollte eIF5A betrachtet werden, da über ihn wenig bekannt ist. Er agiert als Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktor und ist der einzige Initiationsfaktor, der mehr frei als Ribosomen-assoziiert vorliegt.

Diese vier Translationsinitiationsfaktoren (eIF4E, 5A, 5, 5B) sollten durch RNAi ausgeschaltet und anschließend beobachtet werden, inwieweit die VP2 Expression beeinflusst wird.

4.2.1 Si- und shRNA Design

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine heute gängige Methode zur transienten Abschaltung von Genen. Sie wird durch unterschiedliche RNA Moleküle wie siRNA (*small interfering RNA*), shRNA (*short hairpin RNA*) oder miRNA (*micro RNA*) ausgelöst. Diesen verschiedenen RNA Molekülen liegt allen der gleiche RNAi-Mechanismus zugrunde (Abschnitt 1.4).

ShRNAs werden in der Zelle ausgehend von Plasmiden oder bakteriellen bzw. viralen Vektoren synthetisiert. Sie bestehen aus zwei invers komplementären Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*), die durch eine kurze Abstandssequenz getrennt sind und mit einer Reihe von Thyminen als Transkriptionsterminationssignal enden (Abb. 4.14.A).

Für das Design von siRNA gibt es verschiedene Regeln, die wichtigsten wurden von Tuschl (Elbashir *et al.*, 2001) und Reynolds (Reynolds *et al.*, 2004) aufgestellt. Zusammenfassend sollte die 23 Nukleotide lange siRNA wie folgt aufgebaut sein: Das optimale siRNA Motiv in der kodierenden DNA Sequenz ist 5'-AA(N19)TT-3', wobei N für die zur Zielsequenz komplementären Basen steht. Der G/C-Gehalt sollte niedrig sein und zwischen 30-50% betragen. Fehlpaarungen sind zu vermeiden, wobei sie am Rand eher toleriert werden als in der Mitte der siRNA. Innerhalb der siRNA sollen keine Sequenzhomologien sowie *inverted repeats* auftauchen, um interne Haarnadelschleifen zu vermeiden. Dazu sind vier Uracile, die ein Terminationssignal für die RNA-Polymerase III darstellen, sowie sieben Guanine oder Cytosine in einer Reihe zu umgehen. Zu beachten und zu meiden sind Zielsequenzen mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), das heißt erfolgreiche Punktmutationen, die sich zu einem gewissen Grad im Genpool einer Population durchgesetzt haben. Die siRNA sollte weiterhin nicht in der nicht-translatierten Region (NTR) eines Gens binden, um eine Störung der Hybridisierung durch Bindeproteine der NTR zu verhindern. Vorteilhaft ist eine geringe interne Stabilität am 3'-Ende des hybridisierten sense-Stranges und eine hohe interne

Stabilität am 5'-Ende des hybridisierten sense-Stranges, welche durch den Adenin/Uracil-Gehalt ermittelt werden. An bestimmten Nukleotidpositionen gibt es laut Reynolds bevorzugte Basen (Position 3 → Adenin, Position 10 → Uracil, Position 13 → kein Guanin, Position 19 → Adenin oder Uracil). In welchem Bereich die siRNA an die mRNA eines Genes bindet, ist in erster Linie irrelevant. Positionseffekte sind wahrscheinlich individuell bedingt durch die Sekundärstruktur der mRNA.

Um das Abschalten anderer Gene (*off-target* Effekte) zu verhindern, sollte für die potentielle siRNA immer ein Sequenzabgleich mittels BLAST (*basic local alignment search tool*) gemacht werden, so dass siRNAs mit Homologien zu anderen Genen ausgeschlossen werden können.

Sowohl für die Kriterien von Tuschl als auch von Reynolds gibt es siRNA Designalgorithmen. Daneben existieren vielfältige Bewertungsalgorithmen (*scoring algorithms*), die die oben aufgeführten Designregeln unterschiedlich gewichten (unter anderem Reynolds, Ui-Tei, Hsieh, Takasaki - Ui-Tei *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2004; Takasaki *et al.*, 2004). Zusammenfassend ist die Effizienz einer siRNA also abhängig von einer großen Anzahl an Faktoren wie dem GC-Gehalt, der möglichen Bildung einer internen Haarnadelformation oder der Asymmetrie der Enden. Weitere limitierende Eigenschaften sind die Sekundärstruktur des Zielgens und der siRNA sowie Interaktionsstellen mit Bindungsfaktoren der NTR. Ebenso können eventuell Kreuzhybridisierungen durch Sequenzhomologien zu anderen zellulären mRNAs oder Spleißvarianten Auswirkungen auf den Effekt der siRNA haben.

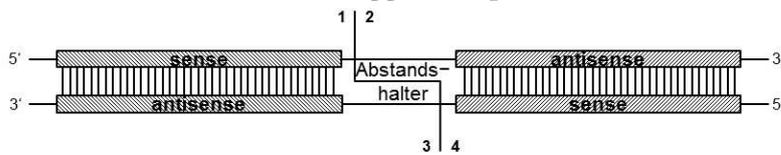
Da auch die shRNA nach der Synthese durch die RNA-Polymerase II oder III und die Prozessierung durch die RNase III „Dicer“ am Ende einzelsträngig wie eine siRNA vorliegt, sind die Regeln zum Design einer siRNA übertragbar auf das Design der shRNA.

Als Abstandshalter bzw. Schleife zwischen den *inverted repeats* der shRNA werden unterschiedliche Sequenzen vorgeschlagen, am häufigsten wird das neun Nukleotide lange Abstandsmotiv 5'-TTCAAGAGA-3' verwendet (Brummelkamp *et al.*, 2002).

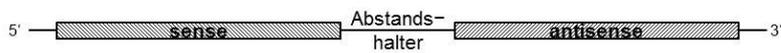
Das genaue Design der shRNAs für die ausgewählten Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, 5A, 5 und 5B erfolgte mit Hilfe von online angebotenen Serviceprogrammen. Die siRNA Designprogramme von Ambion (Tuschl), Dharmacon (Reynolds), Dequor (*Design and Quality Control of (e)siRNAs*, eigenes Regelschema), Emboss (Tuschl), Promega (Kombination verschiedener Regeln) und TROD (T7 RNAi Oligo Designer, Donzé und Picard, 2002) verwenden dafür die jeweils in Klammern angegebenen Regeln.

Ein multipler Sequenzabgleich der Gensequenzen aller vier Translationsinitiationsfaktoren für die Spezies Hausmaus (*mus musculus*), Wanderratte (*rattus norvegicus*), Mensch (*homo sapiens*), Hausrind (*bos taurus*), Haushund (*canis lupus familiaris*) und Hauspferd (*equus caballus*) zeigte eine große Homologie (siehe Anhang), wohingegen die Gensequenzen für das Haushuhn (*gallus gallus*) teilweise stärker abwichen. Für das shRNA Design wurden die Gensequenzen der Hausmaus (*mus musculus*) mit den in Abb. 4.14.B notierten Akzessionsnummern des NCBI verwendet. Aufgrund der gezeigten Homologie wurde darauf verzichtet, die exakte Sequenz dieser Translationsinitiationsfaktoren für den Feldhamster (*Cricetus cricetus*) aus den später verwendeten *baby hamster kidney* Zellen (BHK-Zellen) zu bestimmen. Alle erhaltenen siRNA Vorschläge eines Hilfsprogramms wurden nach ihrer Position innerhalb der Gensequenz sortiert. Es wurden für jeden Faktor die vier am häufigsten vorgeschlagenen Sequenzen ausgewählt und die entsprechende antisense-Sequenz für die shRNA abgeleitet (Abb. 4.14.B). Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Zielsequenzen in möglichst homologen Bereichen des Gens befinden (siehe Anhang) und bei einem Sequenzabgleich mittels BLAST keine homologen Sequenzen in anderen Genen gefunden wurden.

A Plasmid kodierter shRNA-Doppelstrang:



Transkribierte shRNA (= siRNA):



Gefalteter Zustand:



B shRNA Sequenzen

Faktor	Akzessionsnummer	Nukleotidposition der sense-Sequenz innerhalb der kodierenden Gensequenz	sense-Sequenz	antisense-Sequenz
eIF4E	BC010759*	-9*	5'-CGATCTAAGATGGCGACTGTG-3'	5'-CACAGTCGCCATCTTAGATCG-3' 5'-TTTAATATAGTGCTCTGGGT-3' 5'-AGATCAATCGAAGGTTTGCTT-3' 5'-GTCTTCAACAGTATCAAACCT-3'
		88	5'-AACCCAGAGCACTATATAAA-3'	
		170	5'-AAGCAAACCTTCCGATTGATCT-3'	
		193	5'-AAGTTTGATACTGTTGAAGAC-3'	
eIF5A	NM_001166589	115	5'-AAGATCGTCGAGATGTCTACT-3'	5'-AGTAGACATCTCGACGATCCTT-3' 5'-GAGTTGACGGGCAGATATCCTT-3' 5'-ATACTTCTGCTCAATCTCCTT-3' 5'-GCACTGTGATCAGGATCCTT-3'
		209	5'-AAGATATCTGCCGTCAACTC-3'	
		361	5'-AAGGAGATTGACGAGAAGTAT-3'	
		392	5'-AAGAGATCCTGATCACAGTGC-3'	
eIF5	NM_173363	208	5'-AAGAATGACCGTTACATTGTC-3'	5'-GACAAATGTAACGGTCATTCTT-3' 5'-GATTGACATGCAGATCTGTTT-3' 5'-TTTCATCCATTCTGGCCTTT-3' 5'-ACAGGATGTTAACCGCTCTT-3'
		317	5'-AAACAGATCTGCATGTCAATC-3'	
		629	5'-AAAGCGCAGAATGGATGAAA-3'	
		704	5'-AAGAGCGTGTTAACATCCTGT-3'	
eIF5B	NM_198303	526	5'-AAGAACGTTTCGAGAGTAAAC-3'	5'-GTTTACTCTCGAACGTTCTTT-3' 5'-CTGTTTACTCTGCTCCTTCTT-3' 5'-ACTTAGTTAACAGCTTTCCTT-3' 5'-GTCTTTCACACGTAATTCCTT-3'
		790	5'-AAGAAGGAGCAGAGTAAACAG-3'	
		1208	5'-AAGGAAAGCTGTTAACTAAGT-3'	
		2719	5'-AAGGAATTACGTGTGAAGAAC-3'	

* analog zu Edgil et al., 2005

Abb. 4.14: shRNA Design

(A) Schematische Darstellung der shRNA. (B) Überblick über die ausgewählten Translationsinitiationsfaktoren (mit Akzessionsnummer der Gensequenz) und den jeweils vier dazugehörigen sense- bzw. antisense-Sequenzen der shRNA

4.2.2 Vektor

Im Vergleich zur siRNA muss die für die shRNA kodierende DNA-Sequenz in einem Vektor in die Zelle eingebracht werden. In dieser Arbeit wurde dazu ein Plasmid verwendet. Eine Möglichkeit bietet der ebenfalls in Brummelkamp *et al.* (2002) beschriebene und häufig verwendete Vektor pSUPER. Sein konstitutiver (U6) oder induzierbarer (H1) RNA-Polymerase-III-Promotor erlauben die dauerhafte oder kontrollierte Expression von Genen. Alternativ könnte die Expression der inserierten shRNA Sequenzen mit Hilfe des T7-Promotors erfolgen, nachdem die transfizierten Zellen vorab mit dem Vacciniavirus MVA-T7 infiziert wurden. Dadurch würde die Transkription im Zytoplasma stattfinden und 5'- oder 3'-Modifikationen an der mRNA oder shRNA vermieden werden. Die shRNA würde hierbei mit Hilfe der im Vektor enthaltenen Ribozymdomäne des Hepatitis Deltavirus (HDV) am 3'-Ende exakt prozessiert. Für diese Arbeit wurde stattdessen eine ebenso oft genutzte, in BHK-Zellen aktive, murine RNA-Polymerase-I-Transkriptionskassette verwendet, um im Folgenden auch in BHK-Zellen arbeiten zu können. Die shRNA Sequenzen wurden über zwei *BbsI*-Restriktionsendonukleasestellen in das Plasmid pRF42_ASIA (Flick und Pettersson, 2001) inseriert (Abb. 4.15, Abschnitt 2.10.2). Die aus Promotor und Terminator bestehende RNA-Polymerase-I-Transkriptionskassette gewährleistete, dass die Transkripte nicht durch zusätzliche Nukleotide oder Modifikationen wie eine Cap-Struktur am 5'- oder einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende verändert wurden. Die transkribierte und gefaltete shRNA gelangte so ins Zytoplasma, wo sie durch „Dicer“ entsprechend publizierter Daten prozessiert wurde und anschließend als siRNA an die mRNA binden konnte. Dadurch konnte es bei einer perfekten Paarung der siRNA mit der mRNA zu einer Degradation der Ziel-RNA kommen. Eine schlechtere bzw. nur partielle Bindung dagegen führte zu einer Translationshemmung.

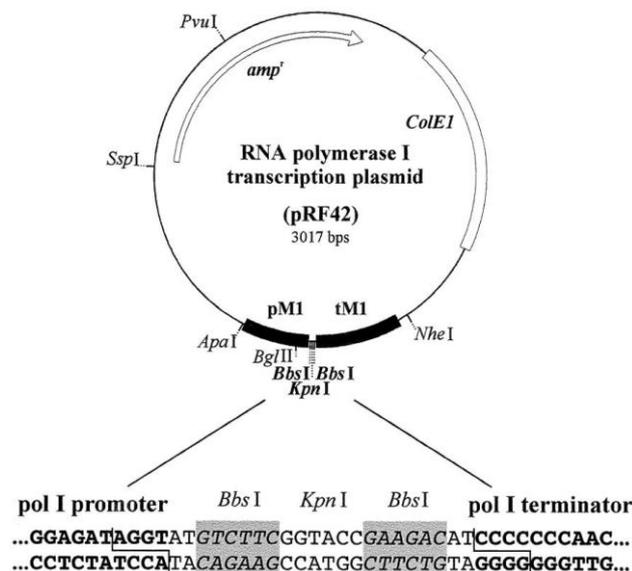


Abb. 4.15: Schematische Übersicht über das RNA-Polymerase-I-Transkriptionsplasmid pRF42 aus Flick und Pettersson (2001)

4.2.3 Etablierung der Vektoren und erste Transfektionsstudien

Die shRNAs wurden aus jeweils vier synthetischen Oligonukleotiden aufgebaut, die von einem kommerziellen Anbieter bezogen wurden (Abschnitt 2.9.3). Diese beinhalteten ein Oligonukleotid für die sense-Sequenz mit einem Teil der Haarnadelschleifensequenz und ein weiteres Oligonukleotid für den Rest der Haarnadelschleifensequenz mit der antisense-Sequenz

sowie den jeweils komplementären Oligonukleotiden (Abb. 4.14.A oben, 1-4). Für die Insertion in den Vektor wurden zuerst Oligonukleotid 1 und 3 sowie Oligonukleotid 2 und 4 am 5'-Ende durch die T4 Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert. Im Folgenden wurden beide Ansätze auf 96°C erhitzt und bei Raumtemperatur für fünf Minuten die Hybridisierung der jeweiligen Oligonukleotide ermöglicht. Danach wurden die Ansätze vereinigt, so dass auch die Bindung über die überhängenden Enden im Bereich des Abstandshalters stattfinden konnte. Am Ende lag ein doppelsträngiges DNA-Fragment vor, welches mit Hilfe seiner BbsI-spezifischen Einzelstrangüberhänge in den ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease BbsI behandelten Vektor pRF42_ASIA inseriert wurde. Zur Kontrolle wurden die erhaltenen Plasmide mit den Sequenzprimern RF100 und RF101 sequenziert. Dies war problematisch, weil es innerhalb des DNA-Einzelstrangs zur Ausbildung einer Haarnadelschleife zwischen sense- und antisense-Sequenz kam. Da die verwendete DNA-Polymerase nur schwer über die Haarnadelformation hinaus lesen konnte, erfolgte ein Abbruch der Neustrangsynthese bei der Sequenzierungs-PCR. Die Zugabe des Salzes (Carboxymethyl)trimethylammonium (*betaine*) während der Sequenzierungs-PCR verringerte die Ausbildung von Basenpaaren und Sekundärstrukturen und ließ eine Sequenzierung des Plasmids über das inserierte Fragment zu (Haqji *et al.*, 2002 und Luo *et al.*, 2007).

Entscheidend für eine effektive Herabsetzung der Translation eines Gens durch RNA-Interferenz ist eine hohe Transfektionsrate der für die Interferenz verantwortlichen Nukleinsäure. Der Transfektion der shRNA gingen deshalb verschiedene Studien voraus, bei denen sowohl unterschiedliche Transfektionsmethoden als auch Zelllinien getestet wurden. Mittels Immunfluoreszenz wurde die Transfektionseffizienz bei Einsatz von Superfect, Lipofektamin 2000, FuGene, Kalziumphosphat (CaPO₄) sowie der Elektroporation (EP) und Nucleofection untersucht. Dazu wurden die zu testenden Zellen in kleinen Zellkulturschalen ausgesät und mit einem GFP kodierenden Plasmid (PK13) auf unterschiedliche Weise transfiziert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, indem die mittlere Anzahl positiver Zellen aus fünf Bildausschnitten ermittelt wurde.

Nucleofection ist eine abgewandelte Form der Elektroporation. Beide zählen zu den physikalischen Verfahren der Transfektion. Da die Zellen bei dieser Methode im Regelfall nicht adhärent vorliegen dürfen, ist ein je nach Zelltyp mehr oder weniger hoher Zellverlust nach Elektroporation einzukalkulieren. Bei Superfect, Lipofektamin 2000 oder FuGene erfolgt die Transfektion durch Lipofektion, das heißt, die DNA wird in Vesikeln, den sogenannten Liposomen, eingeschlossen oder an diese angelagert. Durch die anschließende Verschmelzung dieser Vesikel mit der Zellmembran gelangt die DNA in die Zelle.

Durch CaPO₄ konnten auf chemischem Weg keine Zellen transfiziert werden. Für die Elektroporation und das Transfektionsreagenz FuGene wurden in BHK-Zellen Transfektionseffizienzen von etwa 4% bzw. 5% beobachtet. Für das Transfektionsmittel Superfect lag die Transfektionsrate bei rund 15%. Während bei Transfektion mit Lipofektamin 2000 circa 53% der Zellen das Plasmid aufnahmen, schwankte die Effizienz der Transfektion via Nucleofection zwischen 35% und 70%.

In einem weiteren Ansatz wurde die Transfektionsrate zwischen Vacciniavirus MVA-T7 infizierten BHK-Zellen und nicht infizierten BHK T7/5-Zellen 24 und 48 Stunden nach Transfektion mit Lipofektamin 2000 durch Messung im sensitiveren Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorting, FACS*) verglichen. BHK T7/5-Zellen sind Zellen, die die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 stabil exprimieren, wodurch eine Infektion mit Vacciniaviren umgangen werden kann. Nach 24 Stunden waren etwa 74% der BHK T7/5-Zellen transfiziert. Im Vergleich dazu lag die Transfektionsrate bei den mit Vacciniavirus MVA-T7 infizierten BHK-Zellen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden mit 91% bzw. 77% höher.

Nach sorgfältiger Auswertung aller Transfektionsversuche ergab sich, dass Lipofektamin 2000 und eine vorausgegangene Vacciniavirus MVA-T7 Infektion am besten geeignet waren, um in BHK-Zellen eine hohe Transfektionseffizienz zu erzielen. Auf die Auswahl der verwendeten Zelllinie wird im Abschnitt 4.2.6 genauer eingegangen.

4.2.4 Spezifische Reduktion der mRNA Mengen nach shRNA Transfektion

Die Effizienz der Interferenz mittels shRNA ist durch eine Vielzahl von Kriterien begrenzt. Faktoren, die die Sequenz der shRNA betreffen, wie die Umsetzung von Basenpräferenzen der shRNA sowie Spezies spezifische Abweichungen der Zielsequenz von der Sequenz der shRNA spielen eine Rolle. Zudem können die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die die Hybridisierung verhindern, und *off-target* Bindungen (Kreuzhybridisierungen) das Ausmaß der RNA-Interferenz beeinflussen. Weitere limitierende Faktoren sind die Transfektionsrate der shRNA, das Expressionslevel des Zielgens und die Stabilität der shRNA in der Zelle. Eine möglicherweise erfolgende Aktivierung der Interferon (IFN)-Antwort der transfizierten Zelle führt zur Degradation der shRNA.

Um die Funktionalität der in dieser Arbeit entworfenen shRNAs zu überprüfen, wurde zunächst das RNA-Level nach Transfektion im *Northern Blot* bestimmt. Dazu wurde ein Mix aus jeweils 1µg aller vier gegen einen Translationsinitiationsfaktor gerichteten shRNA Plasmide mittels Lipofektamin 2000 in BHK-Zellen in einer kleinen Zellkulturschale (Ø3,5cm) transfiziert. Das Zusammenbringen von mehreren shRNAs erhöht zwar die Gefahr von *off-target* Effekten, aber gleichzeitig steigt die Wahrscheinlichkeit einer effektiven posttranskriptionellen Genblockade. Zur Kontrolle wurden je 4µg des Leervektors pRF42_ASIA oder eines Kontrollkonstrukts pEGFP-N3 transfiziert. Der Kontrollvektor pEGFP-N3 kodiert für ein grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein, GFP*) EGFP mit nach Rot verschobenem Absorptionsmaximum hinter einem frühen Promotor (*immediate early promoter*) des humanen Cytomegalievirus (CMV). Nach 48 Stunden waren im Lichtmikroskop in den Gewebekulturschalen, die mit den shRNA Plasmiden transfiziert worden waren, mehr tote Zellen zu erkennen als in den Kontrollschälchen. RNA wurde mit TriFast aus den transfizierten Zellen isoliert und eine definierte Menge auf ein circa 1%iges RNA-Agarosegel geladen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Acridinorange gefärbt und im UV Durchlicht analysiert (Abb. 4.16.B). Danach wurde die RNA über Nacht im *Northern Blot* auf eine Nylonmembran übertragen. Diese wurde am folgenden Tag im Trockenschrank getrocknet. Zur Herstellung der cDNA-Sonden wurde Gesamt-RNA aus BHK-Zellen präpariert. Durch eine reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) wurden kurze DNA-Fragmente gewonnen, die einen Teil der für den jeweiligen Translationsinitiationsfaktor kodierenden Region (*coding sequence, CDS*) umfassten (Abschnitt 2.9.2). Die cDNA wurde aufgereinigt und die Größe der DNA-Stücke im 1%igen Agarosegel überprüft (Abb. 4.16.A). Außerdem wurden die cDNA-Fragmente mit beiden bereits für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotiden sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit der *NCBI* Datenbank abgeglichen und konnte wieder auf die entsprechenden Translationsinitiationsfaktoren zurückgeführt werden. Die radioaktiv markierten Sonden wurden durch eine PCR mit radioaktivem [³²P]-dCTP und den PCR-Fragmenten als Ausgangs-DNA hergestellt und nach Aufreinigung mit der Nylonmembran über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran gewaschen und luftgetrocknet. Die Auswertung erfolgte autoradiographisch.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.16.C dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das Level der für die fraglichen Translationsinitiationsfaktoren kodierenden mRNA nach Transfektion des jeweiligen shRNA Plasmid Mixes deutlich sank. Die Größe der durch die [³²P]-markierten DNA-Sonden detektierten mRNA Banden betrug wie erwartet circa 1650bp für eIF4E, 1450bp für eIF5A, 4000bp für eIF5 und 4200bp für eIF5B. In der ersten Reihe ist die mRNA des eIF4E Gens gezeigt. In der dritten Spur ist das mRNA-Level reduziert im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor pEGFP, dem Ursprungsvektor pRF42_ASIA oder mit anderen shRNA Plasmiden transfizierten Zellen. Analog verhält es sich bei den folgenden Reihen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des [³²P] sind zur besseren Veranschaulichung für den Translationsinitiationsfaktor eIF5 in der Abb. 4.16.C zwei verschiedene Expositionszeiten dargestellt. Aus selbigem Grund sind auch die Banden für die eIF4E mRNA in den Spuren vier und sechs (anders als auf dem Originalfilm) nur schlecht erkennbar.

In allen Fällen war die mRNA Menge nach Transfektion des jeweils passenden Konstrukt Mixes niedriger als bei den Kontrollen.

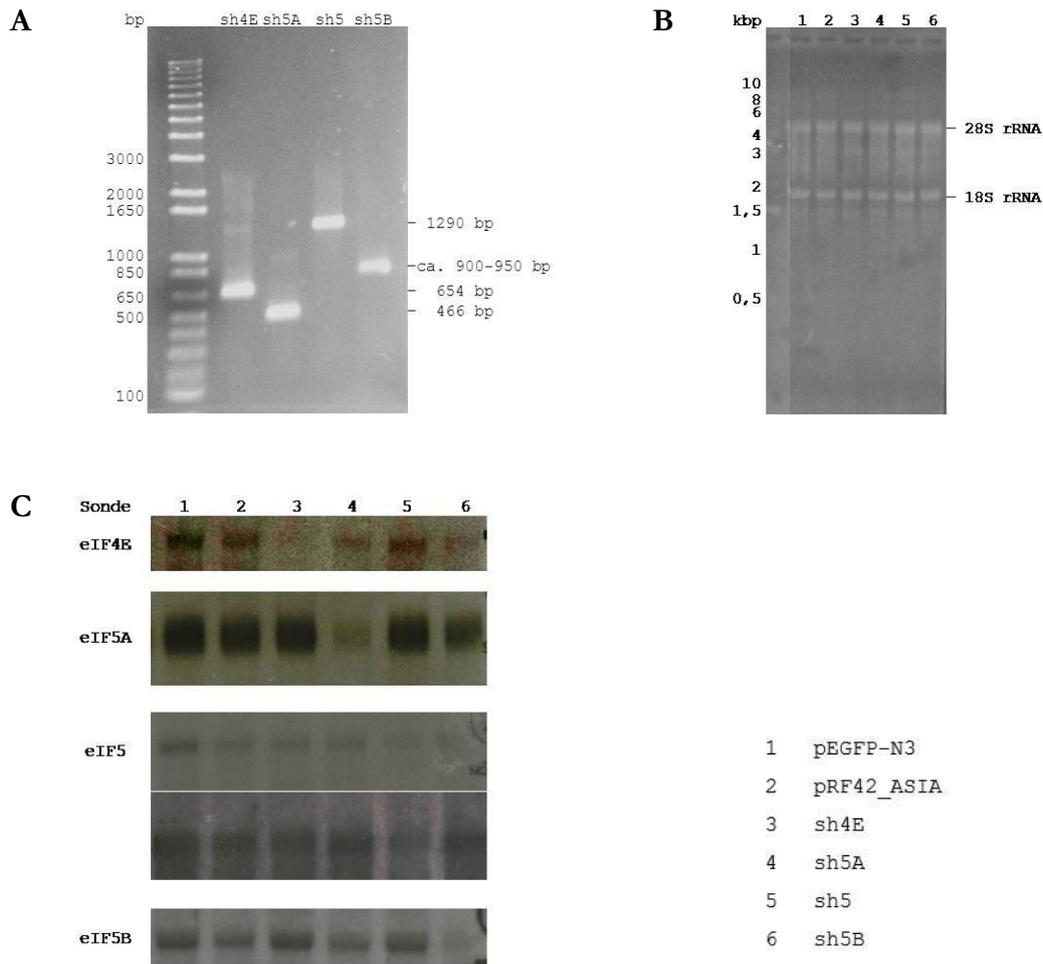


Abb. 4.16: Spezifische Reduktion der mRNA Mengen nach shRNA Transfektion

(A) 1%iges Agarose-Kontrollgel mit den RT-PCR Fragmenten für die DNA-Sonden. (B) 1%iges RNA-Agarosegel mit aufgereinigter RNA aus mit für (1) pEGFP, (2) pRF42_ASIA, (3) sh4E, (4) sh5A, (5) sh5 und (6) sh5B kodierenden Plasmiden transfizierten Zellen. (C) Northern Blots nach Hybridisierung mit den jeweils links vom Gel spezifizierten eIF-DNA-Sonden und autoradiographischer Detektion der Banden. Die erhaltene Größe der Banden der mRNA ist in etwa wie erwartet: eIF4E (1650bp), eIF5A (1450bp), eIF5 (4000bp) und eIF5B (4200bp).

4.2.5 Überprüfung der Proteinmenge nach RNA-Interferenz

Im Anschluss sollte gezeigt werden, dass nicht nur die Menge der mRNA, sondern auch die der Translationsinitiationsfaktoren nach Transfektion der shRNA Plasmide in BHK-Zellen sank.

Aufgrund der vermutlich langen Halbwertszeit der Translationsinitiationsfaktoren war trotz einer vollkommenen Paarung der siRNA mit der mRNA der jeweiligen Translationsinitiationsfaktoren nur eine Verminderung der Proteinbiosynthese zu erwarten.

Dazu wurden wie in Abschnitt 4.2.3 BHK-Zellen in einer kleinen Zellkulturschale ($\varnothing 3,5\text{cm}$) mit je $4\mu\text{g}$ Plasmid-DNA mittels Lipofektamin 2000 transfiziert. Für die RNA-Interferenz wurde je Translationsinitiationsfaktor ein Mix aus den vier verschiedenen shRNA Plasmiden verwendet, wobei von jedem Konstrukt $1\mu\text{g}$ eingesetzt wurde. Als Kontrolle diente hier ebenso der Leervektor pRF42_ASIA. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in 6x Laemmli-Puffer aufgenommen. Dieser enthielt bereits Natriumdodecylsulfat (SDS) um die Zellmembran zu zerstören und die Proteine zu denaturieren. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine und Auflösung von Aggregaten wurde das Zellysats erhitzt und mit Ultraschall behandelt und dann bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

In der SDS-PAGE wurde jeweils eine definierte Menge des Zellysats aufgetragen. Danach wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im *Western Blot* auf eine Nylonmembran übertragen und diese über Nacht mit spezifischen Antisera gegen die Translationsinitiationsfaktoren und einem Antikörper gegen Aktin zur Normierung inkubiert. Als Sekundäntikörper wurde ein mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppeltes Anti-Kaninchenserum verwendet. Nach Inkubation des Immunblots mit dem Substrat Luminol konnten die Proteine durch Chemolumineszenz detektiert werden.

Für die Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF5A und eIF5 wurde sowohl die Proteinabnahme über die Zeit qualitativ verfolgt (Abb. 4.17.A-C), als auch die Reduktion nach 48 Stunden quantitativ ermittelt. Als Bezugswert diente das 42kDa große zelluläre Strukturprotein Aktin (Abb. 4.17.E-G). Die Proteinmenge betrug nach 48 Stunden für eIF4E (25-30kDa) 56% ($\pm 63\%$), für eIF5A (18kDa) 28% ($\pm 35\%$) und für eIF5 (50-55kDa) noch 55% ($\pm 26\%$) des Wertes in Zellen, die mit dem pRF42_ASIA Kontrollplasmid transfiziert worden waren.

Auffallend war, dass auch beim Kontrollplasmid pRF42_ASIA die Menge des jeweiligen Translationsinitiationsfaktors im Vergleich zu 24 Stunden nach 48 Stunden verringert zu sein schien (Abb. 4.17.A-D). Weiterhin beeinflusste die deutlich stärkere Bande für eIF4E im dritten Experiment in Abb. 4.17.E den berechneten Mittelwert und ebenso die Standardabweichung. Die mit der Kontrollspur vergleichbare Menge an eIF4E deutet auf einen technischen Fehler in diesem Teil des Experiments hin. Wurde dieser abweichende Wert vernachlässigt und nur die ersten beiden Versuche zugrunde gelegt, so ergab sich eine Reduktion der eIF4E Proteinmenge auf 20% ($\pm 11\%$). Die Kontrollmenge an Aktin war in Abb. 4.17.F für das erste und dritte Experiment nur sehr gering.

Für den Translationsinitiationsfaktor eIF5B gelang der Western Blot wegen technischer Probleme aufgrund der Größe des Proteins von über 130kDa nur mäßig (Abb. 4.17.D).

Die Beobachtung der Abnahme über die Zeit zeigte, dass nach 56 Stunden noch weniger Protein vorhanden war. Im nächsten Schritt sollte die Auswirkung der RNA-Interferenz auf die Translation der FCV Kapsidproteine untersucht werden. Dazu mussten die Zellen noch einem weiteren Transfektionsschritt unterzogen werden, in dem ein für die FCV Proteine kodierendes Plasmid transfiziert wurde. Dieser zusätzliche Schritt bedeutete erneuten Stress für die Zellen. Nach 56 Stunden lieferten die Zellen in diesen Versuchen keine verwendbaren Ergebnisse mehr, weshalb die Inkubationsdauer auf 48 Stunden beschränkt wurde.

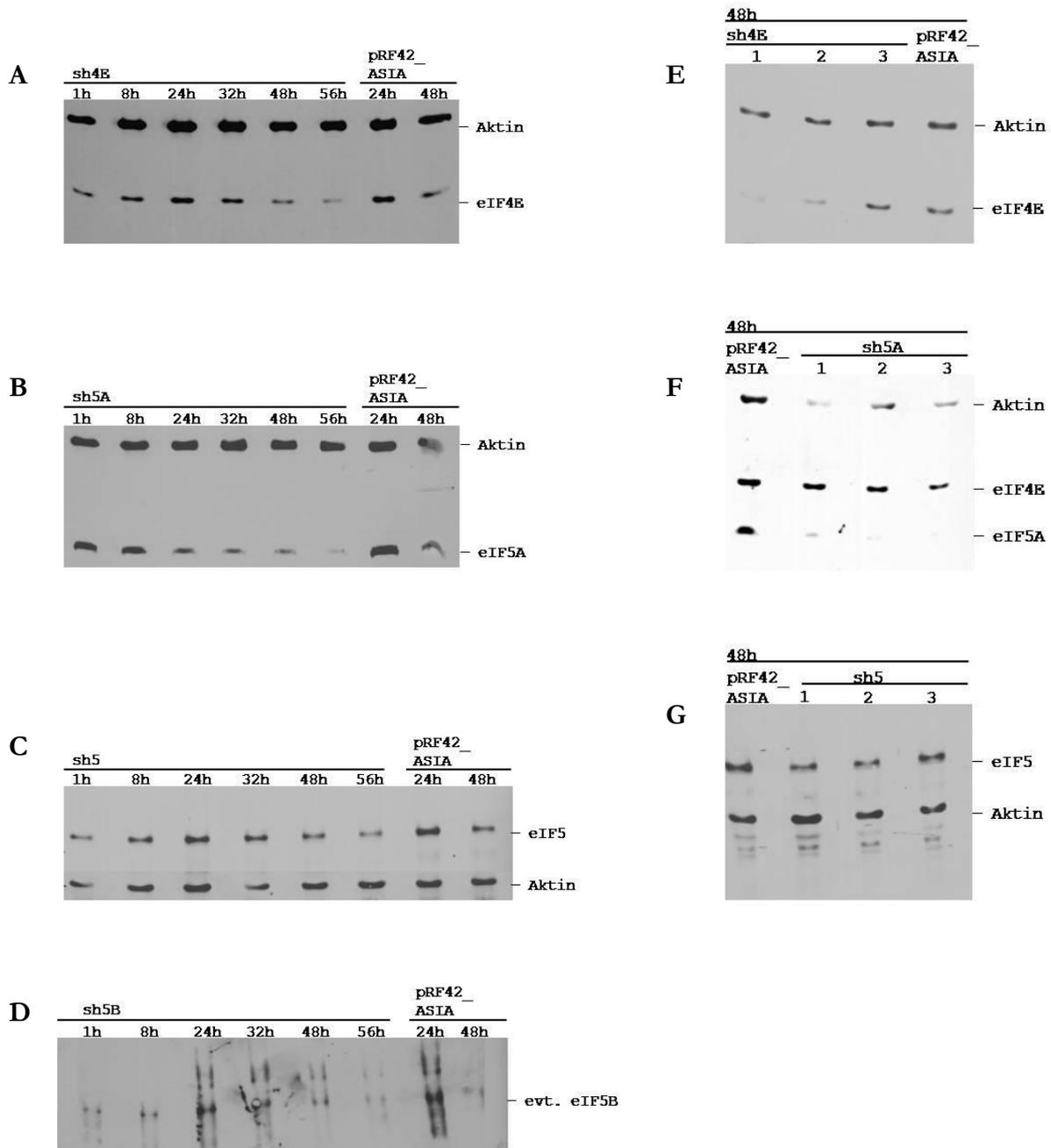


Abb. 4.17: Kinetik der Abnahme der Proteinmengen der einzelnen Translationsinitiationsfaktoren nach shRNA Plasmid Transfektion und Quantifizierung der Reduktion nach 48 Stunden

(A-D) Immunblots nach SDS-PAGE mit Antikörpern gegen (A) eIF4E (25-30 kDa), (B) eIF5A (18kDa), (C) eIF5 (50-55kDa) und (D) eIF5B (errechnetes MW: 139kDa, beschriebenes MW: 175kDa) sowie Aktin (42kDa). Aufgetragen wurden jeweils Zellextrakte, die zu den oberhalb der Gelbilder angegebenen Zeitpunkten nach Transfektion gewonnen wurden. (E-G) Western Blot zur Quantifizierung der jeweiligen Proteinmenge nach dreimaliger Transfektion des entsprechenden shRNA Plasmid Mixes. Normierung auf das zelluläre Strukturprotein Aktin. In (F) wurden, neben dem α -Aktin Antikörper, Antikörper gegen sowohl eIF4E als auch eIF5A verwendet.

In der Folge sollte entsprechend den publizierten Daten für eIF4E (Edgil *et al.*, 2006) untersucht werden, ob die Gesamtproteinexpression der Zelle nach 48 Stunden aufgrund der reduzierten Menge an Translationsinitiationsfaktoren ebenfalls abnimmt. Dazu wurden wie zuvor BHK-Zellen mit den verschiedenen shRNA Plasmid Mischungen transfiziert und nach 48 Stunden die neu synthetisierten Proteine mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin markiert. Die Markierung erfolgte über einen Zeitraum von 30 Minuten. Von den danach aufgereinigten Gesamtproteinen (Abschnitt 3.4.1) wurden jeweils 5µl auf ein 10%iges SDS-Gel geladen und aufgetrennt. Bezogen auf die mit dem Leervektor pRF42_ASIA transfizierten Zellen (100% ±6%), zeigte die autoradiographische Detektion im Mittel eine Abnahme der markierten Gesamtproteine auf 87% (±13%) für den Faktor eIF4E, 63% (±9%) bei eIF5A, 76% (±1%) für eIF5 und auf 74% (±4%) für eIF5B (Abb. 4.18). Eine Reduktion der Proteinsyntheserate durch RNA-Interferenz für eIF4E um 60%, wie bei Edgil *et al.* (2006) beschrieben, konnte in keiner Phase des Versuchs erreicht werden. Obgleich eine der vier verwendeten shRNAs gegen eIF4E einschließlich dem Vektorrückgrat der in der oben genannten Publikation beschriebenen shRNA entsprach, wurde dieser starke Einfluss auf die zelluläre Proteinsynthese weder bei Transfektion der einzelnen shRNA Plasmide, noch bei Transfektion des Plasmid Mixes erzielt.

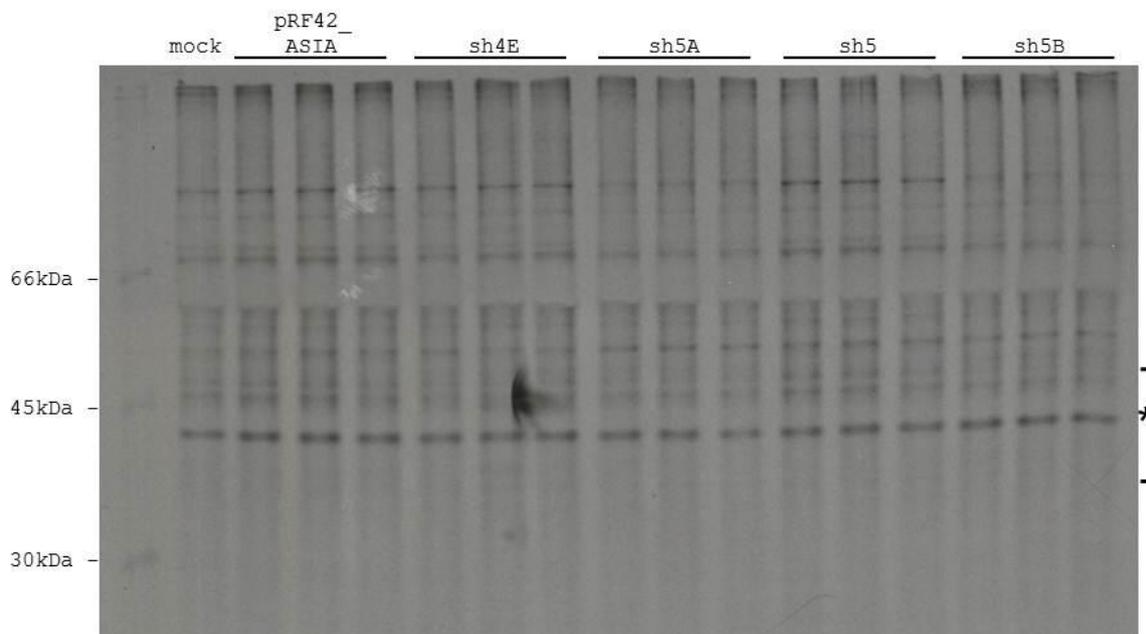


Abb. 4.18: Gesamtproteinanalyse nach shRNA Plasmid Transfektion

Nach shRNA Plasmid Transfektion und 30minütiger Markierung mit [³⁵S]-Methionin beginnend 48 Stunden nach der Transfektion wurden im 10%igen SDS-Gel je 5µl aufgereinigtes Gesamtprotein aufgetrennt. Die Quantifizierung der Gesamtproteine von je drei unabhängigen Ansätzen erfolgte durch Messung der Radioaktivitätsmenge im markierten Bereich (*).

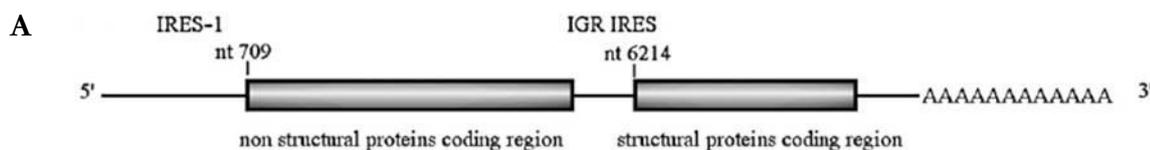
4.2.6 Etablierung eines geeigneten Testsystems - Parameterwahl (Konstrukte, Zellen und andere)

Nachdem die Funktionalität der shRNA Konstrukte gezeigt worden war, sollten trotz der nur kleinen Effekte auf die Gesamtproteinsynthese die Auswirkungen der herabgesetzten Verfügbarkeit der Translationsinitiationsfaktoren auf die VP2 Expression untersucht werden. Davor galt es ein geeignetes Testsystem zu entwickeln und verschiedene Faktoren zu optimieren. Die VP2 Expression ist direkt von der Translation des VP1 Proteins abhängig, da die Translation des stromauf gelegenen VP1 kodierenden Leserasters die Ribosomen an die Start/Stopstelle heranführt, wodurch die Voraussetzung für die Reinitiation geschaffen wird. Um die Abhängigkeit der Reinitiation von den zu testenden Translationsinitiationsfaktoren untersuchen zu können, musste die VP1 Translation unabhängig von dem zu analysierenden Faktor erfolgen. Als Ausgangskonstrukt diente deshalb erneut das Plasmid pCH1 (Abschnitt 2.10.2). Wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, besaß dieses einen T7-Promotor und die IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV). Ausgehend von diesem Konstrukt konnte eine RNA transkribiert werden, die ab dem Startkodon für das VP1 der subgenomischen mRNA des FCV entsprach. Die EMCV-IRES ist unabhängig vom Translationsinitiationsfaktor eIF4E sowie dem N-Terminus von eIF4G (Balvay *et al.*, 2009) und sorgt für eine hohe Translationseffizienz (Bochkov und Palmenberg, 2006). Die 40S Untereinheit des Ribosoms wird durch die IRES während der Translationsinitiation direkt am AUG oder in dessen Nähe positioniert, so dass kein Absuchen nach dem Startkodon (*scanning*) erfolgte. Da die EMCV-IRES außer eIF4E alle Translationsinitiationsfaktoren für einen erfolgreichen Translationsstart benötigt, konnte das Konstrukt pCH1 ausschließlich zur Untersuchung der Bedeutung des Faktors eIF4E für die Reinitiation verwendet werden.

Als Kontrolle für eine Cap-abhängige Translation wurde das Konstrukt pCH1 Δ EMCV5 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Luttermann) genutzt (Abb. 4.20.A). Die Translation war hier Cap-abhängig, da die EMCV-IRES im Vergleich zu pCH1 deletiert ist.

Für die Analysen der anderen zu untersuchenden Faktoren wurde die IRES der *intergenic region* (IGR) des *Cricket paralysis virus* (CrPV) verwendet (Wilson *et al.*, 2000; Abb. 4.19.A-C). Diese initiiert unabhängig von allen Translationsinitiationsfaktoren und der Methionin beladenen Initiator tRNA^{Met}, das heißt die Anlagerung eines vollständigen Ribosoms erfolgt direkt an die IGR IRES.

Die Transkription der IGR-IRES enthaltenen mRNA wurde zunächst im *Northern Blot* überprüft. Die Konstrukte pYRL und pYRL_IGR kodierten in einem pYES-basierten Vektor für die Renilla-Luziferase mit oder ohne stromauf gelegener IGR-IRES. Die Transkription erfolgte unter Kontrolle eines T7-Promotors. Abb. 4.19.D zeigt, dass nach Infektion mit Vacciniavirus MVA-T7 und Transfektion der Plasmide in BHK-Zellen mRNA transkribiert wird. Durch die IGR-IRES Sequenz war diese RNA um 200 Nukleotide größer. Interessanterweise schien das mRNA-Level mit IGR-IRES deutlich größer zu sein als ohne diese Sequenz.



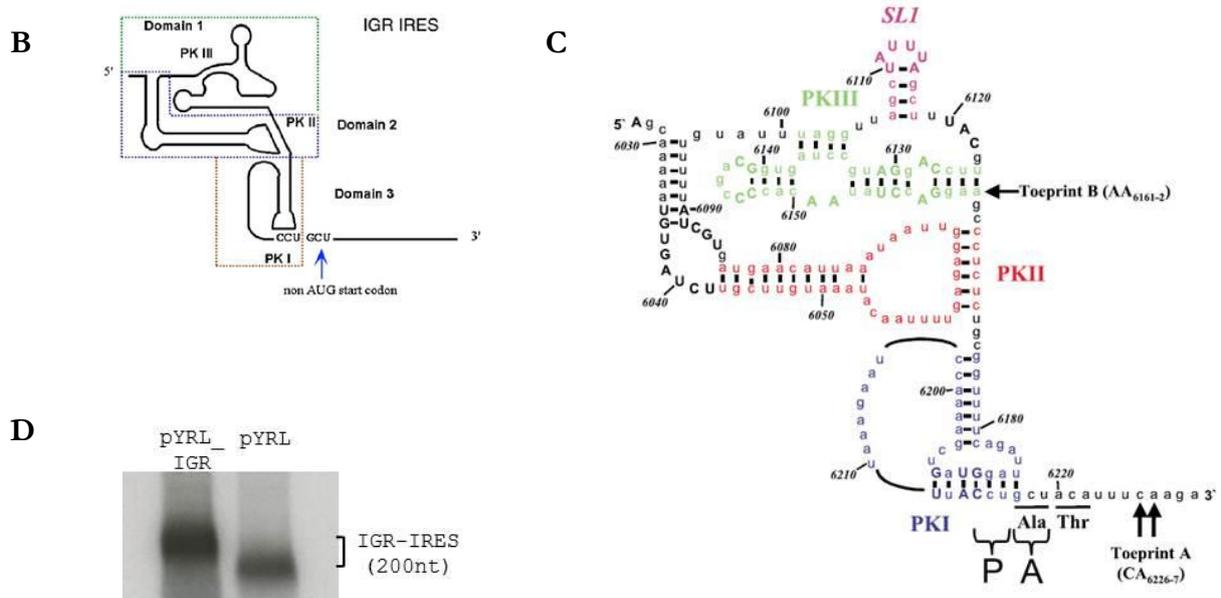


Abb. 4.19: IRES der *intergenic region* (IGR) des *Cricket paralysis virus* (CrPV)

Unterschiedliche schematische Darstellungen der IGR-IRES aus Balvay *et al.*, 2009 (A, B) und Jan und Sarnow, 2002 (C). (D) Northern Blot von Renilla-mRNA mit oder ohne IGR-IRES. Hybridisierung mit einer Renilla-DNA-Sonde und autoradiographische Detektion der Banden. Die mRNA der Renilla-Luziferase mit stromauf gelegener IGR-IRES wird offensichtlich verstärkt transkribiert.

Für die weiteren Analysen zur Bedeutung von Translationsinitiationsfaktoren für die Reinitiation wurde die EMCV-IRES im Plasmid pCH1 daher durch die IGR-IRES aus dem Plasmid pEJ4 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. E. Jan) ersetzt (pMH_IGR1) (Abb. 4.20.A). In einem weiteren von pMH_IGR1 abgeleiteten Konstrukt wurde das AUG des VP1 durch das Triplet TGC ersetzt (pMH_IGR2) (Abb. 4.20.A). Das AUG des VP1 war im IGR-IRES enthaltenen Konstrukt nicht notwendig für die Translationsinitiation, da der Translationsstart innerhalb der IGR-IRES an einem nicht-AUG-Kodon vermittelt wird. Das Triplet CCU am C-terminalen Ende der IGR besetzt die Peptidyl-Stelle (P-Stelle) im Ribosom, so dass das folgende Kodon GCU (Alanin) sich in der Aminoacyl-Stelle befindet und als erstes translatiert wird (Jan und Sarnow, 2002). Daher war es erforderlich, dass sich das anschließend zu translatierende Protein in diesem vorgegebenen Leseraster befand (Abb. 4.19.C).

Als drittes Konstrukt wurden die IGR-IRES und die cDNA Sequenz der subgenomischen FCV RNA in den Vektor pcDNA3 transferiert, da hier vor dem T7-Promotor zusätzlich ein Promotor des Zytomegalievirus (*Cytomegalovirus*, CMV) vorhanden war (pMH_IGR3) (Abb. 4.20.A). Dieser ermöglichte eine von der T7-RNA-Polymerase unabhängige Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II und führt in der Regel zu einem hohen Expressionslevel des stromab liegenden Gens, da es sich um einen starken Promotor für sofort benötigte, frühe Gene des Virus handelt.

An dieser Stelle ist noch einmal hervorzuheben, dass eine gleichbleibend hohe VP1 Expression die Grundvoraussetzung für die effiziente VP2 Expression ist. Wie schon erläutert, hängt die VP2 Synthese aufgrund des Terminations/Reinitiations-Mechanismus direkt von der VP1 Translation ab (Luttermann und Meyers, 2007).

Erste Expressionsstudien mit einer im Labor etablierten Transfektionsmethode zeigten, dass eine Transkription mit Hilfe des CMV-Promotors zu keiner ausreichend hohen VP1 bzw. VP2 Menge führte. Dazu wurden BHK-Zellen in einer kleinen Zellkulturschale (Ø3,5cm) ausgesät und für eine Stunde mit Vacciniavirus MVA-T7 infiziert. Eine Kontrollschale wurde mock infiziert.

Danach erfolgte die Transfektion des entsprechenden Konstrukts mittels Superfect. In Abb. 4.20.B ist dargestellt, dass ohne Vacciniavirus Infektion beim Konstrukt pMH_IGR3 keine nachweisbare Menge an VP1 über den CMV-Promotor exprimiert wurde. Erst mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase wurde ausgehend von den Konstrukten pMH_IGR3, pMH_IGR1 und pCH1 eine große Menge VP1 synthetisiert und ein signifikantes VP2 Level erreicht. Die T7-RNA-Polymerase ist ein äußerst aktives Enzym, weshalb durch sie vermutlich wesentlich mehr mRNA transkribiert wurde als durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Dadurch standen mehr mRNA Transkripte zur Verfügung und konnten durch die Ribosomen translatiert werden, was zu den entsprechenden VP1 und VP2 Mengen führte. Trotzdem bleibt festzuhalten, dass das Ausbleiben einer messbaren VP1 Expression in Abwesenheit von Vacciniavirus MVA-T7 nicht erklärt werden kann.

Um eine Vacciniavirus Infektion dennoch zu vermeiden, wurden Versuche mit BSR T7/5-Zellen durchgeführt. Dies sind BHK-Zellen, welche stabil die T7-RNA-Polymerase exprimieren. Im direkten Vergleich zwischen Vacciniavirus infizierten BHK-Zellen und BSR T7/5-Zellen zeigte sich jedoch, dass die in den BSR T7/5-Zellen exprimierte VP1 Menge nicht ausreichte, um ein signifikantes VP2 Level zu erhalten. Sowohl mit dem Konstrukt pCH1 als auch dem vom T7-Promotor unabhängigen pMH_IGR3 (CMV-Promotor) konnte kein bzw. zu wenig VP2 detektiert werden (Abb. 4.20.C).

Parallel dazu wurden andere Zelllinien getestet (Abb. 4.20.D). Obwohl eine vollständige Permissivität und Replikation von Vacciniavirus MVA nur für BHK-Zellen (und primäre Hühnerembryo-Fibroblasten) beschrieben ist, wurden auch HeLa-Zellen und eine murine dendritische Zelllinie (JAWS II) untersucht. Das Vacciniavirus MVA infizierte die nicht permissiven Zellen und es kam daraufhin zur Expression der viralen Gene. (Ein Zusammenbau zum fertigen Viruspartikel hätte in diesen Zellen hingegen nicht stattgefunden.)

In beiden untersuchten Zelllinien war aber trotz vorangegangener Vacciniavirus Infektion kaum VP1 und kein VP2 zu detektieren. Mit dem Konstrukt pCH1 konnte eine sehr geringe Menge an VP1 in HeLa- und JAWS II-Zellen nachgewiesen werden. Für das Cap-abhängige Konstrukt pCH1 Δ EMCV5 und pMH_IGR1 konnte jedoch weder VP1 noch VP2 detektiert werden. Im Gegensatz dazu exprimierten BHK-Zellen bei Transfektion mit allen drei Konstrukten eine große Menge VP2.

In Folge der Ergebnisse der zuletzt beschriebenen Versuche wurden für die weiteren Analysen BHK-Zellen verwendet, die für eine messbare VP2 Expression zuvor mit Vacciniaviren infiziert wurden.

Das Testsystem für die anschließenden Untersuchungen sah demnach wie folgt aus: BHK-Zellen wurden in kleinen Zellkulturschalen (\varnothing 3,5cm) am Tag Null ausgesät. Am ersten Tag wurden die zu circa 70 bis 80% konfluenten Zellen mit dem Mix aus vier verschiedenen shRNA Plasmiden und Lipofektamin 2000 transfiziert und dann für etwa 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur transienten Proteinexpression wurde das im Labor etablierte System verwendet. Dazu wurden die zuvor transfizierten Zellen am dritten Tag für eine Stunde mit Vacciniavirus MVA-T7 infiziert. Danach wurden die Zellen mit dem entsprechenden FCV Konstrukt mittels Superfect transfiziert und für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation mit einem Methionin defizienten Medium wurden die Proteine circa 55 Stunden nach der shRNA Plasmid Transfektion radioaktiv mit [³⁵S]-Methionin markiert. Im Vergleich zu den Versuchen in Abschnitt 4.1 wurden die Proteine nicht über Nacht markiert, sondern die optimale Markierungszeit betrug aufgrund vorausgegangener Analysen nur 30 Minuten, um ein größtmögliches Messsignal zu erzielen. Dadurch sollte vermieden werden, dass die Menge des über Nacht neu synthetisierten und markierten VP2 ein Plateau erreicht, bei dem kein Unterschied mehr nachzuweisen ist. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei -20°C schockgefroren. Die Herstellung von Proteinextrakten und die Aufarbeitung der Gesamtproteine fanden am vierten Tag statt.

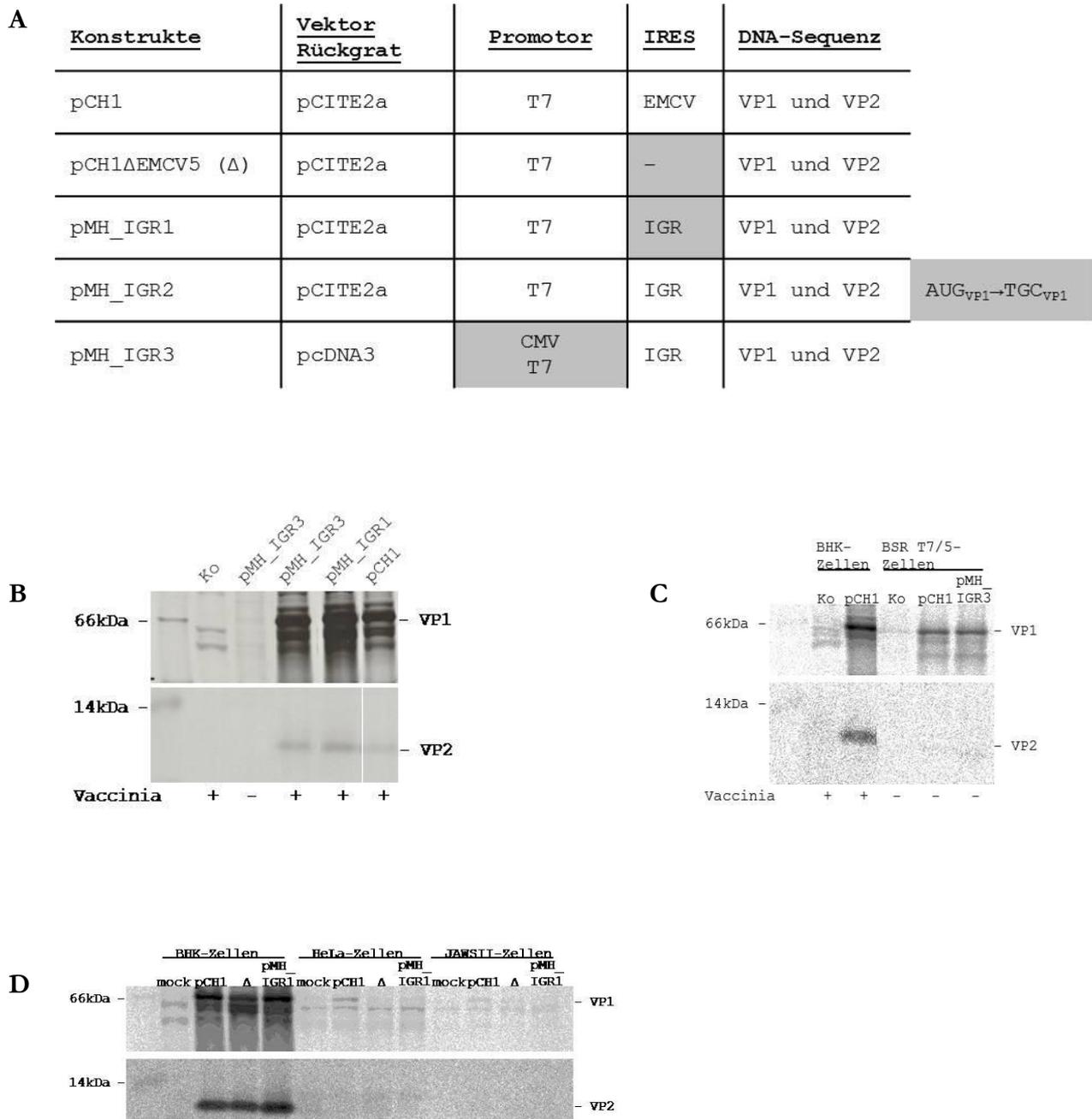


Abb. 4.20: Parameter des gewählten Testsystems

(A) Tabellarischer Überblick über die verwendeten Konstrukte. (B) Verstärkte Expression der Proteine durch Verwendung der T7-RNA-Polymerase für die mRNA Transkription. Eine Vacciniavirus Infektion der Zellen war notwendig, damit eine signifikante Menge VP2 detektiert werden konnte. (C) Die Menge an stabil exprimierter T7-RNA-Polymerase durch die BSR T7/5-Zellen reichte nicht aus, um eine Infektion mit Vacciniaviren zu ersetzen. (D) Vergleichende Tests mit BHK-Zellen, HeLa-Zellen und Zellen der murinen dendritischen Zelllinie JAWS II zeigten nach Inkubation mit Vacciniavirus keine ausreichende VP1 bzw. VP2 Expression.

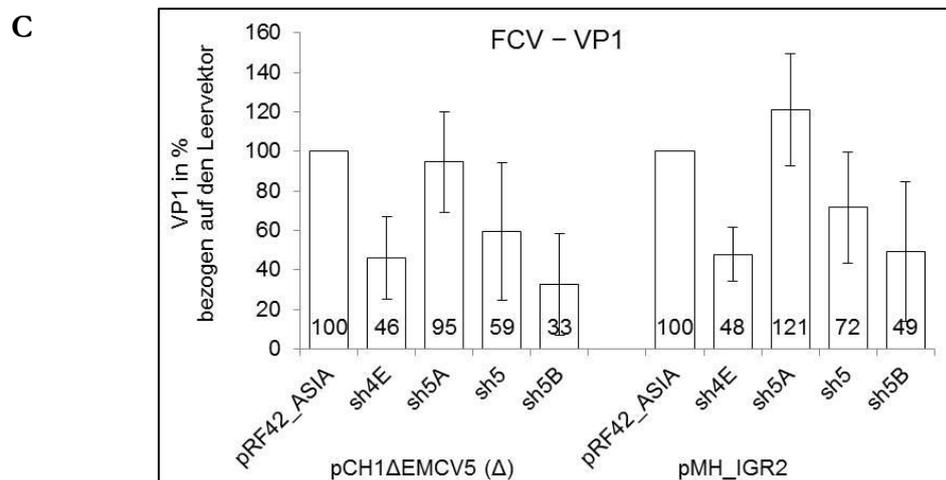
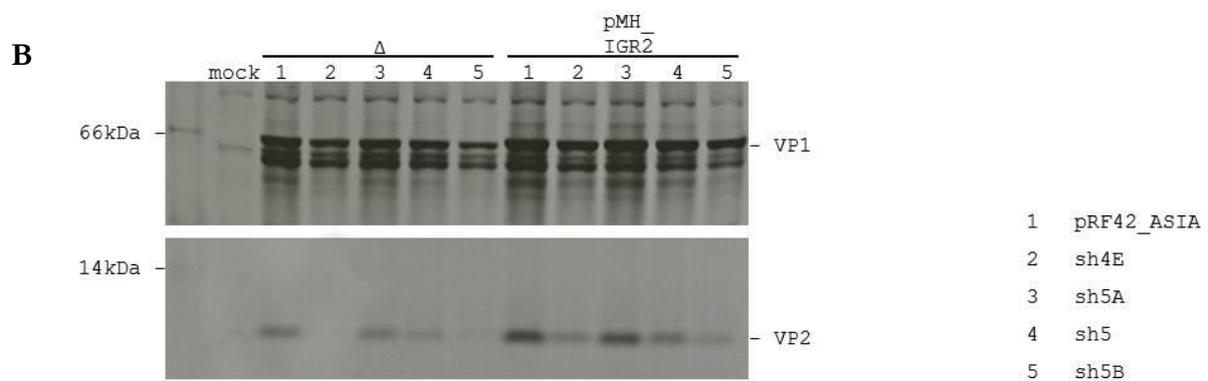
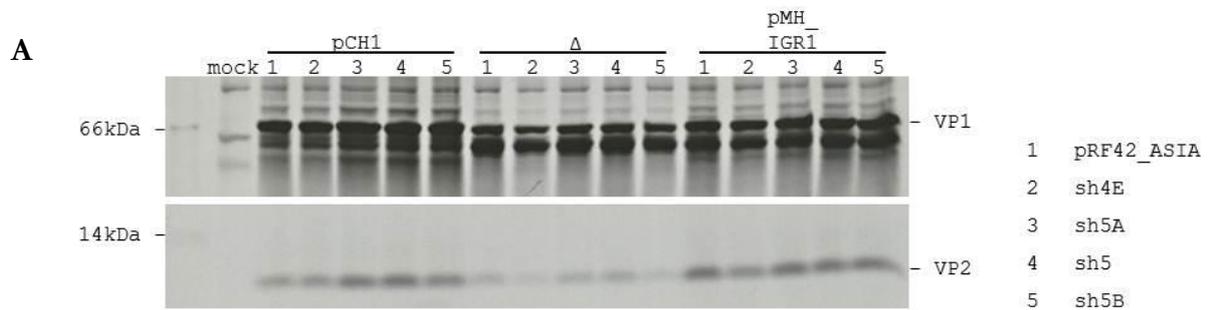
4.2.7 Bedeutung einzelner Translationsinitiationsfaktoren für die FCV VP2 Synthese

In einer ersten Serie von Versuchen wurden die Konstrukte pCH1, pCH1 Δ EMCV5 und pMH_IGR1 getestet. Abb. 4.21.A zeigt die VP1 und VP2 Banden im 10 bzw. 12%igen SDS-Gel nach Immunpräzipitation der radioaktiv markierten Proteine. Deutlich zu erkennen war die niedrige Translationsrate der mRNA, die vom Konstrukt pCH1 Δ EMCV5 transkribiert wurde. Die Proteinbiosynthese sank, was sowohl an der Gesamtproteinmenge als auch den VP2 Banden erkennbar war. Die VP2 Menge war aufgrund der erniedrigten VP1 Translation drastisch reduziert.

Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte in einer zweiten Reihe von Experimenten. In diesem Ansatz wurde neben dem Cap-abhängigen Konstrukt pCH1 Δ EMCV5 auch pMH_IGR2 verwendet, bei dem die IGR-IRES die Translation vermittelte und das Startkodon des VP1 substituiert war. Die autoradiographische Detektion der VP1 und VP2 Proteine ist in Abb. 4.21.B veranschaulicht. Es zeigten sich bereits auf den ersten Blick deutliche Unterschiede in der erhaltenen VP2 Menge für die verschiedenen Ansätze mit den jeweiligen shRNAs. Bewertbare Aussagen ließen sich aber erst nach der Quantifizierung treffen. Daher wurden die Daten aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten ausgewertet und quantifiziert. Ansätze, bei denen die VP2 Menge nicht gegen den Hintergrund quantifiziert werden konnte, wurden nicht in Betracht gezogen. Gleichwohl wurde ein Versuch, der offensichtlich fehlerhaft war und eine fast vierfache Menge an VP1 im Vergleich zum Mittelwert lieferte, nicht berücksichtigt. Die VP1 Mengen sind in Abb. 4.21.C dargestellt und wurden für jedes Konstrukt auf den mit dem Leervektor pRF42_ASIA erhaltenen Wert bezogen. Wie zu erwarten, sanken die VP1 Level für das Cap-abhängige Konstrukt pCH1 Δ EMCV5. Für den Cap-bindenden Faktor eIF4E sowie eIF5B, der die große Untereinheit des Ribosoms in den Translationskomplex rekrutiert, war die VP1 Abnahme mit mehr als 50% besonders groß. Die shRNA induzierte Reduktion der Menge des GTPase aktivierenden Faktor eIF5 führte zu einem Abfall der VP1 Menge auf 59%. Allein für den Faktor eIF5A konnte keine bedeutende Reduktion der Proteinmenge gemessen werden. Auffallend waren die VP1 Werte für das Konstrukt pMH_IGR2, die denen des Kontrollkonstrukts ähnelten und in ihrer Tendenz entsprachen. Aufgrund der Verwendung der IGR-IRES war ein unverändertes VP1 Niveau erwartet worden, da diese unabhängig von allen Translationsinitiationsfaktoren die Translation einleitet. Ausgehend vom IGR-IRES-Konstrukt wurde im Vergleich zum pCH1 Δ EMCV5 augenscheinlich mehr VP1 exprimiert (Abb. 4.21.A und B). Die hier beobachtete Abhängigkeit der Translation von den untersuchten Initiationsfaktoren ließ sich nur damit erklären, dass zumindest ein Teil der erhaltenen Produkte nicht durch Initiation an der IGR-IRES, sondern in Folge klassischer eukaryotischer Translationsinitiation und damit Faktor-abhängig exprimiert wurde. Diese These wurde bestärkt durch die zweite und dritte VP1 Bande, die sowohl bei dem Cap-abhängigen als auch bei den Cap-unabhängigen Konstrukten zu verzeichnen waren und durch Initiation an stromab gelegenen Startstellen entstehen (Abb. 4.21.A und B). Dies sollte bei den IGR-IRES Konstrukten aufgrund des fehlenden *scanning*-Prozesses nicht erfolgen.

Anders als die VP1 Werte konnten die ermittelten VP2 Mengen für jedes Experiment auf die VP1 Rate normiert werden, da die VP2 Expression direkt abhängig ist von der VP1 Translation. Wie auch beim VP1 wurden die Werte anschließend prozentual auf die nach Transfektion des Leervektors pRF42_AISA erzielten Werte bezogen (Abb. 4.21.D). Im Vergleich der Ergebnisse für beide Konstrukte ließ sich für das Konstrukt pMH_IGR2 keine Abhängigkeit der Reinitiation von einem der Translationsinitiationsfaktoren nachweisen. Für pCH1 Δ EMCV5 dagegen sanken die VP2 Level bei verminderter Menge der Translationsinitiationsfaktoren eIF5 und eIF5B. Die Signifikanz dieser Reduktion muss aufgrund der hohen Standardabweichungen jedoch hinterfragt werden. Die Daten für eIF5B korrelierten mit der Beobachtung für das Konstrukt pMH_IGR1 (Auswertung nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für die stark schwankende VP2 Synthese kann in messtechnischen Problemen gesehen werden, die sich aus der niedrigen Reinitiationsrate ergaben, welche schon bei der FCV Wildtyp Sequenz bei nur circa 5% liegt. Durch die herabgesetzte Verfügbarkeit an Translationsinitiationsfaktoren war die Cap-abhängige VP1

Translation vermindert. Dies machte sich entsprechend auch bei der VP2 Reinitiation bemerkbar, so dass, wie bereits weiter oben erwähnt, eine Quantifizierung gegen den Hintergrund schwer fiel (Abb. 4.21.A und B, pCH1ΔEMCV5).



D

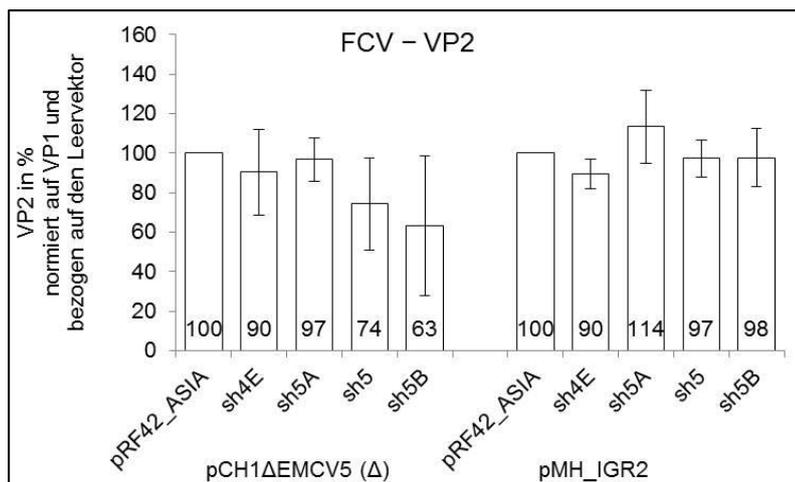


Abb. 4.21: Bedeutung der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF5A, eIF5 und eIF5B für die FCV VP2 Synthese

Immunpräzipitation der mit [³⁵S]-Methionin markierten Proteine VP1 und VP2 48 Stunden nach Transfektion der shRNA Plasmide und fünf Stunden nach Transfektion der verwendeten FCV Expressionskonstrukte: **(A)** pCH1, pCH1ΔEMCV5 (Δ) und pMH_IGR1 bzw. **(B)** pMH_IGR2 und pCH1ΔEMCV5 (Δ). Quantifizierung der **(C)** VP1 und **(D)** VP2 Translationsrate für die Konstrukte pCH1ΔEMCV5 (Δ) und pMH_IGR2 aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

4.2.8 Vorversuche zum alternativen Ansatz der *in vitro* Analyse

Im Vergleich zu den publizierten Daten blieben die Ergebnisse aus der RNA-Interferenz Analyse weit hinter den Erwartungen zurück. Bisher konnte keine eindeutige Aussage über den Einfluss der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF5A, eIF5 und eIF5B auf die Reinitiation getroffen werden. In der Endphase dieser Arbeit wurde daher nach anderen Lösungsansätzen gesucht.

Zwei grundsätzlich verschiedene Herangehensweisen zur *in vitro* Untersuchung der Translationsinitiationsfaktoren sind vorstellbar: Zum einen ist es denkbar, einem Expressionssystem nur eine definierte Auswahl an gereinigten Initiationsfaktoren zuzusetzen und zu überprüfen, ob eine Translation erfolgt. Andererseits können einzelne, im Retikulozytenlysat enthaltene Translationsinitiationsfaktoren blockiert bzw. depletiert werden (Pöyry *et al.*, 2007). Dies ist durch chemische Substanzen oder Antikörperbehandlung möglich.

In einem ersten Versuch wurde das Retikulozytenlysat mit verschiedenen Antikörpermengen (Antikörperkonzentrationen wurden vom Hersteller nicht genannt) gegen eIF4E (1μl, 2μl, 5μl) für je eine Stunde bei 37°C und anschließend bei 4°C vorinkubiert. Zur Kontrolle wurde mock behandeltes Retikulozytenlysat sowie ein V5-Antikörper verwendet. Die darauf folgende *in vitro* Translation wurde mit zuvor *in vitro* transkribierter mRNA der Konstrukte pCH1ΔEMCV5 und pCH1 durchgeführt. Abb. 4.22.A zeigt, dass sowohl die Translation der Kapsidproteine durch das Cap-unabhängige Konstrukt pCH1, als auch die Cap-abhängige Translation nach Vorinkubation mit dem Kontrollantikörper gegen V5 nicht beeinflusst wurden. Im Vergleich dazu war die Cap-abhängige Translation von pCH1ΔEMCV5 bereits durch 1μl α-eIF4E deutlich reduziert. Diese Wirkung verstärkte sich bei der Präinkubation mit 2μl und 5μl des eIF4E Antikörpers. Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Cap-unabhängigen Konstrukt nur ein geringfügiger Effekt.

Durch diesen Versuch konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der *in vitro* Translation durch Antikörper gegen die hier ausgewählten Translationsinitiationsfaktoren prinzipiell möglich ist.

Im zweiten Vorexperiment wurde das vorherige Experiment in größerem Rahmen wiederholt (Abb. 4.22.B). Spur zwei zeigt den mock präinkubierten Ansatz. Im Anschluss daran folgen die mit den Antikörpern gegen eIF4E (1µl, 2µl), eIF5A (1µl, 2µl, 5µl) und eIF2B2 (1µl, 2µl, 5µl) vorinkubierten Ansätze. Für den Faktor eIF4E konnte bestätigt werden, dass eine Depletion die *in vitro* Translation deutlich beeinträchtigt. Genauso verhielt es sich für die Translationsinitiationsfaktoren eIF5A und eIF2B2. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Cap-abhängige Translation vermindert ist (Abb. 4.22.B).

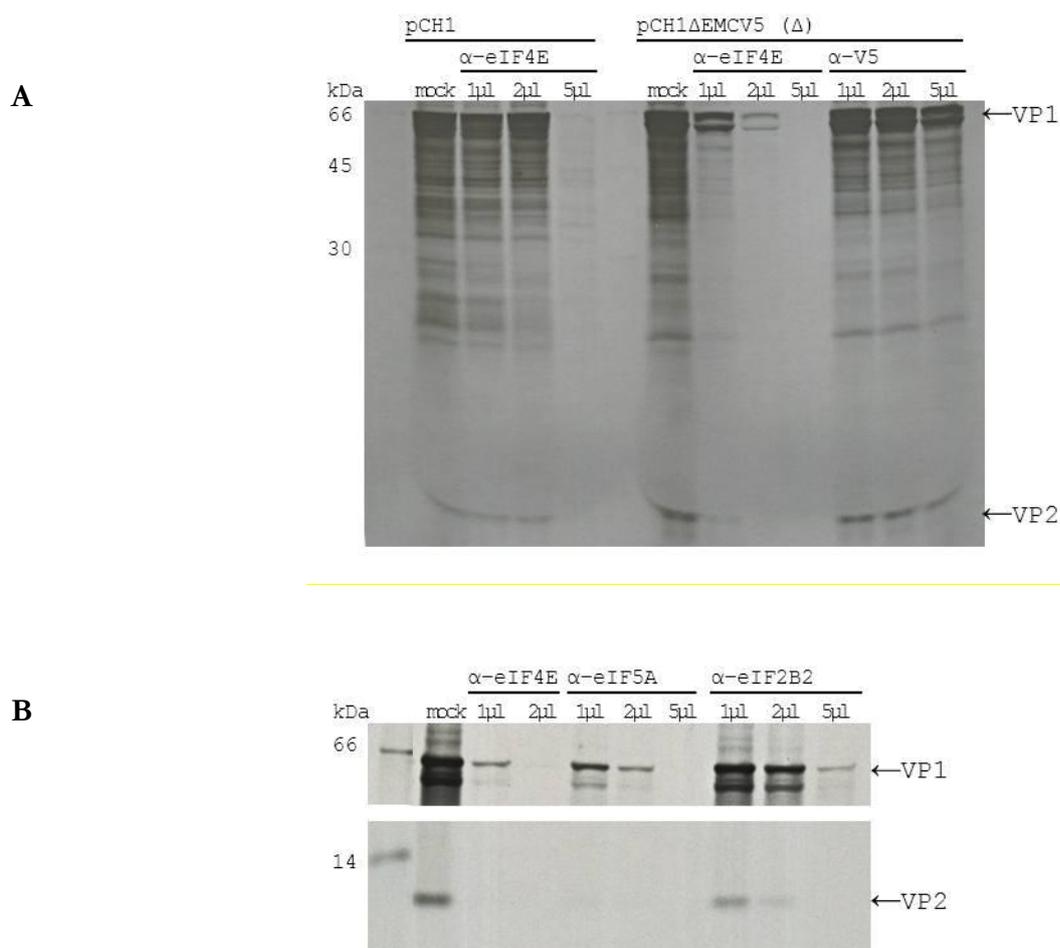


Abb. 4.22: Depletion von Translationsinitiationsfaktoren mittels Antikörperbehandlung

Immunpräzipitation der mit [³⁵S]-Methionin markierten Proteine VP1 und VP2 (**A**) nach Präinkubation mit den Antikörpern α-eIF4E und α-V5 sowie mock und anschließender *in vitro* Translation der Konstrukte pCH1 und pCH1ΔEMCV5 (Δ) (14%iges SDS-Gel) und (**B**) nach Präinkubation mit den Antikörpern gegen eIF4E, eIF5A und eIF2B2 sowie mock und anschließender *in vitro* Translation des Cap-abhängigen Konstrukts pCH1ΔEMCV5 (Δ) (12%iges SDS-Gel).

In einem weiteren Vorexperiment wurde der Versuch einer chemischen Beeinträchtigung der Translation unternommen. Dazu wurde die mit einem $m^7G(5')ppp(5')G$ -Cap Analogon versehene mRNA des Cap-abhängigen Konstrukts pCH1 Δ EMCV5 mit den Translationsinhibitoren NSC119889 und Edein präinkubiert und anschließend *in vitro* translatiert (Abb. 4.23). NSC119889 führt zur Dissoziation von eIF2 und der methylierten Initiator-tRNA (Garrey *et al.*, 2010). Edein inhibiert die Erkennung des Startkodons durch die scannende kleine ribosomale Untereinheit (Jan, 2006). Die klare Reduktion der VP1 und VP2 Proteinmenge durch beide Substanzen ist in den Spuren vier und fünf erkennbar. Spur sechs zeigt den mock präinkubierten Ansatz. In der dritten Spur wurde dem Ansatz testweise 1,4-Dithiothreitol (DTT) zugesetzt, um die Stabilität der neu synthetisierten Proteine zu erhöhen und eine bessere *in vitro* Translation zu erhalten.

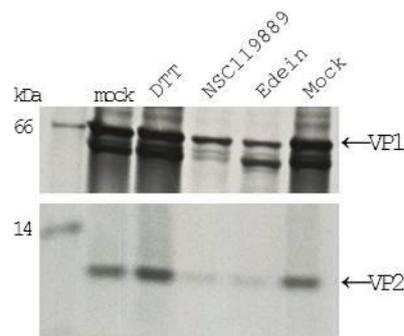


Abb. 4.23: Chemische Depletion von Translationsinitiationsfaktoren

Immunpräzipitation der [^{35}S]-Methionin markierten Proteine VP1 und VP2 nach Präinkubation der mit einem $m^7G(5')ppp(5')G$ -Cap Analogon versehenen mRNA des Cap-abhängigen Konstrukts pCH1 Δ EMCV5 (Δ) mit den Zusätzen von DTT, NSC119889 und Edein sowie mock und anschließender *in vitro* Translation (12%iges SDS-Gel).

Eine Aussage über den Einfluss auf die Reinitiationsrate konnte bis dato noch nicht getroffen werden, da die VP1 Synthese so stark verringert war, dass kein VP2 mehr zu detektieren war (Abb. 4.22 und 23). Daher sind weiterführende Versuche mit IGR- oder anderen IRES Konstrukten notwendig.

5. Diskussion

Die Translation von Proteinen stellt einen elementaren Schritt in biologischen Systemen dar. Sie sorgt dafür, dass die genetische Information in Proteinsequenzen übersetzt wird und damit die Haupteffektormoleküle für die umfangreichen biochemischen Leistungen solcher Systeme gebildet werden. Dies trifft natürlich auch für Viren zu, für die die Translation zudem mit einer Reihe von Problemen verbunden ist. Da Viren in der Regel keine eigenen Komponenten für die Translation beisteuern, sind sie vollständig auf die Maschinerie der Wirtszelle angewiesen. Durch den stets vorhandenen Überschuss an translatierbaren RNAs gegenüber den Elementen des Translationsapparates in der Zelle konkurrieren die viralen mit den zellulären RNAs um diese Faktoren.

Ein weiteres Problem für Viren, die nicht im Zellkern replizieren, ist es, RNAs zu produzieren, die von der Maschinerie der Wirtszelle als Substrat anerkannt werden. Die mRNAs eukaryotischer Zellen sind durch eine Cap-Struktur am 5'-Ende und einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Terminus kenntlich gemacht. Erst das Vorhandensein dieser Strukturen ermöglicht die Rekrutierung der Translationskomponenten und damit die Initiation der Proteinsynthese. Die Enzyme, die diese Veränderungen am Primärtranskript vornehmen, sind im Kern der Zelle lokalisiert. RNAs, die im Zytoplasma synthetisiert werden – wie die Transkripte der meisten RNA Viren, können von diesen Enzymen nicht verändert werden. Somit müssen entweder virale Enzyme, die die viralen RNAs entsprechend modifizieren, bereitgestellt oder alternative Wege zur Translationsinitiation genutzt werden.

Das Genom von Viren verfügt nur über eine limitierte Kodierkapazität. Dies gilt insbesondere für RNA Viren, die schon aufgrund der Instabilität ihrer Nukleinsäure und der geringen Genauigkeit ihrer Replikationsenzyme nur eine sehr begrenzte Genomlänge besitzen. Um trotzdem die erforderliche Anzahl an Genprodukten für die komplexen Aufgaben der Replikation kodieren zu können, nutzen diese Viren ihre Genome äußerst effizient. Dazu haben sich in der Evolution Mechanismen entwickelt, mit denen mehr als ein Protein von einem RNA Molekül translatiert werden kann, was im eukaryotischen System im Regelfall nicht geschieht. Die bisher dargestellten, vielfältigen Anforderungen an die Translation viraler RNAs haben zu unterschiedlichen Strategien geführt, die eine Reihe von Besonderheiten aufweisen:

Die Translation von RNAs, die zunächst ohne Cap-Struktur synthetisiert werden, wird für Viren mit segmentiertem RNA Genom (Orthomyxo-, Bunya- und Arenaviren) durch den Raub zellulärer Cap-Strukturen ermöglicht. Orthomyxoviren (z.B. Influenzaviren) und Bornaviren replizieren als einzige Vertreter der RNA Viren im Zellkern. Bei Influenzaviren findet deshalb das sog. „*cap snatching*“ im Zellkern statt. Die Bunya- (z.B. *Rift valley fever virus* und Hantaviren) und Arenaviren (z.B. Lassa-Virus) stehlen dagegen im Zytoplasma zelluläre Cap-Strukturen. Ermöglicht wird dies in jedem Fall durch eine virale Endonukleaseaktivität. Virale RNAs mit einer zellulären Cap-Struktur sind von zellulären mRNAs nicht mehr zu unterscheiden und werden daher durch die Wirtszelle translatiert.

Anstelle einer Cap-Struktur kann die Translation auch durch interne Ribosomen-Eintrittsstellen (*internal ribosome entry site*, IRES) initiiert werden. Auf diesen Mechanismus wird im Folgenden noch genauer eingegangen.

Eine weitere Alternative zur Cap-Struktur besitzen Calici- und Potyviren (z.B. *Tobacco etch potyvirus* (TEV) und *Turnip mosaic virus*). Wie auch andere Viren kodieren sie für ein kleines Protein namens VPg (*viral protein genome-linked*), das kovalent an das 5'-Ende der viralen RNA gebunden ist. Aber nur das VPg der Calici- und Potyviren ermöglicht eine Translationsinitiation. Dies wird durch die Interaktion des jeweiligen VPg mit Translationsinitiationsfaktoren erreicht.

Ausgehend von nur einem einzigen Primärtranskript können auf unterschiedliche Art und Weise mehrere Translationsprodukte entstehen. Bei den Viren mit einem positiv-strängigem RNA Genom führt die Translation in der Regel zu einem oder mehreren Polyproteinen, die durch

zelluläre und/oder virale Proteasen in die reifen Virusproteine prozessiert werden (z.B. Picorna- oder Flaviviren).

Außer der Polyproteinsynthese existiert noch eine Reihe alternativer Wege, die die Synthese verschiedener Proteine von einem RNA Molekül ermöglichen. Dies beruht auf dem Vorhandensein mehrerer Leseraster innerhalb des Primärtranskripts. Neben dem Überlesen von Stoppkodonen können Proteine aus verschiedenen Leserastern durch alternatives Spleißen (*splicing*), *RNA Editing* oder *Ribosomal Frameshift* entstehen. Durch das beim alternativen Spleißen erfolgte Entfernen von Sequenzen (Introns) können andere Leseraster entstehen und dadurch auch weitere Proteine abgeleitet werden (z.B. bei Retroviren). Beim *RNA Editing* werden Nukleotide der mRNA posttranskriptionell deletiert oder substituiert oder es werden zusätzliche Nukleotide inseriert (z.B. Paramyxoviren und Hepatitis-D-Virus). Das *RNA Editing* ist wie das Spleißen eine Form der posttranskriptionellen Modifikation, die zur Erhöhung der Diversität des Transkriptoms und damit der Proteinviefalt beiträgt. Die Leserasterverschiebung (*Ribosomal Frameshift*) erfolgt durch eine Pseudoknotenstruktur und eine „*slippery sequence*“, indem das Ribosom durch die Haarnadelschleife verlangsamt wird und innerhalb der „*slippery sequence*“ in das Leseraster ± 1 verrutscht (z.B. Retro- und Coronaviren; Giedroc und Cornish, 2009).

Im Vergleich zum typischen, eukaryotischen *scanning* Prozess (Absuchen der RNA nach dem Startkodon) kann die Translationsinitiation auch abweichend verlaufen. Sowohl das Überlesen (*Leaky Scanning*) als auch das Überspringen von Startkodonen (*Ribosome Shunting*) sind andersartige Mechanismen der Initiation, die ebenfalls neue Proteine zur Folge haben. Das Überlesen von Startkodonen kann, wie beispielsweise beim P- und C-Protein des Sendaivirus, durch einen ungünstigen Sequenzkontext im Bereich des Starts ausgelöst werden. Zum *Ribosome Shunting* gehört oftmals eine „*shunt sequence*“, durch welche das Ribosom nichtlinear entlang der mRNA zum alternativen Startkodon springt (z.B. Adenoviren und *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); Chappell *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 1998).

Der vom 5'-Ende der RNA abhängigen Translationsinitiation steht die interne Initiation z.B. unter Kontrolle einer IRES gegenüber, welche die Translation mehrerer Leseraster von einem einzigen polycistronischen Transkript erlaubt und vielen Viren ermöglicht, die zelluläre Translationsmaschinerie teilweise zu umgehen. Je nach Virus sind bestimmte Translationsinitiationsfaktoren wie z.B. der Cap-bindende Faktor eIF4E oder das RNA-bindende Protein eIF4B für diesen Prozess nicht mehr notwendig. Neben der für die Funktionalität essentiellen Sekundärstruktur von IRESs, können aber andere zelluläre Faktoren, *IRES trans-acting factors* (ITAFs), eine Rolle spielen. Diese interagieren mit der RNA und rekrutieren unter Umständen andere nötige Translationsinitiationsfaktoren, wodurch die Translationsinitiation gewährleistet wird.

Schlussendlich bietet auch der Terminations/Reinitiations-Mechanismus (Kozak, 2001) die Möglichkeit zur Translation zweier Proteine von einer bicistronischen mRNA. Da der zweiten kodierenden Sequenz in diesem Fall immer ein anderes Leseraster vorausgeht, kommt es zunächst zur Termination der ersten Translation, bevor die Reinitiation erfolgen kann. Die Start/Stoppreion kann sehr unterschiedlich aussehen: Start- und Stoppkodon können überlappen, das Start- kann dem Stoppkodon vorausgehen oder umgekehrt. Durch Kozak (2001) konnte gezeigt werden, dass die Länge des stromauf gelegenen Leserasters oftmals die Effizienz der Reinitiation bedingt, wobei es sich um Raster von nur wenigen Nukleotiden handelt. Die Reinitiationsrate sinkt mit zunehmender Länge des stromauf gelegenen Leserasters, weshalb nur sehr kurze 5'-Leseraster eine Reinitiation erlauben. Eine Ausnahme bildet z.B. das minore Kapsidprotein der Caliciviren. In diesem besonderen Fall geht dem Leseraster für das VP2 das sehr lange Leseraster des Hauptkapsidproteins VP1 voraus.

In dieser Arbeit wurde der Terminations/Reinitiations-Mechanismus, der zur Translation des minoren Kapsidproteins führt, am Beispiel des FCV genauer analysiert.

5.1 Untersuchungen zur Bedeutung von Sequenzmotiven und putativen Sekundärstrukturen in der VP2 kodierenden Region für die Reinitiation

Aus Beobachtungen früherer Analysen war bekannt, dass Veränderungen in der VP2 Gensequenz die Reinitiationsrate beeinflussen. Daten aus RHDV Mutationsanalysen hatten bereits gezeigt, dass Deletionen von drei, sechs oder neun Nukleotiden im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region die VP2 Translationseffizienz massiv verringern (Meyers, nicht publiziert). Desweiteren gibt es Hinweise, dass bei Pflanzenviren Systeme existieren, in denen neben der 5'-nicht-translatierten Region auch Sequenzen stromab des Translationsstartpunktes regulierend auf die Translationseffizienz wirken. Das *Tobacco mosaic virus* (TMV) besitzt eine Cap-Struktur, aber kein Poly(A)-Signal. Eine Pseudoknotendomäne im komplexen 3'-Bereich vermittelt stattdessen die Interaktion mit der 5'-Region. Im 5'-Bereich trägt ein *Translation Enhancer* (TE) Element (Ω) zu einer Steigerung der Translationsrate bei (Gallie *et al.*, 1987). Eine Reihe weiterer Pflanzenviren, wie z.B. das *Satellite tobacco necrosis virus 1* (STNV-1) oder das *Barley yellow dwarf luteovirus* (BYDV), besitzen weder eine Cap-Struktur noch ein Poly(A)-Signal. In ihrem 3'-Bereich existieren jedoch verschiedene TE Sequenzen, die für eine effiziente Translation essentiell sind (Fan *et al.*, 2012).

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich daher die Frage, ob neben den bekannten, für die Reinitiation notwendigen Motiven der TURBS auch Sequenzabschnitte in der VP2 kodierenden Sequenz die Translationseffizienz dieses Proteins beeinflussen. Um diese Frage systematisch zu untersuchen, wurde zuerst analysiert, ob es sich um einen Primärsequenzeffekt handelt. Dazu wurden verschiedene Mutationen in die VP2 kodierende Sequenz des FCV eingeführt. Bei den Deletions- und Substitutionsexperimenten wurden Mutanten sowohl mit erhöhtem als auch erniedrigtem VP2 Expressionslevel identifiziert. Aus diesen Daten konnte zunächst kein klarer Schluss gezogen werden. Auffällig waren aber die deutlichen Effekte, die die verschiedenen Stoppmutanten auf die VP2 Menge hatten. Dabei wurden zunächst nur Stoppkodon #2 und #3 betrachtet, die sich wie das Stoppkodon der Start/Stoppstelle im Leseraster des ORF2 befinden. Einen großen, positiven Einfluss auf die VP2 Translation haben die drei Nukleotide zwischen Stoppkodon #2 und #3. Insgesamt waren die Ergebnisse der Mutationsanalysen an den Stoppkodonen sehr divergent und es konnte kein klares Schema abgeleitet werden. Um die Rolle von Stoppkodon #2 und #3 zu klären, wurde in der Folge ermittelt, ob diese neben dem Stoppkodon der Start/Stoppstelle die Termination der VP1 Translation sicherstellen. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Wirkung von Stoppkodon #2 und #3 auf die Reinitiationsrate nicht darüber vermittelt wird, dass sie zum Translationsstopp des VP1 beitragen. Dieser wird allein durch das Stoppkodon #1 gewährleistet. Parallel dazu wurde auch das Stoppkodon #4 im dritten, nicht kodierenden Leseraster untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diesem keine Bedeutung für die Translationsreinitiation zukommt.

Eine andere mögliche Erklärung für die mannigfaltigen Resultate der Mutationsanalysen waren Interaktionen zwischen Sequenzmotiven innerhalb des 5'-Bereichs der VP2 kodierenden Sequenz und anderen Bereichen der subgenomische mRNA, die die Translationsreinitiation beeinflussen. Dazu wurden Teilbereiche der Sequenz der subgenomischen mRNA ersetzt und anschließend die VP2 Expression einer Auswahl an zuvor etablierten Mutanten unter diesen Bedingungen ermittelt. Die VP1 kodierende Sequenz wurde mit Ausnahme des 3'-terminalen Bereichs mit der TURBS durch die Sequenz des kleinen, pestiviralen Proteins N^{pro} ersetzt. Die Abstandssequenz zwischen Motiv 1 und Motiv 2, welche nachgewiesenermaßen nicht essentiell ist (Luttermann und Meyers, 2007), wurde deletiert und der für den C-Terminus kodierende Bereich der VP2 Sequenz durch GFP substituiert. Mit Hilfe von *in silico* Analysen und prägnanten Mutationssequenzen wurde nach Interaktionspartnern gesucht. Die putativen Motivsequenzen am 5'-Ende der VP1 kodierenden Sequenz, des Abstandshalters oder am 3'-Ende der VP2 kodierenden Sequenz wurden substituiert und die Auswirkungen auf die Reinitiationsrate untersucht. Für die 5'-Region der VP1 kodierenden Sequenz sowie die Abstandssequenz zwischen Motiv 1 und 2 konnten keine relevanten Sequenzabschnitte gefunden werden. Obgleich

diese Analysen aufgrund der Interaktionsstudien mit mutierten Sequenzen relativ artifiziell sind, konnte für mehrere Bereiche, die über die VP2 kodierende Sequenz verteilt sind, ein Einfluss gezeigt werden. Ein definiertes Motiv wurde dabei jedoch nicht lokalisiert.

Widersprüchlich ist das Ergebnis der Mutante MH44, bei der zwei Motive im 3'-Bereich der VP2 kodierenden Region als potentielle Interaktionspartner ermittelt wurden. Beide Motive scheinen angesichts der gleichen Reinitiationsraten von ähnlicher Bedeutung zu sein. Sie liegen jedoch über 200 Nukleotide voneinander entfernt. Eine Rolle von zwei, gleichzeitig als Interaktionspartner zum 5'-Bereich des VP2 wirkenden Motiven erscheint eher unwahrscheinlich.

Nach den bis zu diesem Punkt erhaltenen Ergebnissen konnte ein Primärsequenzeffekt von einem exakt eingrenzbarem Motiv ausgeschlossen werden – anders als beim RHDV, bei dem ein Ersatz des Stoppkodons durch eines der beiden anderen Terminationssignale zu einer deutlichen Erniedrigung der VP2 Rate führt und damit eindeutig ein Primärsequenzeffekt gezeigt wurde (Meyers, 2003).

Im Folgenden wurde das 5'-Ende der VP2 kodierenden Sequenz auf mögliche Sekundärstrukturderivate geprüft. *In silico* Faltungen der RNA wurden mit dem Strukturvorhersageprogramm *mfold* (Zuker, 2003) vorgenommen. Alternativen dazu bieten das Programm *RNA-Decoder* (Pedersen *et al.*, 2004), welches zusätzlich den Bereich der kodierenden Sequenz berücksichtigt, oder diverse andere Algorithmen.

Innerhalb der ersten 28 Nukleotide des VP2 Gens ergaben die *in silico* Analysen sowohl für die Wildtyp- als auch nahezu alle mutierten Sequenzen die Ausbildung einer Haarnadelschleife. Die Vermutung lag nahe, dass diese Haarnadelformation die VP2 Translationsrate beeinflusst. Ein mögliches Modell wäre, dass diese Struktur zur Verlangsamung des Ribosoms kurz vor dem Erreichen der Start/Stoppstelle führt und dadurch die Interaktion zwischen dem Motiv 1 und der 18S rRNA erleichtert wird. Um diese Idee genauer zu betrachten, wurde die Haarnadelstruktur gezielt verändert, so dass deren Stabilität abgeschwächt oder verstärkt wurde. Eine Beziehung zwischen der Stabilität und der Lage der Haarnadelformation und der Reinitiationsrate konnte durch diese Manipulationen jedoch nicht festgestellt werden. Zuletzt wurde auch die Position des terminierenden Ribosoms in Betracht gezogen. Das an die mRNA gebundene Ribosom überdeckt in etwa einen Abschnitt von zwölf Nukleotiden, deren Sekundärstruktur bereits durch die Helikase entwunden wurde. Sobald das Ribosom die Start/Stoppstelle erreicht, muss die Sekundärstruktur des vom Ribosom abgetasteten Bereichs bereits aufgelöst sein. Um dies zu berücksichtigen, wurde gezielt nochmals nach Strukturen zwischen den Nukleotiden 13 bis 52 der VP2 kodierenden Sequenz *in silico* gesucht. Bei diesen Analysen wurde jedoch ebenfalls keine Verbindung zwischen der ausgebildeten Struktur und der VP2 Expressionsrate ersichtlich. Während die Sekundärstruktur am 5'-Ende der VP2 kodierenden Sequenz also nur eine untergeordnete Rolle spielt, gibt es, wie weiter oben beschrieben, Hinweise, dass die Struktur von stromabwärts gelegenen Sequenzabschnitten durchaus von Bedeutung sein könnte.

Eine über diese Arbeit hinausgehende Aufklärung der Sekundärstruktur der VP2 kodierenden Sequenz mittels *RNA structure probing* könnte deshalb weitere Einblicke ermöglichen.

Interessant ist, dass beim RHDV ebenfalls ähnliche Effekte wie beim FCV beobachtet wurden, wenn auch nur mit einer geringeren Anzahl an Mutanten. Auch der fragliche Abschnitt der RHDV Sequenz ist in der Lage, eine Haarnadelstruktur auszubilden (Meyers, nicht publiziert). Wie bereits eingangs beschrieben, führten Deletionen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region zu einer sehr starken Erniedrigung der VP2 Menge. Durch die Deletionen kommt es aber teilweise sogar zur Ausbildung stabilerer Haarnadelschleifen im 5'-terminalen Bereich der VP2 kodierenden Sequenz. Auch hier ergibt sich somit keine klare Korrelation zwischen der Stabilität der Haarnadelformation und der Reinitiationsrate. Es ist aber auffällig, dass bei beiden Viren Veränderungen im fraglichen Bereich die VP2 Translation beeinflussen.

Auch die drei weiteren Genera *Noro-*, *Sapo-* und *Nebovirus* wurden betrachtet: Bei der Analyse der ersten 28 Nukleotide beginnend mit der Start/Stoppstelle bildete sich für jede untersuchte Virussequenz des jeweiligen Vertreters eine Haarnadelformation aus. Die Struktur des humanen

Norovirus (huNV) war ähnlich stabil wie die des FCV. Die Haarnadelschleife des Porcine Enteric Calicivirus (PEC, *Sapovirus*) besitzt wie die des RHDV eine äußerst hohe Stabilität. Beide sind deutlich stabiler als die Haarnadelformationen von FCV, huNV oder die des Virus des Newbury Agent-1, welche wiederum stabiler ist als die von FCV und huNV (Daten nicht gezeigt).

In der Literatur gibt es verschiedene Beispiele, welche funktionellen Auswirkungen die Ausbildung von RNA Strukturen haben kann: In Villordo und Gamarnik (2009) ist gezeigt, wie Interaktionen über weite Sequenzbereiche die Sekundärstruktur bedingen. Die dadurch entstandene Zirkularisierung des Genoms der Flaviviren beeinflusst letztendlich die RNA-abhängige RNA-Polymerase.

Ein anderes, besonders interessantes Beispiel ist das Pflanzenvirus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Es besitzt im Leaderbereich seiner 35S RNA mehrere kurze Leseraster, deren Translation Cap-abhängig durch *Leaky Scanning* und Translationsreinitiation erfolgt. Der 35S RNA Leaderbereich besitzt eine ausgeprägte Sekundärstruktur. Dabei kann es aufgrund der sich ausbildenden Haarnadelschleifen an zwei Positionen zum *Ribosome Shunting* kommen. Durch die Sekundärstruktur werden die „*shunt sequence*“ und die „Landesequenz“ in räumliche Nähe gebracht, wodurch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass ein Teil der Ribosomen einen Großteil der 35S RNA Leadersequenz überspringt und an der Landesequenz bindet (Ryabova *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001). Das CaMV ist daher ein Beispiel dafür, wie doppelsträngige Sequenzbereiche die Translationseffizienz beeinflussen können.

Die meisten *cis*-aktiven Sequenzelemente befinden sich in der 5'-nicht-translatierten Region. So, wie ein schlechter Sequenzkontext im sogenannten Kozak Motiv oder eine lange 5'-nicht-translatierte Region sich translationshemmend auswirken können, kann auch eine ausgeprägte RNA-Sekundärstruktur vor allem im 5'-Bereich die Translationsinitiation negativ beeinflussen. Vorstellbar ist, dass die Sekundärstruktur am 5'-Ende der VP2 kodierenden Sequenz dazu dient, die Menge an synthetisiertem VP2 zu regulieren. Weiterhin möglich ist auch, dass über die gesamte VP2 kodierende Sequenz doppelsträngige Bereiche ausgebildet werden, welche regulatorische Funktionen übernehmen und dadurch die VP2 Translationsrate modulieren. Ob diese Modulationen im Kontext der viralen Replikation wichtig sind, ist bisher nicht geklärt.

5.2 Bedeutung verschiedener Translationsinitiationsfaktoren für die Reinitiation

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss der VP2 kodierenden Sequenz und der Struktur möglicher RNA Sekundärstrukturelemente der subgenomischen FCV mRNA auf den Terminations/Reinitiations-Mechanismus analysiert wurden, sollten im zweiten Abschnitt die Anforderungen an die zelluläre Translationsmaschinerie näher untersucht werden.

Wie bereits anfangs erwähnt, zeichnen sich alternative Mechanismen der Translationsinitiation häufig dadurch aus, dass sie nicht alle klassischen Initiationsfaktoren benötigen. So stellt die interne Initiation der Translation einen Mechanismus dar, der unabhängig von einer Cap-Struktur und oft unter Verzicht auf verschiedene zelluläre Faktoren abläuft. Interne Ribosomen-Eintrittsstellen sind strukturelle RNA-Elemente mit cis-aktiver Funktion. Sie wurden erstmals bei Picornaviren beschrieben (Pelletier und Sonenberg, 1988). Es gibt verschiedene Typen von IRES Elementen, die sich in der Länge, der Struktur und weiteren Eigenschaften unterscheiden. Zelluläre IRESs dienen zumeist dazu, die Synthese lebensnotwendiger Proteine unter Stressbedingungen sicherzustellen, wenn die allgemeine Cap-abhängige Translationsinitiation herunterreguliert ist. Zu diesen Proteinen gehören sowohl solche, die die absolut essentiellen zellulären Prozesse aufrechterhalten, als auch Faktoren, die den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Darunter befinden sich Hitzeschockproteine, Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen (Hellen und Sarnow, 2001). Dahingegen sollen virale IRESs zunächst sicherstellen, dass überhaupt eine Translation in der Zelle stattfindet. In manchen Fällen ist die Cap-unabhängige Translation mittels IRES auch Voraussetzung für eine gezielte Blockierung der Translation zellulärer mRNAs. Virale IRESs wurden inzwischen bei den Picorna- und einigen Flaviviren sowie verschiedenen Insekten- (z.B. *Plantia stali intestine virus*) und Pflanzenviren gefunden (Balvay *et al.*, 2009; Kieft, 2008; Abb. 5.1).

IRES Elemente von Picornaviren werden aufgrund der Sequenz und struktureller Gemeinsamkeiten in mindestens zwei Gruppen (Typ 1/2) unterteilt: Eine Gruppe beinhaltet die IRESs von Entero- (Poliovirus, PV)- und Rhinoviren und die andere die von Cardio- (Encephalomyocarditis Virus, EMCV; Theiler's murine Encephalomyelitis Virus, TMEV) und Aphthoviren (*foot-and-mouth disease virus*, FMDV). Die RNAs aller Picornaviren besitzen eine lange 5'-nicht-translatierte Region mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur sowie einem Startkodon im 3'-Bereich der IRES vor einer pyrimidinreichen Region. Bei EMCV und TMEV stellt dieses Startkodon das Initiationskodon dar, wobei das Ribosom direkt (ohne einen *scanning* Prozess) daran bindet. Beim FMDV kommt es zusätzlich auch zur Translationsinitiation an einem stromabwärts gelegenen Startkodon. Für PV findet am Startkodon der IRES nur eine sehr uneffiziente Initiation statt. Die Translation startet hauptsächlich an einem anderen Startkodon, circa 160 Nukleotide weiter stromab. Wie die ribosomale Untereinheit diese Position erreicht, ist bisher unklar, möglicherweise durch *scanning* oder *shunting* (Hellen und Sarnow, 2001; Fernández-Miragall *et al.*, 2009). EMCV benötigt für die Translationsinitiation an der IRES alle Translationsinitiationsfaktoren mit Ausnahme des Cap-bindenden Faktors eIF4E und des N- und C-terminalen Fragmentes des Faktors eIF4G (Pestova *et al.*, 1996). Vom Cap-bindenden Komplex eIF4F sind der Faktor eIF4A und die zentrale eIF4G Domäne jedoch unabdingbar. Die IRES des PV benötigt vermutlich dieselben Faktoren. Aufgrund der hohen Abhängigkeit von den meisten zellulären Translationsinitiationsfaktoren erscheint die durch Picorna-ähnliche IRESs vermittelte Translationsinitiation als klassisch eukaryotisch (Belsham, 2009).

Eine dritte Gruppe bilden IRESs vom Typ 3, welche ähnlich sind zur IRES des Hepatitis-C-Virus (HCV). Im Vergleich zu Typ 1/2 IRESs benötigen diese nur wenige Translationsinitiationsfaktoren und die Translationsinitiation verläuft auf ähnliche Art und Weise wie bei den Prokaryoten. Zur Bildung des 48S-Komplexes ist keine Cap-Struktur nötig und es erfolgt auch kein *scanning*. Die Translationsinitiationsfaktoren eIF1, eIF1A und alle Untereinheiten von eIF4 (4A/4B/4E/4G) sind nicht notwendig, da die kleine ribosomale Untereinheit (40S) direkt über eine hochaffine Bindung mit der in der 5'-nichtranslatierten Region gelegenen IRES interagiert. Wie die „Shine-Dalgarno-Sequenz“ bei den Prokaryoten wird

dadurch der Translationsstart exakt definiert, das heißt die Bindung erfolgt so, dass sich das AUG in der P-Stelle des Ribosoms befindet. Über eine ebenso affine Interaktion wird der Translationsinitiationsfaktor eIF3 gebunden. Zusammen mit dem ternären Komplex bestehend aus eIF2, GTP und der Methionin beladenen tRNA entsteht so der 48S-Komplex (Lukavsky, 2009).

Die Eigenschaft der IRES Elemente, unabhängig von bestimmten Translationsinitiationsfaktoren zu initiieren, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit genutzt. Es sollte analysiert werden, welche Translationsinitiationsfaktoren die Translationsreinitiation bei der Synthese des kleinen Kapsidproteins des FCV benötigt. Da der Terminations/Reinitiations-Mechanismus auf die stromauf gelegene TURBS Sequenz angewiesen ist, muss der Reinitiation die Translation des 5'-terminalen Leserasters vorausgehen. Der genaue molekulare Mechanismus der Translationsreinitiation ist bisher nicht vollständig geklärt. Durch Luttermann und Meyers wurde 2009 gezeigt, dass die TURBS an die 18S rRNA bindet. Beim Erreichen der Start/Stoppstelle interagiert deshalb die kleine Untereinheit des translatierenden Ribosoms mit der TURBS. Dadurch wird das Ribosom vermutlich exakt an der Startstelle für die Translationsreinitiation positioniert. Ob eine Dissoziation der großen ribosomalen Untereinheit bei Beendigung der VP1 Synthese stattfindet oder welche Translationsinitiationsfaktoren für eine erfolgreiche Reinitiation benötigt werden, ist indes unbekannt. Um die Abhängigkeit der Reinitiation von einzelnen Translationsinitiationsfaktoren untersuchen zu können, musste die Translationsinitiation des ersten Leserasters vom jeweils betrachteten Faktor entkoppelt werden, da ohne Translation des stromauf gelegenen Leserasters keine Reinitiation erfolgen kann. Neben den oben beschriebenen IRESs existieren bekannterweise noch andere solche Strukturen bei verschiedenen Viren, die eine von allen Translationsinitiationsfaktoren unabhängige Initiation vermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde die *intergenic region* (IGR) IRES des *Cricket paralysis virus* (CrPV) aus der Familie der *Dicistroviridae* verwendet (Wilson *et al.*, 2000). Die IGR IRES vermittelte Translationsinitiation ist unabhängig von allen gängigen Translationsinitiationsfaktoren (Jan und Sarnow, 2002; Hertz und Thompson, 2011). Wird die entsprechende Sequenz am 5'-Ende des FCV ORF2 inseriert, sollte sie die Translation des VP1 ohne Translationsinitiationsfaktoren ermöglichen und damit die Analyse der Faktorabhängigkeit der Reinitiation erlauben. Der Vergleich der Effizienz diverser IRESs zeigte, dass die IGR IRES unter verschiedenen *in vivo* Bedingungen ähnlich gut oder besser als die HCV oder EMCV IRES die Translation einleitet (Carter *et al.*, 2008).

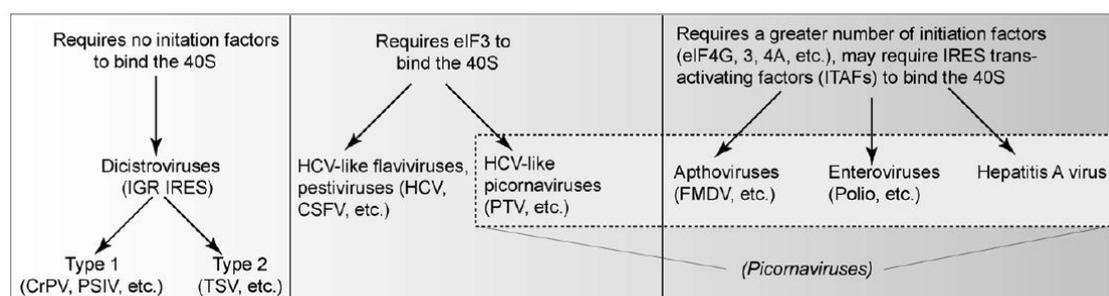


Abb. 5.1: Schematische Einteilung verschiedener IRESs aus Kieft (2008)

Die Abbildung veranschaulicht die Anforderungen, die unterschiedliche interne Ribosomen-Eintrittsstellen (*internal ribosome entry site*, IRES) bezüglich der Translationsinitiationsfaktoren aufweisen.

5.2.1 Reduktion der Menge einzelner Translationsinitiationsfaktoren durch RNA-Interferenz

Neben der Translationsinitiationsfaktor unabhängigen Expression des VP1 als Voraussetzung für die Reinitiation war für die Untersuchung die gezielte Reduktion der Menge einzelner Translationsinitiationsfaktoren erforderlich. Die noch relativ neue Methode der RNA-Interferenz (RNAi) schien eine gute Möglichkeit zu bieten, die Menge an einzelnen zellulären Translationsinitiationsfaktoren herabzusetzen, da sie sehr gut untersucht und universell einsetzbar ist (Agrawal *et al.*, 2003, Abschnitt 1.4), eine hohe Spezifität aufweist und die Möglichkeit für *in vivo* Versuche offen lässt. Die zunächst überzeugende Arbeit von Edgil *et al.* (2006) bot eine Ausgangsbasis, um mit der publizierten Methode nicht nur die Menge des bereits dort beschriebenen Translationsinitiationsfaktors eIF4E, sondern auch anderer Faktoren in analoger Weise zu reduzieren. Für die Faktoren eIF5A, eIF5 und eIF5B wurden die interferierenden Sequenzen mittels mehrerer Hilfsprogramme entworfen. Die Etablierung einer Zelllinie, welche stabil die shRNA Sequenz gegen einen Translationsinitiationsfaktor exprimiert, erschien nicht sinnvoll, weil die gesamte Proteinbiosynthese dadurch beeinträchtigt worden und die Zellen vermutlich sehr schnell gestorben wären (De Benedetti *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurden die shRNA Untersuchungen ausschließlich mit transienten Versuchsansätzen durchgeführt.

Die grundsätzliche Funktionalität der transient exprimierten shRNA Sequenzen bezüglich der Regulation der Genexpression auf Transkriptions- und Translationsebene konnte für alle vier hier untersuchten Faktoren 48 Stunden nach Transfektion der shRNA Plasmide nachgewiesen werden; der Effekt war nach 56 Stunden noch etwas höher. Der bei Edgil *et al.* (2006) beobachtete starke Einfluss der gegen eIF4E gerichteten shRNA auf die zelluläre Proteinsynthese wurde aber nicht annähernd erreicht. Dies ist bemerkenswert, da in den ersten Experimenten eine shRNA gegen eIF4E verwendet wurde, die einschließlich des Vektorrückgrats genau der in der oben genannten Publikation beschriebenen shRNA entsprach. Unklar bleibt, ob die beobachtete geringfügige Reduktion der Gesamtgenexpression spezifisch für die verwendete RNAi ist.

Aufgrund des unbefriedigenden Ergebnisses mit dieser einzelnen shRNA wurden weitere shRNAs entworfen und getestet. Für jeden Translationsinitiationsfaktor wurde im Weiteren ein shRNA Mix aus vier verschiedenen shRNAs verwendet. Dies lieferte etwas bessere Ergebnisse, der Effekt blieb jedoch gering.

Unterschiedliche unspezifische Effekte sind denkbar: Doppelsträngige RNA mit mehr als 30 Basenpaaren führt in der Zelle zur Induktion der Interferonsynthese. Das gebildete Interferon (IFN) stimuliert die Proteinkinase R (PKR), welche den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α phosphoryliert und damit inaktiviert. Der Translationsinitiationsfaktor eIF2 ist aufgrund seiner GTPase Aktivität verantwortlich für die GTP-abhängige Bindung der Methionin-beladenen Initiator-tRNA an die P-Stelle im Ribosom des 48S Initiationskomplexes. Die α Untereinheit wird als regulatorische Untereinheit bezeichnet. Durch die Inaktivierung von eIF2 wird die Translation erheblich eingeschränkt (Levin und London, 1978). Die ebenfalls durch IFN-aktivierte 2',5'-Oligoadenylatsynthetase aktiviert die Ribonuklease L, welche im Zuge der IFN-Antwort RNA degradiert. Auf diese Weise kann die doppelsträngige siRNA auch indirekt zur Reduktion der zellulären Proteinbiosynthese beitragen (Farrell *et al.*, 1978), indem andere, die Translation beeinträchtigende Reaktionen aktiviert werden, die nicht auf die Reduktion der Menge der verfügbaren Initiationsfaktoren zurückzuführen sind.

Voraussetzung für eine erhebliche Reduktion bestimmter Faktoren im RNAi System *in vivo* ist eine hohe Transfektionseffizienz der shRNA Konstrukte. Die shRNA Plasmide wurden hier durch Lipofektion in die Zellen transferiert (Mamane *et al.*, 2007; Jahan *et al.*, 2011) und diese 48 Stunden inkubiert. Die Transfektionseffizienz lag dabei im Durchschnitt bei über 70%.

5.2.2 Bedeutung der Translationsinitiationsfaktoren

Um den Einfluss der jeweiligen Translationsinitiationsfaktoren untersuchen zu können, wurden diese wie im vorherigen Abschnitt beschrieben mittels RNAi reduziert.

Der gesamte Versuchsansatz sah demnach wie folgt aus: Die Zellen wurden zuerst mit den shRNA Plasmiden transfiziert und danach 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Infektion mit dem Vacciniavirus MVA-T7 und dann wurden die Expressionskonstrukte transfiziert. Durch die 30 minütige metabolische Markierung der gebildeten Proteine vier Stunden nach der Transfektion konnten schlussendlich VP1 und VP2 im SDS-Gel detektiert und quantifiziert werden.

Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion der kleinen ribosomalen Untereinheit mit dem Motiv 1 der TURBS (Luttermann und Meyers, 2009) bleibt diese vermutlich nach der Termination und bis zur Reinitiation an die mRNA gebunden. Das bedeutet, die 40S Untereinheit muss nicht neu an die mRNA rekrutiert werden und weder eine Cap-Struktur noch der Cap-bindende Translationsinitiationsfaktor eIF4E wären demnach nötig. Daher erscheint ein Einfluss des Translationsinitiationsfaktors eIF4E auf die VP2 Expression eher unwahrscheinlich.

Eine Reduktion der verfügbaren Menge des Translationsinitiationsfaktors eIF4E senkte die VP2 Translationsrate bezogen auf die Menge an VP1 höchstens auf 90%. Wie erwartet, ist der Cap-bindende Translationsinitiationsfaktor eIF4E daher weder im Cap-abhängigen noch im IRES vermittelten Translationssystem von Bedeutung für die Reinitiation.

Die Ergebnisse für den Translationsinitiations- und Translationselongationsfaktor eIF5A waren widersprüchlich: Sowohl im Cap-abhängigen als auch im IRES vermittelten Translationssystem wird die VP2 Menge durch eine Verringerung der eIF5A Menge nicht signifikant verändert. Weder in der Rolle als Translationsinitiations- noch als Elongationsfaktor beeinflusst eIF5A die VP2 Synthese. Die Reduktion der eIF5A Proteinmenge durch die Transfektion der shRNA Plasmide auf 30-50% reichte demnach nicht aus, um zumindest den erwarteten Einfluss von eIF5A als Elongationsfaktor nachzuweisen.

Während die Reduktion der Menge der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E und eIF5A keine Auswirkung auf die translatierte VP2 Menge hatte, sind für die Faktoren eIF5 und eIF5B im Cap-abhängigen Testsystem Effekte erkennbar. Da die oben präsentierten Werte bereits auf die VP1 Synthese normiert sind, ergibt sich eine Reduktion der VP2 Menge um circa 26% für die eIF5 Reduktion und um etwa 37% bei der Verringerung von eIF5B. Die Ergebnisse mit Hilfe des Cap-abhängigen Untersuchungskonstrukts deuten auf einen potentiellen Einfluss der Translationsinitiationsfaktoren eIF5 und eIF5B auf die FCV VP2 Translationsreinitiation hin. Auffallend sind jedoch die hohen Standardabweichungen, die eindeutige Aussagen nur sehr bedingt zulassen. Die Frage, ob während der Reinitiation eIF5 für die Bindung der neuen Methionin beladenen Initiator-tRNA und eIF5B für die Bindung der 60S Untereinheit notwendig sind, bleibt daher offen.

Der Translationsinitiationsfaktor eIF5 ist normalerweise nötig, um die GTPase eIF2 zu aktivieren. Die GTP-Spaltung wiederum ist die Voraussetzung für die Bindung der Methionin beladenen Initiator-tRNA an die ribosomale P-Stelle des 48S Initiationskomplexes.

Außerdem ist vorstellbar, dass die 60S Untereinheit des Ribosoms bei der Termination der VP1 Translation dissoziiert und daher während der Reinitiation neu an die mRNA herangeführt werden muss. Dies würde die Bedeutung des Translationsinitiationsfaktors eIF5B erklären.

Sowohl für die Reduktion von eIF5 als auch von eIF5B konnte im Cap-abhängigen Testsystem zwar im Verhältnis zur VP1 Produktion eine überproportionale Abnahme der VP2 Menge gezeigt werden, dennoch bleiben Zweifel an der Aussagekraft dieser Daten bestehen.

Zur Absenkung der Konzentration der Translationsinitiationsfaktoren eIF2B und eIF3 mittels RNAi wurden ebenfalls shRNAs entworfen. Der Nukleotidaustauschfaktor (*nucleotid exchange factor*, GEF) eIF2B ist ein Heteropentamer und verantwortlich für die Dissoziation von eIF2 und GDP. Gegen die Untereinheiten 2 (regulatorische Untereinheit) und 5 (katalytische Untereinheit) wurden shRNAs entwickelt. Für den aus 13 Untereinheit bestehenden Multi-Proteinkomplex eIF3

richten sich die geplanten shRNAs gegen die mRNA, die für die Untereinheit eIF3b kodiert. Diese wurde willkürlich ausgewählt. Der Translationsinitiationsfaktor eIF3 ist notwendig für die Bindung der mRNA an den 43S-Präinitiationskomplex sowie für das Recycling von Ribosomen nach der Termination der Translation (Pisarev *et al.*, 2007). Letzteres lässt ihn für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus besonders interessant erscheinen. Die Auswirkung der Reduktion der Translationsinitiationsfaktoren eIF2B und eIF3 auf die VP2 Translationsreinitiation konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr untersucht werden.

5.2.3 Cap-unabhängige und -abhängige VP1-Synthese

Die VP1 Translation als Voraussetzung für die Reinitiation sollte unabhängig von der Cap-Struktur durch die IGR IRES vermittelt werden, wodurch eine gleichbleibende VP1 Expression gewährleistet werden würde. Somit sollte es ermöglicht werden, ausschließlich die Wirkung der vier zu untersuchenden Initiationsfaktoren auf die VP2 Translationsinitiation zu analysieren.

Die synthetisierten Proteine wurden metabolisch über 30 Minuten markiert. VP1 und VP2 wurden immunpräzipitiert und im SDS-Gel aufgetrennt, detektiert und quantifiziert. Die VP2 Menge wurde anhand der VP1 Menge normiert, welche wie beschrieben immer gleich bleiben sollte, da die VP1 Translation unabhängig von den reduzierten Translationsinitiationsfaktoren durch die IGR IRES vermittelt werden sollte.

Zu Beginn eines Versuches betrug die Konfluenz der Zellen circa 75%, um die erforderliche hohe Transfektionseffizienz zu gewährleisten. Nach 48stündiger Inkubation mit den shRNA Plasmiden waren die Zellen zu 100% konfluent und die restliche Versuchsdauer betrug noch circa 24 Stunden. Eine längere Inkubationszeit mit den shRNA Plasmiden hätte aufgrund der räumlichen Enge zu einem großen Zellstress geführt, wodurch die Anzahl an toten Zellen in der Zellkulturschale stark gestiegen wäre. Die Zellreste sowie die bei der Lyse der Zellen freigesetzten Botenstoffe hätten die Zellkultur weiterhin belastet. Obwohl nach 56 Stunden eine höhere Wirkung der RNAi zu erwarten war, wurde das Experiment deshalb bereits nach 48 Stunden fortgesetzt.

Die Zellen wurden für eine Stunde mit dem Vacciniavirus MVA-T7 infiziert. Ein Vorteil der T7-RNA-Polymerase-basierten Expression war die Transkription im Zytoplasma, wodurch Modifikationen oder ein Spleißen der mRNA vermieden werden. Vacciniavirus MVA-T7 transkribierte mRNAs werden im Zytoplasma durch das viral kodierte Capping Enzym mit einer Cap-Struktur versehen und außerdem polyadenyliert, wodurch sie wirtszellspezifischen mRNAs ähneln. Vacciniavirale mRNAs brauchen aber beispielsweise den Translationsinitiationsfaktor eIF4F, den Cap-bindenden Komplex, nur bedingt (Mulder *et al.*, 1998). Dies unterstützte den Ansatz, eine Translationsinitiationsfaktor unabhängige VP1 Synthese zu erreichen.

Wie schon in Geissler *et al.* (1999) beschrieben, führte die Infektion mit Vacciniavirus MVA-T7 zu der notwendigen, deutlichen Steigerung der VP1 und der damit verbundenen VP2 Translation, so dass eine VP2 Detektion überhaupt möglich wurde. Durch die also nicht zu umgehende Vacciniavirus MVA-T7 Infektion wurde das Testsystem noch deutlich komplexer. Neben der Translation zellulärer mRNAs waren auch die möglichen negativen Nebeneffekte bei der Translation vacciniaviraler mRNAs in Betracht zu ziehen.

Die nach der Infektion mit MVA-T7 Viren transfizierten Plasmide kodierten für die subgenomische FCV Sequenz unter der Kontrolle der IGR IRES. Dadurch sollte eine Translationsinitiationsfaktor unabhängige Translation des VP1 gewährleistet werden. Zur Kontrolle wurden zwei Plasmide verwendet, bei denen die IGR IRES deletiert oder durch die EMCV IRES ersetzt worden war. Obgleich die IGR IRES vermittelte VP1 Translation sowohl Cap- als auch Faktor-unabhängig vonstattengehen sollte, wurde ein Einfluss der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF5 und eIF5B beobachtet, analog zum Cap-abhängigen Kontrollkonstrukt, bei dem die IGR IRES deletiert worden war. Es gibt RNAs, die Cap-abhängig

wie -unabhängig translatiert werden können, wobei die Verfügbarkeit der Translationsinitiationsfaktoren bestimmt, welche Initiation bevorzugt wird (Svitkin *et al.*, 2005). Die 5'-nicht kodierende Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte ließ jedoch keine Cap-abhängige Translationsinitiation zu. Damit bleibt unklar, wie die Translationsinitiation des IGR IRES Konstrukts tatsächlich erfolgte. Es bleibt aber festzuhalten, dass die VP1 Translation durch die Manipulationen beeinflusst wurde und somit die Effizienz der VP2 Reinitiation schwierig zu bewerten ist.

5.2.4 Alternative Ansätze

Die bisher erhobenen Daten resultierten aus *in vivo* Versuchen, die in BHK-Zellen durchgeführt wurden. Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz zur Untersuchung der Abhängigkeit der Reinitiation von verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren stellte die vielversprechendste Möglichkeit dar, weil ein *in vivo* Testsystem den natürlichen Gegebenheiten am nächsten kommt. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist die RNAi eine gut untersuchte und effektive Methode zur spezifischen Reduktion der Menge einzelner Genprodukte.

Bedauerlicherweise konnte für keinen der getesteten Translationsinitiationsfaktoren eine klare Abhängigkeit der VP2 Translation von dessen Anwesenheit gezeigt werden. Zusammengefasst erschwerten mehrere Probleme die Analysen: Aufgrund der geringen Reinitiationsfrequenz von nur circa 5% für FCV war es notwendig die VP1 abhängige Expression des VP2 mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase zu verstärken. Trotzdem lagen die Signale teilweise am Rande der Detektierbarkeit, worauf vermutlich auch die hohen Standardabweichungen der gemessenen VP2 Signale zurückzuführen sind. Diese Schwierigkeit wird sich auch mit anderen Versuchsansätzen nicht lösen lassen. Weiterhin konnte zwar die Auswirkung der Transfektion der shRNA auf die Ziel-mRNAs und die davon kodierenden Plasmide für die betreffenden Proteine gezeigt werden, die Gesamtproteinexpression war durch die Depletion einzelner Translationsinitiationsfaktoren aber kaum betroffen. Dies lässt vermuten, dass die Halbwertszeit der einzelnen Faktoren relativ hoch ist, was sich auch in den Ergebnissen der Experimente zur Wirkung der shRNA widerspiegelte, bei denen im Western Blot nur eine schwache Abnahme der Gesamtmenge der untersuchten Translationsinitiationsfaktoren nach Transfektion der shRNA kodierenden Plasmide gezeigt werden konnte. Möglich ist, dass die residuale Menge an Faktor nach Transfektion der shRNA Plasmide ausreicht, um die zelluläre Gesamtproteinsynthese in weitgehend normalem Maße aufrechtzuerhalten. Erstaunlich und unerwartet war außerdem, dass auch im Ansatz der IRES vermittelten VP1 Translation diese nicht unabhängig von der Menge der verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren zu sein scheint. In diesem Testsystem wurde das Startkodon des VP1 substituiert und die Translation konnte daher nur am Initiatorcodon (Alanin) der IGR IRES starten. Dennoch beeinflusste die Depletion der Faktoren eIF4E und eIF5B die VP1 Translationsinitiation erheblich. Dieser Punkt ist auf Basis der vorliegenden Daten nicht zu erklären.

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse der RNAi Untersuchungen wurde nach alternativen Möglichkeiten zur Untersuchung des Problems gesucht. Neben der in dieser Arbeit vorgestellten Herangehensweise zur Bestimmung der für die Reinitiation erforderlichen verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren mittels RNAi sind mehrere andere Analysemethoden denkbar.

In einem anderen Ansatz wurden erste Vorversuche zur *in vitro* Analyse unternommen. Auf ähnliche Weise konnten Pöyry *et al.* (2007) *in vitro* nachweisen, dass sowohl eIF3 als auch die 40S Untereinheit für die Reinitiation nötig sind. Dabei nutzten sie teilweise ein IGR IRES Konstrukt, das dem hier beschriebenen sehr ähnlich war. In der hier vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Cap-abhängige Translation durch einen Antikörper gegen den Translationsinitiationsfaktor eIF4E im Retikulozytenlysat spezifisch inhibiert werden kann. In einem weiteren Experiment konnte dies bestätigt und außerdem dargestellt werden, dass die

Translation auch durch spezifische Antikörper gegen eIF5A und eIF2B2 eingeschränkt wird. Ein Zusatz von 1µl spezifischem eIF4E Antikörper zum Retikulozytenlysate verminderte die VP1 Translation deutlich. Bei Zugabe von 2µl eIF4E Antikörper konnte kaum noch VP1 nachgewiesen werden. In allen Fällen bleibt jedoch auch hier das Problem bestehen, dass aufgrund der Abhängigkeit der VP2 Menge von der VP1 Translation im zu untersuchenden System mit der Abnahme der VP1 Synthese auch immer eine Verminderung der VP2 Menge einhergeht. Für die weitere *in vitro* Analyse bedeutet das, dass ein Konstrukt erforderlich ist, welches Faktor unabhängig die VP1 Translation initiiert. Ob dies ein auf der IGR IRES basierendes System, wie in den *in vivo* Untersuchungen dieser Arbeit verwendet, leisten kann, ist unklar.

Neben der Depletion einzelner Faktoren ist ebenso ein System denkbar, in dem alle Faktoren bereits depletiert sind und anschließend entsprechend dem Versuchsansatz wieder einzeln zugesetzt werden. Dieses, verwendet durch Pöyry *et al.* (2007), ist gegenüber *in vivo* Untersuchungen artifizieller und deutlich aufwendiger zu etablieren. Andererseits lässt es sich aber leichter beeinflussen und liefert eventuell bessere Ergebnisse, weil der zu untersuchende Faktor vollständig fehlt.

Eine weitere vermutlich einfache Alternative zu den *in vivo* und *in vitro* Ansätzen wäre der Einsatz von Inhibitoren der Translationsinitiation wie in ersten Vorversuchen in dieser Arbeit bereits geschehen. Die hier bereits verwendeten Stoffe NSC119889 und Edein sind Translationsinitiationsinhibitoren. Mit Hilfe von NSC119889 könnte die Abhängigkeit der Reinitiation vom Faktor eIF2 geprüft werden, da NSC119889 für die Dissoziation des eIF2 von der methylierten Initiator-tRNA verantwortlich ist. Durch Edein ließe sich untersuchen, ob die Reinitiation vom *scanning* der Ribosomen abhängig ist, da Edein die 40S Bindung an den ternären Komplex und das *scanning* des Präinitiationskomplexes inhibiert (Pöyry *et al.*, 2007). Beide Inhibitoren wurden zum *in vitro* Ansatz hinzugegeben. Sowohl für NSC119889 als auch für Edein konnte im ersten Vorversuch wie erwartet eine Abnahme der Cap-abhängigen VP1 Synthese detektiert werden. Infolge der ebenfalls stark verminderten VP2 Translation muss hier gleichfalls ein Konstrukt etabliert werden, bei dem eine konstant hohe Menge VP1 exprimiert wird, so dass die durch NSC119889 oder Edein beeinflussten VP2 Level detektiert und mit dem Wildtyp verglichen werden können.

Die Inhibition des Translationsinitiations-, Elongations- und Terminationsfaktors eIF5A wäre eventuell mit einem Sordarin-Derivat möglich. Sordarin inhibiert unter anderem die Proteinsynthese bei Pilzen, indem es den Elongationsfaktor eEF2 beeinflusst (Domínguez *et al.*, 1999). Da der Elongationsfaktor eEF2 der Pilze dem Faktor eIF5A in höheren Zellen entspricht, ist eine Inhibition von eIF5A durch ein Sordarin-Derivat denkbar.

Die Cap-abhängige Translationsinitiation bzw. die Rolle des Cap-bindenden Translationsinitiationsfaktors eIF4E kann mit Hilfe spezieller Proteasen von Picornaviren untersucht werden, welche für den viralen *host shutoff* Mechanismus verantwortlich sind. Die entero- und rhinovirale Proteinase 2A sowie die aphthovirale Proteinase L spalten eIF4G, wodurch die Cap-abhängige Translationsinitiation behindert wird. Durch diese Proteolyse entstehen ein N-terminales eIF4G Fragment, das sowohl mit eIF4E als auch mit dem Poly(A)-Bindeprotein (PABP) interagieren kann, und ein C-terminales Spaltstück, welches in der Lage ist, mit eIF4A und eIF3 zu interagieren. Die 5'-Cap-abhängige Translationsinitiation ist nicht mehr möglich, da durch die Spaltung des Adapterproteins eIF4G die Verbindung zwischen der 5'-Cap-Struktur und dem des 43S Präinitiationskomplexes unterbrochen wird (Lamphear *et al.*, 1993, 1995; Gradi *et al.*, 1998). Dies kann in einem ähnlichen System, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, geprüft werden, indem ein zusätzliches, für die Protease kodierendes Plasmid transfiziert wird. Die VP1 Translation wäre aufgrund der IRES Cap-unabhängig und die VP2 Reinitiation könnte betrachtet werden. (Sanz *et al.*, 2009)

Ein Hemmstoff für die Aktivität der RNA-Helikase eIF4A ist das Korallen-Steroid Hippuristanol (Bordeleau *et al.*, 2006; Lindqvist und Pelletier, 2009).

Neben den auf dem Einsatz von Inhibitoren basierenden Ansätzen sind auch anders aufgebaute Messsysteme vorstellbar. Anstatt der Immunpräzipitation wäre eine Detektion durch einen Luziferase-Reporterassay möglich, welches vielleicht eine sensitivere Detektion der VP2 Menge zuließe. Die Expression in Hefekulturen könnte ein alternatives eukaryotisches System darstellen. Es existieren verschiedene Hefestämme, in denen jeweils einzelne Translationsinitiationsfaktoren mutiert sind. Mit diesen konnte bereits gezeigt werden, dass die IGR IRES ebenfalls in Hefe unabhängig von Translationsinitiationsfaktoren eine Translationsinitiation bewirken kann (Deniz *et al.*, 2009). Durch die Verwendung der verschiedenen Hefestämme mit Depletion einzelner Faktoren könnte deren Bedeutung für die Reinitiation analysiert werden. Das Hefe-adaptierte Testkonstrukt sollte wiederum auch eine IGR IRES enthalten, die die Faktorunabhängigkeit der VP1 Translationsinitiation gewährleistet.

5.2.5 Modellmechanismus der Reinitiation

Bisher konnte für den Translationsinitiationsfaktor eIF3 durch Pöyry *et al.* (2007) gezeigt werden, dass er für die Reinitiation unabdingbar ist. In Luttermann und Meyers (2007) wurde nachgewiesen, dass die VP2 Translation nicht vom einem Methionin als Initiatorcodon abhängig ist, aber die Translation dennoch zumindest zum allergrößten Teil mit einem Methionin als erster Aminosäure startet. Daraus lässt sich ableiten, dass auch der Translationsinitiationsfaktor eIF2 notwendig ist für die Reinitiation, da er die mit Methionin beladene Initiator-tRNA an die P-Stelle des Ribosoms heranführt.

Über weitere Faktoren ist bis dato nichts bekannt. Ebenso ist unklar, warum Caliciviren sich eines komplizierten Sonderweges der Translationsinitiation für das VP2 bedienen. Möglicherweise ist eine definierte VP2 Menge wichtig, aber da die natürliche Funktion des VP2 bislang nicht geklärt und seine Bedeutung weiterhin offen ist, kann dieser Punkt im Moment nicht beantwortet werden.

Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse liefern eine erste Idee, wie die Reinitiation ablaufen könnte (Abb. 5.2): Vieles spricht dafür, dass der Cap-bindende Komplex eIF4F nicht notwendig ist, da das Ribosom durch die Bindung zwischen 18S rRNA und dem Motiv 1 der TURBS an die mRNA gebunden bleibt und zudem am Startcodon positioniert wird. Eine Abhängigkeit der Reinitiation vom Cap-bindenden Translationsinitiationsfaktor eIF4E konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Ob die RNA-Helikase eIF4A, deren Aktivität durch die Bindung an das Gerüstprotein eIF4G, welches wiederum mit eIF3 interagiert, noch gefördert wird, eine Rolle spielt, ist fraglich. Die Frage, ob eIF4G und insbesondere eIF4A für die Reinitiation nötig sind, ist daher ein spannender Aspekt für weitere Untersuchungen.

Für die Faktoren eIF5 und eIF5B wurden in dieser Arbeit erste Hinweise gefunden, dass sie für die Reinitiation essentiell sind. Der Faktor eIF5 aktiviert die weiter oben erwähnte GTPase eIF2. Die mögliche Erfordernis von eIF5 und die nachgewiesene Abhängigkeit vom Initiator-methionin unterstützen die These, dass eIF2 notwendig ist. In diesem Modell dissoziiert die große ribosomale Untereinheit nach Beendigung der VP1 Synthese und muss daher anschließend mit Hilfe des Translationsinitiationsfaktors eIF5B neu an den Translationskomplex herangeführt werden. Erste Anhaltspunkte dafür lieferten die Daten aus den RNA-Interferenz Studien. Deshalb und wegen der Aufgabe, andere Translationsinitiationsfaktoren mittels seiner GTPase Aktivität freizusetzen, scheint eIF5B ebenfalls für die Reinitiation erforderlich zu sein.

Die Funktion möglicher Sekundärstrukturen der RNA innerhalb der VP2 kodierenden Sequenz ist nicht bekannt und sollte weitergehend analysiert werden.

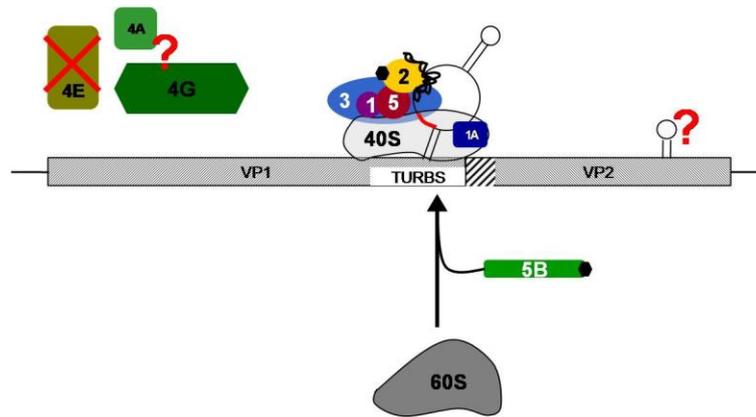


Abb. 5.2: Modell des Reinitiationsmechanismus
 modifiziert nach Preiss und Hentze (2003)

Die Abbildung veranschaulicht den Schritt der Reinitiation zur Expression des VP2. Dabei ist die Bindung zwischen der 18S rRNA und dem Motiv 1 der TURBS mit einer roten Linie gekennzeichnet. Eine Beteiligung des Capbindenden Faktors eIF4E wird in diesem Modell ausgeschlossen. Die Rolle von eIF4A, eIF4G sowie eIF1 und eIF2 ist unklar. Für den Translationsinitiationsfaktor eIF3 ist bekannt (Pöyry *et al.*, 2007) bzw. für eIF5 wird angenommen, dass sie für die Reinitiation von Bedeutung sind. Um die große ribosomale Untereinheit erneut an den Translationskomplex heranzuführen ist in diesem Modell auch eIF5B notwendig. Der nachgewiesene Einfluss der VP2 kodierenden Sequenz am 5'-Ende ist durch einen schraffierten Bereich dargestellt. Die mögliche modulierende Wirkung von Sekundärstrukturen am 3'-Ende der VP2 kodierenden Sequenz soll durch die Haarnadelstruktur symbolisiert werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich das hier benutzte *in vivo* System zur Identifizierung der zellulären Faktoren, die für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus erforderlich sind, als äußerst komplex herausgestellt hat und nur bedingt Schlussfolgerungen erlaubte. Für darüber hinausgehende Untersuchungen ist es daher naheliegend auf *in vitro* Versuche zurückzugreifen.

Zusammenfassung

Die Familie der *Caliciviridae* umfasst human- und tierpathogene, nicht umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA Genom positiver Polarität. Die caliciviralen Strukturproteine werden ausgehend von einer subgenomischen RNA translatiert, die zwei überlappende Leserahmen enthält. Das erste Leseraster kodiert für das Hauptkapsidprotein VP1 und das zweite für das minore Kapsidprotein VP2. Die Translation der VP2 Proteine des *Felinen Calicivirus* (FCV) und des *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus* (RHDV) wird durch Reinitiation initiiert. Die *Termination Upstream Ribosomal Binding Site* (TURBS) am 3'-Ende der VP1 kodierenden Sequenz ist essentiell für die Reinitiation zur VP2 Synthese. In dieser Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen zum Terminations/Reinitiations-Mechanismus vorgenommen.

Um Anhaltspunkten nachzugehen, die nahelegten, dass 5'-terminale Sequenzen der VP2 kodierenden Region des FCV für die Reinitiation von Bedeutung sind, wurden im ersten Teil dieser Arbeit Sequenzen stromab der Start/Stoppreion in transienten Expressionsstudien analysiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Mutationen innerhalb der Start/Stoppstelle zu sehr unterschiedlichen VP2 Expressionsleveln führten. Des Weiteren wurden neben dem „Wildtyp“ Stoppkodon #1 die drei anderen Stoppkodone stromab der Start/Stoppstelle untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass das „Wildtyp“ Stoppkodon #1 nicht überlesen wird und das Stoppkodon #4 keine Funktion besitzt. Die Rolle von Stoppkodon #2 und #3 bleibt aber weiterhin unklar, da manche Veränderungen der Stoppkodone #2 und #3 die VP2 Expression erniedrigten, andere aber die Reinitiationsrate erhöhten. Nachdem die unterschiedlichen Expressionslevel nicht durch die Primärsequenz erklärt werden konnten, wurde die potentielle Sekundärstruktur analysiert. Hierbei wurde kein definiertes Motiv gefunden, das über längere Sequenzabschnitte der FCV RNA hinweg mit der Start/Stoppreion interagiert. Auffällig bei *in silico* Sequenzanalysen war jedoch eine Haarnadelformation am 5'-Ende der VP2 kodierenden Sequenz des FCV. Bei gleichartigen *in silico* Analysen für RHDV wurde eine ähnliche Haarnadelschleife mit noch größerer Stabilität gefunden. Eine eindeutige Verbindung zwischen Lage und Stabilität dieser Sekundärstruktur und der VP2 Expression war indes nicht erkennbar. Denkbar wäre, dass diese Struktur nicht notwendig ist, aber die Abbremsung des translatierenden Ribosoms kurz vor Erreichen der Start/Stoppstelle und den Prozess der Reinitiation fördert und dadurch die Reinitiationsrate steigern kann. Eine deutlich erhöhte Stabilität der Haarnadelschleife schien dagegen das Ribosom zu behindern und damit die Reinitiation zu reduzieren. Letztlich bleibt festzuhalten, dass die VP2 kodierende Sequenz signifikant die Reinitiationsrate beim FCV beeinflusste. Ein klares Modell zum molekularen Mechanismus, der diesem Effekt zu Grunde liegt, ließ sich jedoch weder bezüglich der primären Sequenz noch der ermittelten Sekundärstruktur ableiten.

Obwohl alternative Mechanismen der Translationsinitiation oft nur einen Teil der üblichen Translationsinitiationsfaktoren erfordern, bedarf die Reinitiation vermutlich einer ganzen Reihe zellulärer Faktoren. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden daher mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) gezielt einzelne Translationsinitiationsfaktoren *in vivo* ausgeschaltet, um damit ihren Einfluss auf die Reinitiation bei der Synthese des VP2 des FCV zu untersuchen. Bei diesen Analysen wurde eIF4E als Kontrolle genutzt, da eine starke Reduzierung des Faktors mittels RNAi bereits publiziert war. Zusammen mit den Translationsinitiationsfaktoren eIF5B, eIF5 und eIF5A wurde eIF4E mittels shRNA herunterreguliert und anschließend beobachtet, inwieweit die VP2 Expression beeinflusst wurde. Es konnte gezeigt werden, dass das Level der für die fraglichen Translationsinitiationsfaktoren kodierenden mRNA nach Transfektion des jeweiligen shRNA Plasmid Mixes deutlich sank. Die zelluläre Proteinsynthese wurde durch diese Behandlung aber nur mäßig reduziert. Trotz der nur kleinen Effekte auf die Gesamtproteinsynthese wurden die Auswirkungen der herabgesetzten Verfügbarkeit der Translationsinitiationsfaktoren auf die VP2 Expression untersucht. Jedoch reduzierte der Mangel an Translationsinitiationsfaktoren die Cap-abhängige VP1 Translation so stark, dass die VP2

Synthese auf ein nicht mehr eindeutig zu quantifizierendes Maß sank. Das hier benutzte *in vivo* System zur Identifizierung der zellulären Faktoren, die für den Terminations/Reinitiations-Mechanismus erforderlich sind, hat sich als äußerst komplex herausgestellt und erlaubte nur bedingt Schlussfolgerungen. Es konnte keine eindeutige Aussage über den Einfluss der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF5A, eIF5 und eIF5B auf die Reinitiation getroffen werden. In der Endphase dieser Arbeit wurden daher erste *in vitro* Versuchsansätze unternommen.

Die in dieser Doktorarbeit vorgestellten Daten zeigen, dass neben der TURBS vermutlich noch eine Reihe weiterer Faktoren wie die Sequenzen in der Nachbarschaft der Start/Stoppstelle und Sekundärstrukturelemente den Terminations/Reinitiations-Mechanismus beeinflussen. Die Arbeiten ergaben zudem Hinweise auf eine Rolle einzelner Translationsinitiationsfaktoren bei diesem Prozess, die aber aufbauend auf den zuletzt getesteten Methoden weiter untersucht werden muss.

Summary

The family of the *Caliciviridae* comprises a group of non-enveloped viruses with a single stranded RNA genome of positive polarity which represents important human and animal pathogens. The caliciviral structure proteins are translated from a subgenomic RNA containing two overlapping open reading frames (ORF). The upstream ORF codes for the major capsid protein VP1 whereas the minor capsid protein VP2 is encoded by the downstream ORF. VP2 expression in *Feline Calicivirus* (FCV) and *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus* (RHDV) is initiated by translation reinitiation. The *Termination Upstream Ribosomal Binding Site* (TURBS) located at the 3'-end of the VP1 coding sequence is essential for reinitiating VP2 synthesis. In the present work the termination/reinitiation mechanism was further analyzed.

Former results indicated that the 5'-terminal region of the VP2 coding sequence plays a critical role for FCV reinitiation. To follow this up in detail the influence of mutations in sequences downstream of the start/stop site was analyzed by transient expression studies in the first part of this work. Such mutations were found to have a strong effect on VP2 expression levels. Among the tested mutations those affecting number or position of stop codons located downstream of the start/stop site but in the VP1 coding ORF had striking effects on VP2 expression. These results were not due to a read through occurring at the wildtype stop codon #1. Importantly, some of the tested reduced the expression level whereas others increased the reinitiation rate. Since the different levels of expression could not be explained by the primary sequence, the potential role of secondary structures was analyzed. Attempts to identify structures depending on long distance interactions failed. By *in silico* analyses, a hairpin formation at the 5'-end of the VP2 coding FCV sequence was detected. Analog *in silico* studies for RHDV yielded an even more stable hairpin at similar position. However, a direct link between location and stability of this secondary structure and the VP2 expression rate was not found. Nevertheless, formation of this hairpin might be necessary to slow the translating ribosome before reaching the start/stop site and thereby supporting the process of reinitiation by higher reinitiation rates. Though a clearly increased stability of the hairpin seems to hamper the ribosome and leads to reduced levels of reinitiation. In summary the VP2 coding sequence significantly influences reinitiation in FCV. An obvious model of the molecular mechanism which these effects are based on was neither derived from the primary sequence nor from the secondary structure predictions.

Although alternative mechanisms of translation initiation often only require part of the regular translation initiation factors also reinitiation can be hypothesized to need a lot of cellular factors. To get an impression of initiation factor requirement for VP2 expression, single translation initiation factors were knocked down *in vivo* by RNA interference (RNAi) in the second part of this work. The *in vivo* system employed here for identification of the cellular factors that are necessary for the termination/reinitiation mechanism turned out to be extremely complex and allowed only limited conclusions. Knock down of eIF4E was used as a control as a high reduction of this factor by RNAi had already been published before. In addition, the translation initiation factors eIF5B, eIF5 and eIF5A were down regulated by shRNA. It was shown that the mRNA levels of the selected translation initiation factors were considerably decreased after transfection of the respective shRNA plasmids. Nevertheless, the cellular protein synthesis was only moderately reduced by this treatment. Despite of the small effects on the entire protein synthesis, the influence of the reduced availability of translation initiation factors on the VP2 expression was analyzed. But the lack of translation initiation factors decreased the canonical VP1 translation in a way that VP2 synthesis was reduced to level preventing a reproducible quantification of VP2 expression. Accordingly, a definite statement about the influence of the translation initiation factors eIF4E, eIF5A, eIF5 and eIF5B on reinitiation could not be made. To cope with these problems first steps towards establishments of *in vitro* test systems were made in the final stage of this work.

Taken together, the results presented here demonstrate that next to the TURBS probably a series of other parameters like sequences in close proximity to the start/stop site and secondary structure elements influence the termination/reinitiation mechanism. Moreover first hints of a role of several translation initiation factors in this process were received which based on the last tested methods have to be further investigated.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	EM-Aufnahme eines aufgereinigten FCV-Partikels	3
Abb. 1.2	Genomorganisation der Mitglieder der Familie <i>Caliciviridae</i>	5
Abb. 1.3	FCV Genomorganisation	6
Abb. 1.4	Schematischer Überblick über den Ablauf der eukaryotischen Translationsinitiation	10
Abb. 1.5	Terminations/Reinitiations-Mechanismus	12
Abb. 1.6	Mechanismus der RNA-Interferenz	14
Abb. 2.1	Vektorkarte des pCH1 Expressionsplasmids	35
Abb. 2.2	Vektorkarte des RNA-Polymerase-I-Transkriptionsplasmids pRF42_ASIA	36
Abb. 2.3	Vektorkarte des Expressionsplasmids pMH_IGR2	38
Abb. 2.4	Vektorkarte des Expressionsplasmids pMH_IGR3	38
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der FCV TURBS	52
Abb. 4.2	Multipler Sequenzvergleich	53
Abb. 4.3	Drei-Nukleotid-Deletionen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region	55
Abb. 4.4	Substitutionen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region	57
Abb. 4.5	Stoppmutationen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region	60
Abb. 4.6	Cysteinmutationen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region	61
Abb. 4.7	Mutationen im 5'-Bereich der VP2 kodierenden Region zur Analyse von Stoppkodon #4	62
Abb. 4.8.1	Untersuchung der subgenomischen RNA des FCV nach interagierenden Sequenzen	64
Abb. 4.8.2	Veränderung der gefundenen potentiellen Interaktionsmotive	66
Abb. 4.9	Strukturvorhersage mittels <i>mfold</i>	67
Abb. 4.10	Destabilisierung und Rekonstruktion der Haarnadelschleife	70
Abb. 4.11	Multipler Sequenzvergleich	72
Abb. 4.12	Strukturvorhersage mittels <i>mfold</i>	73
Abb. 4.13	Insertionen zwischen Motiv 2 und dem Start/Stoppbereich beim RHDV	75
Abb. 4.14	shRNA Design	78
Abb. 4.15	Schematische Übersicht über das RNA-Polymerase-I-Transkriptionsplasmid pRF42	79
Abb. 4.16	Spezifische Reduktion der mRNA Mengen nach shRNA Transfektion	82
Abb. 4.17	Kinetik der Abnahme der Proteinmengen der einzelnen Translationsinitiationsfaktoren nach shRNA Plasmid Transfektion und Quantifizierung der Reduktion nach 48 Stunden	84
Abb. 4.18	Gesamtproteinanalyse nach shRNA Plasmid Transfektion	85
Abb. 4.19	IRES der <i>intergenic region</i> (IGR) des <i>Cricket paralysis virus</i> (CrPV)	86
Abb. 4.20	Parameter des gewählten Testsystems	89
Abb. 4.21	Bedeutung der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF5A, eIF5 und eIF5B für die FCV VP2 Synthese	91
Abb. 4.22	Depletion von Translationsinitiationsfaktoren mittels Antikörperbehandlung	93
Abb. 4.23	Chemische Depletion von Translationsinitiationsfaktoren	94
Abb. 5.1	Schematische Einteilung verschiedener IRESS	101
Abb. 5.2	Modell des Reinitiationsmechanismus	108

Literaturverzeichnis

- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK** (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4):657-85.
- Algire MA, Lorsch JR** (2006). Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol.* 10(5):480-6.
- Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T** (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta.* 1789(9-10):542-57.
- Belsham GJ** (2009). Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res.* 139(2):183-92.
- De Benedetti A, Joshi-Barve S, Rinker-Schaeffer C, Rhoads RE** (1991). Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F. *Mol Cell Biol.* 11(11):5435-45.
- Bhella D, Gatherer D, Chaudhry Y, Pink R, Goodfellow IG** (2008). Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *J Virol.* 82(16):8051-8.
- Bhella D, Goodfellow IG** (2011). The cryo-electron microscopy structure of feline calicivirus bound to junctional adhesion molecule A at 9-angstrom resolution reveals receptor-induced flexibility and two distinct conformational changes in the capsid protein VP1. *J Virol.* 85(21):11381-90.
- Birnboim HC, Doly J** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA 1. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bochkov YA, Palmenberg AC** (2006). Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques.* 41(3):283-4, 286, 288 passim.
- Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J** (2006). Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol.* 2(4):213-20.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R** (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296(5567):550-3.
- Burnet FM** (1951). Mucoproteins in relation to virus action. *Physiol Rev.* 31(2):131-50.
- Burroughs JN, Brown F** (1978). Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol.* 41(2):443-6.
- Capucci L, Fusi P, Lavazza A, Pacciarini ML, Rossi C** (1996). Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol.* 70(12):8614-23.
- Carmichael GG, McMaster GK** (1980). The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange 1. *Methods Enzymol.* 65, 380-391.
- Carstens EB** (2010). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch Virol.* 155(1):133-146.
- Carter JR, Fraser TS, Fraser MJ Jr** (2008). Examining the relative activity of several dicistrovirus intergenic internal ribosome entry site elements in uninfected insect and mammalian cell lines. *J Gen Virol.* 89(Pt 12):3150-5.
- Carter MJ** (1990). Transcription of feline calicivirus RNA. *Arch Virol.* 114(3-4):143-52.
- Carter MJ, Milton ID, Turner PC, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM** (1992). Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch Virol.* 122(3-4):223-35.
- Chappell SA, Dresios J, Edelman GM, Mauro VP** (2006). Ribosomal shunting mediated by a translational enhancer element that base pairs to 18S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(25):9488-93.

- Chung CT, Niemela SL, Miller RH** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(7), 2172–2175.
- Clarke IN, Lambden PR** (1997). The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol*. 78 (Pt 2):291-301.
- Clarke IN, Lambden PR** (2000). Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis*. 181 Suppl 2:S309-16.
- Coyne KP, Jones BR, Kipar A, Chantrey J, Porter CJ, Barber PJ, Dawson S, Gaskell RM, Radford AD** (2006). Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet Rec*. 158(16):544-50.
- Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME** (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*. 22(11):2852-9.
- De Benedetti A, Rhoads RE** (1991). A novel BK virus-based episomal vector for expression of foreign genes in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 19(8):1925-31.
- Deniz N, Lenarcic EM, Landry DM, Thompson SR** (2009). Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo. *RNA*. 15(5):932-46.
- Dominguez DI, Ryabova LA, Pooggin MM, Schmidt-Puchta W, Fütterer J, Hohn T** (1998). Ribosome shunting in cauliflower mosaic virus. Identification of an essential and sufficient structural element. *J Biol Chem*. 273(6):3669-78.
- Domínguez JM, Gómez-Lorenzo MG, Martín JJ** (1999). Sordarin inhibits fungal protein synthesis by blocking translocation differently to fusidic acid. *J Biol Chem*. 274(32):22423-7.
- Donzé O, Picard D** (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 30(10):e46.
- Dunham DM, Jiang X, Berke T, Smith AW, Matson DO** (1998). Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol*. 143(12):2421-30.
- Edgil D, Polacek C, Harris E** (2006). Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol*. 80(6):2976-86.
- Ehresmann DW, Schaffer FL** (1977). RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *J Virol*. 22(2):572-6.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T** (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 15(2):188-200.
- Fan Q, Treder K, Miller WA** (2012). Untranslated regions of diverse plant viral RNAs vary greatly in translation enhancement efficiency. *BMC Biotechnol*. 12:22.
- Farrell PJ, Sen GC, Dubois MF, Ratner L, Slattery E, Lengyel P** (1978). Interferon action: two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75(12):5893-7.
- Fastier LB** (1975). A new feline virus isolated in tissue culture. *Am J Vet Res*. 18(67):382-9.
- Fernández-Miragall O, López de Quinto S, Martínez-Salas E** (2009). Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res*. 139(2):172-82.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669):806-11.
- Flick R, Pettersson RF** (2001). Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol*. 75(4):1643-55.
- Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TM** (1987). The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*. 15(8):3257-73.
- Garrey JL, Lee YY, Au HH, Bushell M, Jan E** (2010). Host and viral translational mechanisms during cricket paralysis virus infection. *J Virol*. 84(2):1124-38.

- Gartmann M, Blau M, Armache JP, Mielke T, Topf M, Beckmann R** (2010). Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *J Biol Chem.* 285(20):14848-51.
- Geissler K, Schneider K, Platzer G, Truyen B, Kaaden OR, Truyen U** (1997). Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations. *Virus Res.* 48(2):193-206.
- Geissler K, Schneider K, Fleuchaus A, Parrish CR, Sutter G, Truyen U** (1999). Feline calicivirus capsid protein expression and capsid assembly in cultured feline cells. *J Virol.* 73(1):834-8.
- Giedroc DP, Cornish PV** (2009). Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. *Virus Res.* 139(2):193-208.
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberté JF, Roberts L** (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* 6(10):968-72.
- Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N** (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(19):11089-94.
- Graham FL, van der Eb AJ** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52(2), 456-467.
- Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ** (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 181 Suppl 2:S322-30.
- Guo LH, Sun L, Chiba S, Araki H, Suzuki N** (2009). Coupled termination/reinitiation for translation of the downstream open reading frame B of the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *Nucleic Acids Res.* 37(11):3645-59.
- Guo J, Jin Z, Yang X, Li JF, Chen JG** (2011). Eukaryotic initiation factor 6, an evolutionarily conserved regulator of ribosome biogenesis and protein translation. *Plant Signal Behav.* 6(5):766-71.
- Hajeri PB, Singh SK** (2009). siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part I. Designing of siRNAs. *Drug Discov Today.* 14(17-18):851-8.
- Haqqi T, Zhao X, Panciu A, Yadav SP** (2002). Sequencing in the presence of betaine: Improvement in sequencing of the localized repeat sequence regions. *J Biomol Tech.* 13(4):265-71.
- Hellen CU, Sarnow P** (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15(13):1593-612.
- Herbert TP, Brierley I, Brown TD** (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):1033-40.
- Hershey JWB, Merrick WC** (2000). The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. *Translational Control of Gene Expression.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. 33-88.
- Hershey JW, Sonenberg N, Mathews MB** (2012). Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(12).
- Hertz MI, Thompson SR** (2011). Mechanism of translation initiation by Dicistroviridae IGR IRESs. *Virology.* 411(2):355-61. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.005. Epub 2011 Feb 1.
- Hinnebusch AG** (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75(3):434-67, first page of table of contents.
- Hsieh AC, Bo R, Manola J, Vazquez F, Bare O, Khvorova A, Scaringe S, Sellers WR** (2004). A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res.* 32(3):893-901.

- Hurley KE, Pesavento PA, Pedersen NC, Poland AM, Wilson E, Foley JE** (2004). An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J Am Vet Med Assoc.* 224(2):241-9.
- Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y** (2009). Drosophila argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell.* 34(1):58-67.
- Jackson RJ** (2005). Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 6):1231-41.
- Jahan S, Samreen B, Khaliq S, Ijaz B, Khan M, Siddique MH, Ahmad W, Hassan S** (2011). HCV entry receptors as potential targets for siRNA-based inhibition of HCV. *Genet Vaccines Ther.* 9:15.
- Jan E** (2006). Divergent IRES elements in invertebrates. *Virus Res.* 119(1):16-28.
- Jan E, Sarnow P** (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol.* 324(5):889-902.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM** (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 10(5):1075-81.
- Kapp LD, Lorsch JR** (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem.* 73:657-704.
- Kessler SW** (1981). Use of protein A bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. In *Methods in Enzymology* (eds. J. J. Langone and H. van Vunakis), p. 442-459. New York: Academic Press.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD** (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115(2):209-16.
- Kieft JS, Martinez-Salas E** (2008). Preface of: Structural motifs controlling the replication cycle of positive strand RNA viruses. *Virus Research* Volume 139, Issue 2, Pages 135–136
- Kieft JS** (2008). Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci.* 33(6):274-83.
- Kieft JS** (2009). Comparing the three-dimensional structures of Dicistroviridae IGR IRES RNAs with other viral RNA structures. *Virus Res.* 139(2):148-56.
- Kozak M** (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48.
- Kozak M** (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol.* 108(2):229-41.
- Kozak M** (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* 29(24):5226-32.
- Kuyumcu-Martinez NM, Van Eden ME, Younan P, Lloyd RE** (2004 a). 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(4):1779-90.
- Kuyumcu-Martinez M, Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Green KY, Lloyd RE** (2004 b). Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol.* 78(15):8172-82.
- Lamphear BJ, Yan R, Yang F, Waters D, Liebig HD, Klump H, Kuechler E, Skern T, Rhoads RE** (1993). Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J Biol Chem.* 268(26):19200-3.
- Levin D, London IM** (1978). Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(3):1121-5.
- Lindqvist L, Pelletier J** (2009). Inhibitors of translation initiation as cancer therapeutics. *Future Med Chem.* 1(9):1709-22.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ** (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 305(5689):1437-41.

- Lukavsky PJ** (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* 139(2):166-71.
- Luo D, Niu X, Wang Y, Zheng W, Chang L, Wang Q, Wei X, Yu G, Lu BR, Liu Y** (2007). Functional defect at the rice choline monoxygenase locus from an unusual post-transcriptional processing is associated with the sequence elements of short-direct repeats. *New Phytol.* 175(3):439-47.
- Luttermann C, Meyers G** (2007). A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J Biol Chem.* 282(10):7056-65. Epub 2007 Jan 9.
- Luttermann C, Meyers G** (2009). The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes Dev.* 23(3):331-44. doi: 10.1101/gad.507609.
- Madin SH, Traum J** (1955). Vesicular exanthema of swine. *Bacteriol Rev.* 19(1):6-21.
- Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, Akashi H** (2006). Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol.* 80(9):4482-90.
- Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, Sato TA, Larsson O, Rajasekhar VK, Sonenberg N** (2007). Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One.* 2(2):e242.
- Mandell KJ, Parkos CA** (2005). The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 57(6):857-67.
- Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J** (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology.* 122(7):1967-77.
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH** (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol.* 288(5):911-40.
- McCormick CJ, Salim O, Lambden PR, Clarke IN** (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(17):8917-21.
- Merrick W** (2009). Translation: Till termination us do part. *Nature.* 459(7243):44-5. Comment on: Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. [Nature. 2009]
- 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(36):34051-60.
- Meyers G** (2007). Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol.* 81(18):9623-32.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ** (1991). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology.* 184(2):677-86.
- Mulder J, Robertson ME, Seamons RA, Belsham GJ** (1998). Vaccinia virus protein synthesis has a low requirement for the intact translation initiation factor eIF4F, the cap-binding complex, within infected cells. *J Virol.* 72(11):8813-9.
- Mullis KB, Faloona FA** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Naphtine S, Lever RA, Powell ML, Jackson RJ, Brown TD, Brierley I** (2009). Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PLoS One.* 4(12):e8390.
- Neill JD** (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(3):145-60.
- Neill JD** (2002). The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res.* 87(1):89-93.

- Neill JD, Mengeling WL (1988). Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res.* 11(1):59-72.
- Neill JD, Meyer RF, Seal BS (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(7): 4484-4488.
- Neill JD, Reardon IM, Heinrikson RL (1991). Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J Virol.* 65(10):5440-7.
- Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol.* 64(7):3331-6.
- Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N (2007). Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol.* 81(13):6798-806. Epub 2007 Apr 25.
- Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC (2006). Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology.* 350(1):240-50.
- Ossiboff RJ, Parker JS (2007). Identification of regions and residues in feline junctional adhesion molecule required for feline calicivirus binding and infection. *J Virol.* 81(24):13608-21.
- Ossiboff RJ, Sheh A, Shotton J, Pesavento PA, Parker JS (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(Pt 2):506-17.
- Park HS, Himmelbach A, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA (2001). A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. *Cell.* 106(6):723-33.
- Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, Poland A, Keel K (2000). An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet Microbiol.* 73(4):281-300.
- Pedersen JS, Meyer IM, Forsberg R, Simmonds P, Hein J (2004). A comparative method for finding and folding RNA secondary structures within protein-coding regions. *Nucleic Acids Res.* 32(16):4925-36.
- Pelletier J, Sonenberg N (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* 334(6180):320-5.
- Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU (1996). Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol.* 16(12):6870-8
- Peterson JE, Studdert MJ (1970). Feline picornavirus. Structure of the virus and electron microscopic observations on infected cell cultures. *Arch Gesamte Virusforsch.* 32(2):249-60.
- Pisarev AV, Hellen CU, Pestova TV (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell.* 131(2):286-99.
- Pöyry TA, Kaminski A, Connell EJ, Fraser CS, Jackson RJ (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(23):3149-62.
- Powell ML, Naphine S, Jackson RJ, Brierley I, Brown TD (2008). Characterization of the termination-reinitiation strategy employed in the expression of influenza B virus BM2 protein. *RNA.* 14(11):2394-406.
- Prasad BV, Matson DO, Smith AW (1994). Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol.* 240(3):256-64.
- Preiss T, W Hentze M (2003). Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays.* 25(12):1201-11.

- Radford AD, Dawson S, Coyne KP, Porter CJ, Gaskell RM** (2006). The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. *Vet Microbiol.* 117(1):14-8. Epub 2006 Apr 18.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A** (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 22(3):326-30.
- Reynolds BS, Poulet H, Pingret JL, Jas D, Brunet S, Lemeter C, Etievant M, Boucraut-Baralon C** (2009). A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J Feline Med Surg.* 11(8):633-44.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P** (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113(1),237-251.
- Rohayem J, Robel I, Jäger K, Scheffler U, Rudolph W** (2006). Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol.* 80(14):7060-9.
- Ryabova LA, Pooggin MM, Dominguez DI, Hohn T** (2000). Continuous and discontinuous ribosome scanning on the cauliflower mosaic virus 35 S RNA leader is controlled by short open reading frames. *J Biol Chem.* 275(47):37278-84.
- Sachs A** (1990). The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr Opin Cell Biol.* 2(6):1092-8.
- Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE** (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature.* 459(7243):118-21.
- Sambrook J, Fritsch EF a. MT** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Oak Ridge, USA.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
- Sanz MA, Castelló A, Ventoso I, Berlanga JJ, Carrasco L** (2009). Dual mechanism for the translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus in infected and uninfected cells. *PLoS One.* 4(3):e4772.
- Schaffer FL, Ehresmann DW, Fretz MK, Soergel MI** (1980). A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA. *J Gen Virol.* 47(1):215-20.
- Schägger H, von Jagow G** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166(2):368-79.
- Schorr-Evans EM, Poland A, Johnson WE, Pedersen NC** (2003). An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *J Feline Med Surg.* 5(4):217-26.
- Shenvi CL, Dong KC, Friedman EM, Hanson JA, Cate JH** (2005). Accessibility of 18S rRNA in human 40S subunits and 80S ribosomes at physiological magnesium ion concentrations--implications for the study of ribosome dynamics. *RNA.* 11(12):1898-908.
- Shine J, Dalgarno L** (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature.* 254(5495):34-8.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG** (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 7:539.
- Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinjé J, Saif LJ** (2002). Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol.* 76(20):10089-98.
- Smith AW, Skilling DE, Cherry N, Mead JH, Matson DO** (1998). Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis.* 4(1):13-20.

- Sokabe M, Fraser CS, Hershey JW** (2012). The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNA_i binding to the 40S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* 40(2):905-13.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG** (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* 136(4):731-45.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY** (2005). Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol.* 79(7):4012-24.
- Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY** (2002). Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol.* 76(14):7060-72.
- Sosnovtsev SV, Green KY** (2000). Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology.* 277(1):193-203.
- Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, Green KY** (1998). Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol.* 72(4):3051-9.
- Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV, Green KY** (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(8):6626-33.
- Spearman C** (1908). The method of „right and wrong cases“ (constant stimuli) without Gauss's formulae. *Br. J. Psychol.* 2,227-242.; zit. nach Kaerber
- Stuart AD, Brown TD** (2006). Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J Virol.* 80(15):7500-9.
- Stuart AD, Brown TD** (2007). Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J Gen Virol.* 88(Pt 1):177-86.
- Svitkin YV, Herdy B, Costa-Mattioli M, Gingras AC, Raught B, Sonenberg N** (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol.* 25(23):10556-65.
- Takasaki S, Kotani S, Konagaya A** (2004). An effective method for selecting siRNA target sequences in mammalian cells. *Cell Cycle.* 3(6):790-5.
- Thiel HJ, König M** (1999). Caliciviruses: an overview. *Vet. Microbiol.* 69(1-2): 55-62.
- Thomas PS** (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77(9), 5201-5205.
- Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K** (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 32(3):936-48. Print 2004.
- Villordo SM, Gamarnik AV** (2009). Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res.* 139(2):230-9.
- Vogelstein B, Gillespie D** (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 615-619.
- Willcocks MM, Carter MJ, Roberts LO** (2004). Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *J Gen Virol.* 85(Pt 5):1125-30.
- Wilson JE, Powell MJ, Hoover SE, Sarnow P** (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol.* 20(14):4990-9.
- Wirblich C, Sibilica M, Boniotti MB, Rossi C, Thiel HJ, Meyers G** (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(11):7159-68.
- Wyatt LS, Moss B, Rozenblatt S** (1995). Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* 210, 202-205.

- Zeng Y, Yi R, Cullen BR** (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* 24(1):138-48.
- Zuker M** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3406-15.


```

mus_musculus      CACTATATTA AACACCCCTCTACAGAACAGGTGGGCACTCTGGTTTTTTTAAAAATGATAAA
rattus_norvegicus CACTATATTA AACACCCCTCTACAGAACAGGTGGGCACTCTGGTTTTTTTAAAAATGATAAA
homo_sapiens      CACTATATTA AACATCCCCTACAGAACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTTAAAAATGATAAA
bos_taurus        CACTATATTA AACACCCCTTTACAGAACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTTAAAAATGATAAA
canis_lupus_fam. CACTATATTA AACATCCTTTACAGAACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTTAAAAATGATAAA
equus_caballus    CACTATATTA AACATCCTTTACAAAACAGATGGGCACTCTGGTTTTTTCAAAAATGATAAA
***** ** *****

mus_musculus      AGCAAAACTTGGCAAGCAAACCTTCGATTGATCTCTAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTT
rattus_norvegicus AGCAAAACTTGGCAAGCAAACCTTCGGTTGATCTCTAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTT
homo_sapiens      AGCAAAACTTGGCAAGCAAACCTTCGGCTGATCTCCAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTT
bos_taurus        AGCAAAACTTGGCAAGCAAACCTTCGATTGATCTCTAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTT
canis_lupus_fam. AGCAAAACTTGGCAAGCAAACCTTCGGCTGATCTCTAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTT
equus_caballus    AGCAAAACTTGGCAAGCAAACCTTCGGCTGATCTCTAAGTTTGATACTGTTGAAGACTTT
***** ** *****

mus_musculus      TGGGCTCTATAACAACCATATCCAGTTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCA
rattus_norvegicus TGGGCTCTATAACAACCATATCCAGTTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCA
homo_sapiens      TGGGCTCTGTACAACCATATCCAGTTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCA
bos_taurus        TGGGCTCTGTACAACCATATCCAGTTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCA
canis_lupus_fam. TGGGCTCTGTACAACCACATCCAGTTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCA
equus_caballus    TGGGCTCTGTACAACCATATCCAGTTGTCTAGTAATTTAATGCCTGGCTGTGACTACTCA
***** *****

mus_musculus      CTTTTTAAGGACGGGATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGAGGAGGACGG
rattus_norvegicus CTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGGGAGGACGA
homo_sapiens      CTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGGGAGGACGA
bos_taurus        CTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGAGGAGGACGA
canis_lupus_fam. CTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAACGAGGAGGACGA
equus_caballus    CTTTTTAAGGATGGTATTGAGCCTATGTGGGAAGATGAGAAAAACAAAAGAGGAGGACGA
***** ** *****

mus_musculus      TGGCTGATCACACTGAACAAGCAGCAGAGACGGAGTGACCTCGATCGCTTCTGGCTAGAG
rattus_norvegicus TGGCTAATTACATTGAACAAGCAGCAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAG
homo_sapiens      TGGCTAATTACATTGAACAAGCAGCAGAGACGAAGTGACCTCGATCGCTTTTGGCTAGAG
bos_taurus        TGGCTAATTACACTGAACAAGCAGCAGAGACGAAGTGACCTCGATCGTTTTTGGCTAGAG
canis_lupus_fam. TGGCTAATTACATTGAACAAGCAGCAGAGACGTAGTGACCTGGATCGCTTTTGGCTAGAG
equus_caballus    TGGCTAATTACATTGAACAAGCAGCAGAGACGAAGTGACCTGGATCGCTTTTGGCTAGAG
***** ** *****

mus_musculus      ACACTGCTGTGCCTTATTGGAGAATCTTTGATGACTACAGTGATGATGTGTGTGGAGCT
rattus_norvegicus ACACTGCTGTGCCTTATTGGAGAATCTTTGATGACTACAGTGATGACGTGTGTGGAGCT
homo_sapiens      ACACTTCTGTGCCTTATTGGAGAATCTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGCGCT
bos_taurus        ACAGTGCTGTGCCTTATTGGAGAATCTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGAGCT
canis_lupus_fam. ACACTGCTGTGCCTTATTGGAGAATCTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGAGCT
equus_caballus    ACACTGCTGTGCCTTATTGGAGAATCTTTGATGACTACAGTGATGATGTATGTGGAGCT
*** * *****

mus_musculus      GTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGTGATAAGATAGCAATATGGACTACTGAGTGTGAAAAC
rattus_norvegicus GTTGTTCAATGTTAGAGCTAAAGGTGATAAGATAGCAATATGGACGACTGAATGTGAAAAC
homo_sapiens      GTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGTGATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAAC
bos_taurus        GTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGTGATAAAATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAAC
canis_lupus_fam. GTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGTGATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAAC
equus_caballus    GTTGTTAATGTTAGAGCTAAAGGTGATAAGATAGCAATATGGACTACTGAATGTGAAAAC
***** *****

```

```

mus_musculus      AGAGATGCAGTCACACACATAGGGAGGGTATAACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCGAAG
rattus_norvegicusAGAGATGCAGTCACACACATAGGGAGGGTATAACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCGAAG
homo_sapiens      AGAGAAGCTGTTACACATATAGGGAGGGTATAACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCAAAG
bos_taurus        AGAGAAGCTGTTACACATATAGGGAGGGTATAACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCAAAG
canis_lupus_fam.  AGAGAGGCTGTTACACATATAGGGAGGGTATAACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCAAAG
equus_caballus    AGAGATGCTGTTACACATATAGGGAGGGTATAACAAGGAAAGGTTAGGACTTCCTCCAAAG
*****  **:* ** * *****

```

```

mus_musculus      ATAGTGATTGGTTATCAGTCCCACGCAGACACAGCTACAAAGAGCGGCTCCACCACTAAA
rattus_norvegicusATAGTGATTGGTTATCAGTCCCACGCAGACACAGCTACAAAGAGCGGCTCCACCACTAAA
homo_sapiens      ATAGTGATTGGTTATCAGTCCCACGCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCACTAAA
bos_taurus        ATAGTGATTGGTTATCAGTCCCATGCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCACTAAA
canis_lupus_fam.  ATAGTGATTGGTTATCAGTCCCATGCAGACACAGCTACAAAGAGCGGCTCCACTACTAAA
equus_caballus    ATAGTGATTGGTTATCAGTCCCATGCAGACACAGCTACTAAGAGCGGCTCCACCACTAAA
*****

```

```

mus_musculus      AATAGGTTTGTGTTTAA
rattus_norvegicusAATAGGTTTGTGTTTAA
homo_sapiens      AATAGGTTTGTGTTTAA
bos_taurus        AATAGGTTTGTGTTTAA
canis_lupus_fam.  AATAGGTTTGTGTTTAA
equus_caballus    AATAGGTTTGTGTTTAA
*****

```

b) eIF5A

```

mus_musculus      -----
rattus_norvegicus-----
homo_sapiens      ATGTGTGGAAGCTGGGGGACTGATTCCAAGACAAGGCGCCACCCACAGAGCAAGTTTT
bos_taurus        -----
canis_lupus_fam.  -----
equus_caballus    -----

```

```

mus_musculus      -----ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGA
rattus_norvegicus-----ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGA
homo_sapiens      CTGAAACGTTTGGAAATCGAAGCCTCTTAAATGGCAGATGACTTGGACTTCGAGACAGGA
bos_taurus        -----ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGA
canis_lupus_fam.  -----ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGA
equus_caballus    -----ATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGA
*****

```

```

mus_musculus      GATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTT
rattus_norvegicusGATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTT
homo_sapiens      GATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGCTTT
bos_taurus        GATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCGATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGCTTC
canis_lupus_fam.  GATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCAATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAACGGCTTC
equus_caballus    GATGCAGGGGCCTCAGCCACCTTCCCGATGCAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGCTTT
*****

```

```

mus_musculus      GTGGTGCTCAAAGGCCGGCCATGTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTTCGAAGACTGGCAAG
rattus_norvegicusGTGGTGCTCAAAGGCCGGCCATGTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTTCGAAGACTGGCAAG
homo_sapiens      GTGGTGCTCAAAGGCCGGCCATGTAAGATCGTCGAGATGTCTACTTTCGAAGACTGGCAAG
bos_taurus        GTGGTGCTCAAAGGCCGGCCATGTAAGATTGTGGAGATGTCAACTTCTAAGACCGGCAAG
canis_lupus_fam.  GTGGTGCTTAAAGGCCGGCCATGTAAGATCGTGGAGATGTCTACCTCCAAGACTGGCAAG
equus_caballus    GTGGTGCTCAAAGGCCGGCCATGTAAGATCGTGGAGATGTCTACCTCCAAGACTGGCAAA
*****

```

```

mus_musculus      CATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGCATTGACATTTTTACTGGGAAGAAATATGAA
rattus_norvegicus CATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTGATATTTTTACTGGGAAGAAATATGAA
homo_sapiens      CACGGCCACGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTGACATCTTTACTGGGAAGAAATATGAA
bos_taurus        CACGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGTATTGACATCTTCACTGGGAAGAAATACGAA
canis_lupus_fam.  CACGGCCATGCCAAGGTCCACCTGGTTGGTATTGACATCTTTACTGGCAAGAAATATGAA
equus_caballus    CACGGCCACGCCAAGGTCCACCTGGTTGGTATCGACATCTTTACTGGGAAGAAATATGAA
** *****

```

```

mus_musculus      GATATCTGCCCGTCAACTCATAATATGGATGTCCCCAACATCAAACGGAATGACTTCCAG
rattus_norvegicus GATATCTGCCCGTCAACTCATAACATGGATGTCCCCAACATCAAAGGAATGATTTCCAG
homo_sapiens      GATATCTGCCCGTCAACTCATAATATGGATGTCCCCAACATCAAAGGAATGACTTCCAG
bos_taurus        GATATCTGCCCGTCAACTCATAATATGGATGTCCCCAACATCAAAGGAACGATTTTCAG
canis_lupus_fam.  GATATCTGCCCGTCAACTCATAATATGGATGTCCCCAACATCAAGAGGAATGACTTCCAG
equus_caballus    GATATCTGCCCGTCAACTCATAATATGGATGTCCCCAACATCAAAGGAATGATTTCCAG
*****.**.*****

```

```

mus_musculus      CTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAG
rattus_norvegicus CTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAG
homo_sapiens      CTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCACTGCTCCAGGACAGCGGGGAGGTACGAGAG
bos_taurus        CTGATTGGCATCCAGGATGGATACCTATCACTCCTCCAAGACAGCGGGGAGGTGCGAGAG
canis_lupus_fam.  CTGATCGGCATCCAGGATGGGTATCTATCACTGCTCCAGGACAGCGGGGAGGTGCGAGAG
equus_caballus    CTGATTGGCATCCAGGATGGGTATCTATCACTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTGCGAGAG
*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

mus_musculus      GACCTTCGTCTGCCTGAAGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGA
rattus_norvegicus GACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGA
homo_sapiens      GACCTTCGTCTCCCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTACGACTGTGGA
bos_taurus        GACCTCCGTCTGCCTGAGGGAGACCTTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAATACGACTGTGGA
canis_lupus_fam.  GACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGATCTCGGCAAGGAGATCGAGCAGAAGTATGACTGTGGA
equus_caballus    GACCTTCGTCTGCCTGAGGGAGACCTCGGCAAGGAGATTGAGCAGAAATATGACTGTGGA
*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

mus_musculus      GAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCTGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAG
rattus_norvegicus GAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAG
homo_sapiens      GAAGAGATCCTGATCACGGTGCTGTCTGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAG
bos_taurus        GAAGAGATTCTGATCACGGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAG
canis_lupus_fam.  GAAGAGATCTTGATCACGGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAG
equus_caballus    GAAGAGATCCTGATCACGGTGCTGTCCGCCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAG
*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

mus_musculus      GCCATGGCAAAATAA
rattus_norvegicus GCCATGGCAAAATAA
homo_sapiens      GCCATGGCAAAATAA
bos_taurus        GCCATGGCAAAATAA
canis_lupus_fam.  GCCATGGCAAAATAA
equus_caballus    GCCATGGCAAAATAA
*****

```

c) eIF5

```

mus_musculus      ATGTCTGTCAACGTCAACCGCAGCGTGTCAGACCAGTTCTATCGCTACAAGATGCCCCGT
rattus_norvegicus ATGTCTGTCAACGTCAACCGCAGCGTGTCAGACCAGTTCTATCGCTACAAGATGCCCCGT
homo_sapiens      ATGTCTGTCAATGTCAACCGCAGCGTGTCAGACCAGTTCTATCGCTACAAGATGCCCCGT
bos_taurus        ATGTCTGTCAACGTCAACCGCAGCGTGTCAGACCAGTTCTATCGCTACAAGATGCCCCGT
canis_lupus_fam. ATGTCTGTCAATGTCAACCGCAGTGTGTCAGACCAGTTCTATCGCTACAAGATGCCCCGT
equus_caballus    ATGTCTGTCAACGTCAACCGCAGCGTGTCAGACCAGTTCTATCGCTACAAGATGCCCCGT
*****

mus_musculus      TTGATTGCTAAGGTTGAGGGCAAAGGAAATGGAATCAAGACAGTTATAGTCAACATGGTT
rattus_norvegicus TTGATTGCTAAGGTTGAGGGCAAAGGAAATGGAATCAAGACAGTTATAGTCAACATGGTT
homo_sapiens      CTGATTGCCAAGGTTGAGGGCAAAGGAAATGGAATCAAGACAGTTATAGTCAACATGGTT
bos_taurus        CTGATTGCCAAGGTTGAGGGCAAAGGAAATGGAATCAAGACAGTTATAGTCAACATGGTT
canis_lupus_fam. CTGATTGCCAAGGTTGAGGGCAAAGGAAATGGTATCAAGACAGTTATAGTCAACATGGTT
equus_caballus    CTGATTGCCAAGGTTGAGGGCAAAGGAAATGGAATCAAGACCGTTATAGTCAACATGGTT
*****

mus_musculus      GACGTTGCAAAGGCGCTTAATCGGCCTCCAACGTATCCCACCAAATATTTTGGTTGTGAG
rattus_norvegicus GACGTTGCAAAGGCGCTTAATCGGCCTCCAACGTATCCCACCAAATATTTTGGTTGTGAG
homo_sapiens      GACGTTGCAAAGGCGCTTAATCGGCCTCCAACGTATCCCACCAAATATTTTGGTTGTGAG
bos_taurus        GACGTAGCGAAAGGCGCTTAATCGGCCTCCAACGTATCCCACCAAATATTTTGGTTGTGAG
canis_lupus_fam. GACGTTGCAAAGGCGCTTAATCGGCCTCCAACGTATCCCACCAAATATTTTGGTTGTGAG
equus_caballus    GACGTTGCAAAGGCGCTTAATCGGCCTCCAACGTATCCCACCAAATATTTTGGTTGTGAG
*****

mus_musculus      CTGGGAGCACAGACCCAGTTTGATGTTAAGAATGACCGTTACATTGTCAATGGATCTCAT
rattus_norvegicus CTGGGAGCACAGACCCAGTTTGATGTTAAGAATGACCGTTACATTGTCAATGGATCTCAT
homo_sapiens      CTGGGAGCACAGACCCAGTTTGATGTTAAGAATGACCGTTACATTGTCAATGGATCTCAT
bos_taurus        CTGGGAGCACAGACCCAGTTTGATGTTAAGAATGACCGTTACATTGTCAATGGATCTCAT
canis_lupus_fam. CTGGGAGCACAGACCCAGTTTGATGTTAAGAATGACCGTTACATTGTCAATGGATCTCAT
equus_caballus    CTGGGAGCACAGACCCAGTTTGATGTTAAGAATGACCGTTACATTGTCAATGGATCTCAT
*****

mus_musculus      GAGGCGAATAAGCTGCAAGACATGTTGGATGGATTCATTAAAAAATTTGTTCTCTGTCCCT
rattus_norvegicus GAGGCGAATAAGCTGCAAGACATGTTGGATGGATTCATTAAAAAATTTGTTCTCTGTCCCT
homo_sapiens      GAGGCGAATAAGCTGCAAGACATGTTGGATGGATTCATTAAAAAATTTGTTCTCTGTCCCT
bos_taurus        GAGGCGAATAAGCTGCAAGACATGTTGGATGGATTCATTAAAAAATTTGTTCTCTGTCCCT
canis_lupus_fam. GAGGCGAATAAGCTGCAAGACATGTTGGATGGATTCATTAAAAAATTTGTTCTTTGTCCCT
equus_caballus    GAGGCGAATAAGCTGCAAGACATGTTGGATGGATTCATTAAAAAATTTGTTCTCTGTCCCT
*****

mus_musculus      GAGTGTGAGAATCCTGAAACAGATCTGCATGTCAATCCAAAGAAGCAAACAATAGGTAAT
rattus_norvegicus GAGTGTGAGAATCCTGAAACAGATCTGCATGTCAATCCAAAGAAGCAAACAATAGGTAAT
homo_sapiens      GAATGTGAGAATCCTGAAACAGATTTGCATGTCAATCCAAAGAAGCAAACAATAGGTAAT
bos_taurus        GAGTGTGAGAATCCTGAAACAGATCTGCATGTCAATCCAAAGAAGCAAACAATAGGTAAT
canis_lupus_fam. GAGTGTGAGAATCCTGAAACAGAGCTGCATGTCAATCCAAAGAAGCAAACAATAGGTAAT
equus_caballus    GAGTGTGAGAATCCTGAAACGGATCTGCATGTCAATCCAAAGAAGCAAACAATAGGTAAT
**.*

mus_musculus      TCTTGTAAGCCTGTGGGTACCGAGGCATGCTTGACACACATCATAAACTCTGTACATTC
rattus_norvegicus TCTTGTAAGCCTGTGGGTACCGAGGCATGCTTGACACACATCATAAACTCTGTACATTC
homo_sapiens      TCTTGTAAGCCTGTGGCTATCGAGGCATGCTTGACACACATCATAAACTCTGCACATTC
bos_taurus        TCTTGTAAGCCTGTGGCTATCGAGGCATGCTTGACACACATCATAAACTCTGCACATTC
canis_lupus_fam. TCTTGTAAGCCTGTGGCTATCGAGGCATGCTTGACACACATCATAAACTCTGCACGTTTC
equus_caballus    TCTTGTAAGCCTGTGGCTATCGAGGCATGCTTGACACACATCATAAACTCTGCACATTC
*****

```

```

mus_musculus      ATTCTCAAAAACCCACCTGAGAATAGTGACATTGGTACAGGAAAGAAAGAAAAGGAAAAG
rattus_norvegicus ATTCTCAAAAACCCACCTGAGAATAGTGACATTGGTACAGGAAAGAAAGAGAAAAGAAAAG
homo_sapiens      ATTCTCAAAAACCCACCTGAGAATAGTGACAGTGGTACAGGAAAGAAAGAAAAAGAAAAG
bos_taurus        ATTCTCAAAAACCCACCTGAGAATAGTGATAGTAGTACAGGAAAAAAGAAAAGGAAAAG
canis_lupus_fam. ATTCTCAAAAACCCACCTGAGAATAGTGACAGTGGTACAGGGAAAGAAAGAAAAGGAAAAG
equus_caballus    ATTCTCAAAAACCCACCTGAGAATAGTGACAGTGGTACAGGAAAGAAAGAAAAGGAAAAG
***** * * .***** .** .***** .** .*****

mus_musculus      AAAAAATAGAAAGGGCAAGGACAAGGAAAATGGCTCTGTATCTACCAGTGAGACACCACCA
rattus_norvegicus AAAAAATAGAAAGGGCAAGGACAAGGAAAATGGCTCTGTATCCACCAGTGAGACACCACCA
homo_sapiens      AAAAAACAGAAAGGGCAAAGACAAGGAAAATGGCTCCGTATCCAGCAGTGAGACACCACCA
bos_taurus        AAAAAATAGAAAGGGCAAAGACAAGGAAAATGGCTCCGTTTCCAGCAGTGAGACACCCCCA
canis_lupus_fam. AAAAAACCGGAAAGGGCAAGGACAAGGAAAATGGTTCTGTGTCCAGCAGTGAGACGCCCCCA
equus_caballus    AAAAAATAGAAAGGGCAAAGACAAGGAAAATGGCTCCGTGTCCAGCAGTGAGACGCCGCCG
***** .** .** .***** .***** ** * * * ***** .** ** .

mus_musculus      CCTCCA---CCACCAAATGAAATTAGT---CCTCCACATGCTGTGGAAGAAGAGGAAGAT
rattus_norvegicus CCTCCA---CCACCAAATGAAATTAGT---CCTCCACATGCTGTGGAAGAAGAGGAAGAT
homo_sapiens      CCACCACCACCACCAAATGAAATTAATCCTCCTCCACATACAATGGAAGAAGAGGAGGAT
bos_taurus        -----CCACCACCAAATGAGATCAGTCTCCTCCACATGCTGTGGAAGAAGAAGAGGAT
canis_lupus_fam. CCC---CCACCACCAAATGAGATCAGTCTCCTCCACATGCTGCGGAAGAAGAGGAGGAT
equus_caballus    CCGC---CGCCGCCAAATGAAATCAGTCTCCTCCACATGCTGTGGAAGAAGAGGAGGAT
***** .** .***** .** * * ***** .** .***** .** .**

mus_musculus      GATGATTGGGGGGAGGATACAACCTGAGGAAGCTCAAGGCGCAGAATGGATGAAATCAGT
rattus_norvegicus GATGATTGGGGGGAGGATACAACCTGAGGAAGCTCAAGGCGCAGAATGGATGAAATCAGT
homo_sapiens      GATGACTGGGGGAGAAGATACAACCTGAGGAAGCTCAAGGCGCAGAATGGATGAAATCAGT
bos_taurus        GACGACTGGGGGGAGGATACAACAGAGGAAGCTCAAGGCGCAGAATGGATGAAATCAGT
canis_lupus_fam. GATGATTGGGGGGAGGATACGACTGAGGAAGCTCAAGACGAAGAATGGATGAAATCAGT
equus_caballus    GATGACTGGGGGAGAAGATACAACCTGAAGAAGCTCAAGGCGCAGAATGGATGAAATCAGT
** * * ***** .** .***** .** .** .***** .** .*****

mus_musculus      GACCATGCAAAAAGGTCTGACACTTAGTGATGATTTGGAAGAAGACTGTAGAAGAGCGTGT
rattus_norvegicus GACCATGCAAAAAGGTCTGACACTTAGCGATGATTTGGAAGAAGACTGTAGAAGAGCGTGT
homo_sapiens      GACCATGCAAAAAGTTCTGACACTCAGTGATGATTTGGAAGAACAATGAGGAGAGGGTC
bos_taurus        GACCATGCAAAAAGTTTTAACCTCAGTGACGATTTGGAAGGACTGTTGAAGAGCGGGTC
canis_lupus_fam. GATCATGCAAAAAGTTCTAACACTCAGTGATGATTTGGAAGGACTGTAGAAGAGCGGGTC
equus_caballus    GACCACGCAAAAAGTTTTGACGCTAAGTGATGATTTGGAAGGACTGTTGAAGAACGGGTC
** * * ***** * * .** * * * ***** .** .** .** .**

mus_musculus      AACATCCTGTTTGATTTTGTAAAGAAAAAGAAAGAAGAGGGCATTATTGATTCATCTGAT
rattus_norvegicus AACATCCTGTTTGATTTTGTAAAGAAAAAGAAAGAAGAGGGCATTATTGATTCATCTGAT
homo_sapiens      AATATCCTCTTTGATTTTGTAAAGAAAAAGAAAGAAGAGGGTGTATTGATTCATCTGAC
bos_taurus        AATATCCTGTTTGATTTTGTAAAGAAAAAGAAAGAAGGATATTATTGACTCATCTGAC
canis_lupus_fam. AATATTCTGTTTGATTTTGTAAAGAAAAAGAAAGAAGGATATTATTGACTCGTCAGAC
equus_caballus    AACATTCTGTTTGATTTTGTAAAGAAAAAGAAAGAAGGGTATTATTGACTCGTCTGAC
** * * * ***** ***** .** .***** ** .** .**

mus_musculus      AAAGAAATTGTGGCTGAGGCAGAAAGACTGGATGTAAAAGCCATGGGTCCTCTGTTTTG
rattus_norvegicus AAAGACATTGTGGCTGAGGCAGAAAGACTGGATGTAAAAGCCATGGGCCCTCTCGTTTTG
homo_sapiens      AAAGAAATCGTTGCTGAAGCAGAAAGACTGGATGTAAAAGCCATGGGCCCTCTGTTTCTA
bos_taurus        AAAGAGATTGTAGCTGAAGCAGAAAGACTGGATGTAAAAGCCATGGGCCCTCTGTTTTG
canis_lupus_fam. AAAGAAATTGTTGCTGAAGCAGAAAGACTGGATGTAAAAGCTATGGTCTCTGTTTTG
equus_caballus    AAAGAAATTGTTGCTGAAGCAGAAAGACTGGATGTAAAAGCTATGGGCCCTCTGTTTTG
***** ** * * ***** .***** ***** ***** * * .

```



```

mus_musculus      GATTCAAAGTCAAAAAAGACTGCCAGACCTAACTCAGAGGCACCCCTTCTGGGAGTGAG
rattus_norvegicusGATTCAAATCAAAAAAGCCTGCCAGACCTAACTCAGAGGTGCTCCTCTCTGGGAGTGAG
homo_sapiens      GATTCAAATCAAAAAAGACTGCAAAACCCGAAA---GTGGAAATGTACTCTGGGAGTGAT
bos_taurus        GATTCAAAGTCAAAAAAGACTGCAAAACCCAAA---GTGGAAATGTACTCTGGGAGTGAT
canis_lupus_fam.  GATTCAAATCAAAAAAGACTGCAAAAGTCAAAA---GTGGAAATGTACTCTGGGAGTGAT
equus_caballus    GATTCAAATCAAAAAAGACTGCAAAACCCAAA---GTGGAAATGTGCTCTGGGAGTGAT
                  *****.******.****.*.. * ** . *:* * .. *****

mus_musculus      GATGCTG---ATGATTCTAATAAACTTTCTAAAAAAGGTA---AAAAAGCCCAGAAATCC
rattus_norvegicusGATGCAG---ATGATCCTAATAAACTTTCTAAAAAAGGTA---AAAAAGCCCAGAAATCA
homo_sapiens      GATGATG---ATGATTTTAACAACTTCTTAAAAAAGCTAAAGGGAAAGCTCAAAAATCA
bos_taurus        GATGATG---ATGATTTTAATAAACTATCCAAAAAAGCAAAGGGGAAAGCTCAGAAATCA
canis_lupus_fam.  GATGATGATGATGATTTTAATAAACTTTCTAAAAAAGCTAAAGGGAAAGTGCAGAAATCA
equus_caballus    GATGATG---ATGATTTCAATAAACTTTCTAAAAAAGCTAAAGGGAAAGCTCAGAAATCA
                  ****.*:* ***** ** *****:* ***** :* ..**** *.*****.

mus_musculus      ACGAAAAAACGGGACGGGTGAGAAGAGGATGAAGACAATAGCAAAAGAAGTAAAGAACGT
rattus_norvegicusACTAAAAAACGGGATGGGTGCGAAGAGGATGAAGACAATAGCAAAAGAAGTAAAGAACGT
homo_sapiens      AATAAGAAGTGGGATGGGTGAGAGGAGGATGAGGATAACAGTAAAAAAATTAAGAGCGT
bos_taurus        AATAAGAAGCGTGATGCATCAGAAGAGGATGAGGATAACAGTAAAAAGAAATTAAGAGCGT
canis_lupus_fam.  AATAAAAGGGGGGATGGGTGAGAAGAAGATGAGGATAACAGTAAAAAGAGTTAAAGAGCGT
equus_caballus    AATAAAAAAGTGGGATGGATCAGAAGAGGATGAGGATAACAGTAAAAAGAAATTAAGAGCGT
                  *.**.*.. * ** * .*.***.*.******.* * * * * * .*.*****.***

mus_musculus      TCGAGAGTAACTCCTCTGGTGAAAGTGGTGGTGAGTCCGATGAATTTTTGCAGTCCAGA
rattus_norvegicusTCGAGAGTAACTCCTCAGGTGAAAGTGGTGGTGAGTCTGATGAATTTTTGCAGTCCAGA
homo_sapiens      TCAAGAATAAATTCTTCTGGTGAAAGTGGTGATGAATCAGATGAATTTTTGCAATCTAGA
bos_taurus        ATGAGAGCACATTCTTCTGGTGAAAGTGGTGATGAATCAGATGAATTTTTGCAATCCAGG
canis_lupus_fam.  TCCCGAGTAAATTCTTCAAGGTGAAAGTGGTGATGAATCAGATGAATTTTTTACAGTCCAGA
equus_caballus    TCCAGAGTAAATTCTTCAAGGTGAAAGTGGTGATGAATCAGATGAATTTTTTGCAGTCTAGG
                  : .**.*.* ** **:******.***.* * *****.***.* **

mus_musculus      AAAGGACAGAAAAAAATCAGAAGAACAAGTCCGTTCCTACCGTAGACAGTGGGAATGAG
rattus_norvegicusAAAGGACAGAAAAAAATCAGAAGAACAAGTCCGTTCCTACCATAGACAGTGGGAATGAG
homo_sapiens      AAAGGACAGAAAAAAATCAGAAAAACAAGCCAGGTCCCTAACATAGAAAGTGGGAATGAA
bos_taurus        AAAGGACAGAAAAAAATCAGAAAAACAAGCCAGGTCCCTACTGTTCGAGAGTGGAAATGAA
canis_lupus_fam.  AAAGGACAGAAAAAAATCAAAAAAATAAGCCAGTCCCTAATGTGGAGAGTGGGAATGAA
equus_caballus    AAAGGACAAAAAAATCAAAAAAATAAGCCAGGTCCCTAATGTGGAGAGTGGGAATGAA
                  *****.******.***.* * * * .. ***** . * ** *****.******.

mus_musculus      GACGATGACTCTTCTTCAAAATTAAGACGGTGGCCAGAAAGGCAGAAAAGAAAGAG
rattus_norvegicusGACGATGACTCTTCTTCAAAATTAAGACGGTGGCCAGAAAGGCAGAAAAGAAAGAG
homo_sapiens      GATGATGACGCCTCCTTCAAAATTAAGACAGTGGCCAAAAGAAAGGCAGAAAAGAAAGAG
bos_taurus        GATGATGACTCGTCTTCAAAATTAAGACAGTGGCTCAAAAGAAAGCAGAGAAGAAAGAG
canis_lupus_fam.  GATGATGATTCCTCCTTCAAAATTAAGACGGTGGCCAAAAGAAAGGCAGAAAAGAAAGAG
equus_caballus    GAGGACGACTCCTCCTTCAAAATTAAGACAATGGCCAAAAGAAAGGCAGAAAAGAAAGAG
                  ** ** * * *****.***.* * * * * * .*****.***.* **

mus_musculus      CGCGAGAAGAAAAAGAGAGATGAAGAGAAAGCGAAGTTGCGGAAGATGAAGGAGAAAGAA
rattus_norvegicusCGTGAGAGGAAAAAGAGAGAAGAGGAGAAAGCAAAGTTGCGAAAGGTGAAAGAGAAAGAA
homo_sapiens      CGCGAGAGAAAAAAGCGAGATGAAGAAAAAGCGAAACTGCGGAAGCTGAAAGAAAAAGAA
bos_taurus        CGTGAGAGAAAAAAGCGGATGAAGAAAAAGCAAAGTTGCGGAAGCTGAAAGAAAAAGAA
canis_lupus_fam.  CGTGAAAGAAAAAAGAGAGATGAAGAAAAAGCAAAGTTACGGAAGCTGAAAGAAAAAGAA
equus_caballus    CGTGAGAGAAAAAAGCGAGACGAAGAAAAAGCAAAGTTGCGGAAGCTGAAAGAAAAAGAA
                  ** **.*..*****.*** * * * * * . * **.* * * * * * .*****

```

```

mus_musculus      GAGCTAGAGAAGGGCAAGAAGGAGCAGAGTAAACAGAGGGAGCCTCAGAAGAGACCTGAG
rattus_norvegicusGAGCTAGAGAAGGGCAGGAAGGAGCAGAGTAAGCAGAGGGAGCCTCAGAAGAGACCGGAC
homo_sapiens      GAGTTAGAAACAGGTAAAAAGGATCAGAGTAAACAAAAGGAATCTCAAAGGAAATTTGAA
bos_taurus        GAGCTGGAGTCTGGTAAAAAGGATCTGGGTAAACCAAAAAGAATCTCAGCGGAAACCTGAG
canis_lupus_fam. GAGCTAGAGACTGGGAAAAAGGATCAGAGTAAACA-----ATCTCAAAGGAAATCTGAA
equus_caballus    GAGTTAGAAACTGGTAAAAAGGATCAGAGTAAACAAAAGAATCTCAAAGGAAATCTGAA
*** *.**.:. ** *..***** *:.****.*. . ****...**.* **

mus_musculus      GAGGAGGTGTTGACACTCAGAGGGACTCCTGACACAGGAGCT-----GCCTCGGAAGAG
rattus_norvegicusGAGGAGGTGTTGGTGCTCAGAGGGACTCCTGATGCAGGTGCT-----GCCTCAGAAGAG
homo_sapiens      GAAGAAACTGTAAAATCCAAAGTGACTGTTGATACTGGAGTAATTCCTGCCTCTGAAGAG
bos_taurus        GAGGAAGCTCTGAAATCCAAAGTGACACTTGACTCTGGGGCAGCTCCTGCCTCTGAAGAG
canis_lupus_fam. GAAGAAGCTGTAAAATCCAAAGTGACTCTTGATACCGGAGCAGTCCCTGCCTCTGAAGAG
equus_caballus    GAGGAACCTGTAAAATCCAAAGTGACTCTTGATGCTGGAGCAGCCCTGCCTCTGAAGAG
**.*. *.. . **.* ***: ** * * * : *****

mus_musculus      AAAGGAGACACTGCTGCAGCTCTGGAAGACGACAATGAAGGAGACAAAAAGAAAAAGAT
rattus_norvegicusAAAGGAGACATTGCTGCAACTCTGGAAGATGACAATGAAGGAGACAAAAAGAAAAAGAT
homo_sapiens      AAAGCAGAGACTCCCACAGCTGCAGAAGATGACAATGAAGGAGACAAAAAGAAAGAAAGAT
bos_taurus        AAAGGAGAGGGTCCCATAGGCGCAGAAGATGACAATGAAGGAGACAAAAAGAAAAAGAT
canis_lupus_fam. AAAGGAGAGACTCCCACAGCTGCTGAAGATGACAATGAAGGAGACAAAAAGAAAAAGAT
equus_caballus    AAAGGAGAGACTCCCACAGCCGCTGAAGATGATAATGAAGGAGACAAAAAGAAAAAGAT
**** ** . * * . * . ***** ** *****

mus_musculus      AAGAAGAAAAAGAAAACAGAGAAAGATGAGAAAAGAAAAAGAGAAGAAGAAAGGCCCTAGT
rattus_norvegicusAAGAAGAAAAAGAAAACAGAAAAAGATGATAAAGAAAAAGAGAAGAAGAAAGGCCCAAGC
homo_sapiens      AAGAAGAAAAAGAAAAGGAGAAAAGGAAGAAAAAGAGAAGAGAAGAAAAAGGACCTAGC
bos_taurus        AAGAAGAAAAAGAAAAGGAGAAAAGGAAGAAAAAGGAGAAAAGAAAAGAAAGGACCTAGC
canis_lupus_fam. AAGAAGAAAAAGAAAAGGAGAAAAGGAAGAAAAAGAGAAGAGAAGAAAAAGGACCTAGC
equus_caballus    AAGAAGAAAAAGAAAAGGAGAAAAGGAAGAAAAAGAGAAGAGAAGAAAAAGGACCTAGC
*****.***.**:* **.*.*****.*****.*****.**:*

mus_musculus      AAATCTACTGTTAAAGCTATCCAGGAAGCTTTGGCTAAGCTCAAAGAGGAGGAGGAGAGA
rattus_norvegicusAAATCCACTGTTAAAGCTATCCAGGAAGCTTTGGCTAAGCTCAGAGAGGAGGAGGAGAGA
homo_sapiens      AAAGCCACTGTTAAAGCTATGCAAGAAGCTCTGGCTAAGCTTAAAGAGGAAGAAGAAAGA
bos_taurus        AAAGCCACAGTTAAGGCTATGCAAGAAGCTCTGGCTAAGCTTAAAGAAGAGGAGGAAAGA
canis_lupus_fam. AAAGCAACAGTAAAGCTATGCAAGAAGCTCTGGCTAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAACGG
equus_caballus    AAAGCCACAGTTAAGGCTATGCAAGAAGCTCTGGCCAAACTTAAAGAAGAGGAAGAAAGA
*** * **:***:*.*.***** **.*.***** **** **.* *.*.*.*.*.*.*.

mus_musculus      CAGAAGAGAGAGGAGGAAGAAAGGATTAAGCGGCTTGAGGAGCTTGAAGCCAAACGAAAA
rattus_norvegicusCAGAAGAGAGAGGAGGAGGAAGGATTAAGCGGCTTGAAGAAGCTAGAAGCCAAACGAAAA
homo_sapiens      CAGAAGAGAGAGAGGAAGAACGTATAAAACGGCTTGAAGAATTAGAAGCCAAGCGTAAA
bos_taurus        CAGAAGAGAGAGGAGGAAGAACGGATAAAAACGGCTTGAAGAGTTAGAAGCCAAGCGTAAA
canis_lupus_fam. CAGAAGAGAGAAAGAGGAGGAACGCATAAAAACGACTTGAAGAGTTAGAAGCCAAGCGTAAA
equus_caballus    CAGAAGAGAGAAAGAGGAAGAACGTATAAAAACGACTTGAAGAATTAGAAGCCAAGCGTAAA
*****.*****.*.* **:***.*.*****.**. *:******.*.*:**

mus_musculus      GAAGAGGAACGATTAGAACAAGAAAAAGAGAAAAGGAAAAAGCAAAAAGAAAAAGAAAGA
rattus_norvegicusGAAGAGGAACGATTAGAACAAGAAAAAGAGAAAAGGAAAAAGCAAAAAGAAAAAGAAAGA
homo_sapiens      GAAGAGGAACGATTGGAACAAGAAAAAGAGAAAAGGAAAAAGCAAAAAGAAAAAGAAAGA
bos_taurus        GAAGAGGAAAGATTGGAACAAGAAAAAGAGAAAAGGAAAAAGCAAAAAGAAAAAGAAAGG
canis_lupus_fam. GAAGAGGAAAGACTAGAACAAGAAAAAGAGAAAAGGAAAAAGCAAAAAGAGAAAGAAAGA
equus_caballus    GAAGAGGAAAGATTGGAACAAGAAAAAGAGAAAAGGAAAAAGCAAAAGGAAAAAGAAAGA
*****.* **.*.*****.*****.*****.*****.*.*.*.*****.

```

mus_musculus AAAGAACGGTTAAAAAAGAAGGAAAGCTGTAACTAAGTCCCAGAGAGAAGCCAGAGCC
rattus_norvegicusAAAGAACGGTTAAAAAAGAAGGAAAAGCTGTAACTAAGTCCCAGAGAGAAGCCAGAGCC
homo_sapiens AAAGAACGCTTGAAAAAAGAAGGGAAAAGCTTTTAACTAAATCCCAGAGAGAAGCCAGAGCC
bos_taurus AAAGAACGCTTGAAAAAAGAAGGGGAAAAGCTTTTAACTAAATCCCAGAGAGAAGCCAGAGCC
canis_lupus_fam. AAAGAACGCTTGAAAAAAGAAGGGGAAAAGCTTTTAACTAAATCCCAGAGAGAAGCCAGAGCC
equus_caballus AAAGAACGCTTGAAAAAAGAAGGGGAAAAGCTTTTAACTAAATCCCAGAGAGAAGCCAGAGCC
***** ** .***** .** .** .** ***** .*****

mus_musculus AGAGCCGAAGTGACCCTTAGACACCTCCAAGCTCAGGGTGTGAAAGTGCCATCAAAAGAC
rattus_norvegicusAGAGCTGAAGTGACCCTGAGACACCTCCAAGCGCAGGGTGTGAAAGTGCCATCAAAAGAC
homo_sapiens AGAGCCGAAGCTACTCTTAAACTGCTACAAGCTCAGGGTGTGAAAGTGCCATCAAAAGAC
bos_taurus AGAGCCGAAGCTACCCTTAAACTTCTACAAGCTCAGGGTGTGAAAGTGCCATCAAAAGAC
canis_lupus_fam. AGAGCTGAAGCTACCCTTAAACTTCTACAAGCTCAGGGTGTGAAAGTGCCATCAAAAGAC
equus_caballus AGAGCTGAAGCTACCCTTAAACTTCTACAAGCTCAGGGTGTGAAAGTGCCATCAAAAGAC
***** ** * * * .** : ** .***** *****

mus_musculus TCGTTGCCAAAGAAAAGGCCAGTTTATGAAGATAAGAAGAAGAAGAAAACACCACAGCAG
rattus_norvegicusTCGTTGCCAAAGAAAGAGGCCAGTGTATGAAGATAAGAAGAAGAAGAAAACACCACAGCAG
homo_sapiens TCTTTGCCAAAGAAAGAGGCCAATTTATGAAGATAAAAAGAGGAAAAAATACCACAGCAG
bos_taurus TCTTTGCCAAAGAAAGAGGCCAATTTATGAAGATAAAAAGAAGAAAAAACACCACAGCAG
canis_lupus_fam. TCTTTGCCAAAGAAAAGGCCAATTTATGAAGATAAAAAGAAGAAAAAACATTACAGCAG
equus_caballus TCTTTGCCAAAGAAAAGACCAATTTATGAAGATAAAAAGAAGAAAAAACACCACAGCAG
** ***** .** .** .** ***** .*** .** .** .** * .** .**

mus_musculus CTAGAGAGTAAAGAAGTATCTGAAACTTTGGAAATAAGTGCTCCTGTGGAAGCTGTGGAC
rattus_norvegicusCTGGAGAGTAAAGAAGCACTTGAGACTGTGGAAGTCAGTGCCCTGTGGAAGTTGTGGAC
homo_sapiens CTAGAAAGTAAAGAAGTGTCTGAATCAATGGAATTAATGTGCTGTGGAAGTTATGGAA
bos_taurus AT---GGAAAATAAAGTTTCTGAACCAAGTGAATTAAGTGCTGCTGCCGAAGTTGTGGAG
canis_lupus_fam. CTAGAAAATAAAGAAGTATCTGAACCAATAGAATTAAGTGCTGCTGTGGAAGTTGTGGAA
equus_caballus CTAGAAAATAAAGAAGTGTCTGAACCAACAGAATTAAGTGCTGCTGTGGAAGTTGTGGAA
. * . . . : ** : .*** ** . * : .*** * : .*** ** * * * * .***

mus_musculus CAAGGAGGACCAGAAAAGGAAGAGACGCCACCTTCTGTTGAGCCAGAGGAAGAGGAAGAC
rattus_norvegicusCAAGGAGTACCAGAAAAGGAGGAGACACCGCCTTCTGTTGACGCAGAGGAAGACGAAGAA
homo_sapiens CAAGGAGTACCAGAAAAGGAAGAGACACCCACCTCCTGTTGAACCAAGAAGAAGAAGAT
bos_taurus CAAGGACTACCCGAAAAGAAGAGACACCGCCTCCTATTGAACCAAGAAGAGGAAGAAGAA
canis_lupus_fam. CAAGGAGTCCAGAAAAGGAAGAGACACCCACCTCCTGTTGAACCAAGAAGAGGAAGAAGAA
equus_caballus CAGGGAGTACCAGAAAAGAAGAGACACCTCCTCCTGTTGAACCAAGAAGAGGAAGAAGAA
** .*** : ** .***** .** .***** .** * * * * .*** ***** .** .** .** .***

mus_musculus ACCGAAGATGCTGGCTTAGATGACTGGGAGGCTATGGCCAGTGATGAGGAGAGAGAAAAA
rattus_norvegicusACTGAAGATGCTGGGCTCGATGACTGGGAAGCTATGGCCAGTGATGAGGAGAGAGAAAAA
homo_sapiens ACTGAGGATGCTGGATTGGATGATTGGGAAGCTATGGCCAGTGATGAGGAGACAGAAAAA
bos_taurus ACCGAGGATGCTGGGTTGGATGACTGGGAAGCTATGGCTAGCGATGAGGAGAGAGAGACA
canis_lupus_fam. ACTGAAGATACTGGATTGGATGATTGGGAAGCTATGGCCAGTGATGAAGAGAGAGAAAAA
equus_caballus ACTGAGGATACTGGATTGGATGATTGGGAAGCTATGGCCAGTGATGAGGAGAGAGAACAA
** ** .*** .*** * ***** ***** .***** ** ***** .*** ** .** .**

mus_musculus G---AAGGAAATATGATTACATAGAAAGTAGAAGAAAACCTGAGGAAGAAGAAGAGGAA
rattus_norvegicusG---AAGGAAATATGATTACATAGAAAGTAGAAGAAAACCTGAGGAAGAGGAGGAGGAA
homo_sapiens GTAGAAGGAAACAAAGTTTCATATAGAAAGTAAAAGAAAACCTGAAAGAGGAGGAGGAGGAG
bos_taurus G---AAGAAAACACGGTGCATATAGAAAGTAAAAGAAAACCTGAAAGAGGAGGAGGAGGAG
canis_lupus_fam. GTGGAAGAAAATACTGTGCATATAGAAAGTAAAAGAAAACCTGAGGAGGAAGAGGAAAGAG
equus_caballus G---AAGGAAACACCGTGCATATAGAAAGTAAAAGAGAACCTGAAAGAGGAAGAGGAGGAG
* *** .*** * . * * * ***** .*** .***** .** .** .** .** .** .**

```

mus_musculus      GA---AGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAGAGTGAAGATGAAGAA---GAGGAAGGGGACAGT
rattus_norvegicusGAAGAGGATGA---AGATGAAGAAGACAGTGAAGA---TGAGGAAGACGAAGGGGACAGT
homo_sapiens      GAAGAAGAGGAAGAAGAAGATGAAGAAAAGTGAAGAAGAGGAGGAAGAGGGAGGAAAGT
bos_taurus        GAAGAGGAGGAGGAGGAGGAAGAAGAGAGTGAAGACGAAGAGGAGGAAGAAGGAGACAGT
canis_lupus_fam. GAGGAAGAAGAGAGTGAAGAAGAAGAGAGTGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGGAGAAAAGT
equus_caballus    GAAGAAGATGAAGAGGAAGAAGAAGACAGTGAAGAGGAAGAGGAAGAAGAAGGAGAAAAGT
                  ** .** ** ** **.*:***** ***** ** . ** **.***.***.***

mus_musculus      GAAGGCAGCGATGGGGACGAGGAGGACTGCAAGCTGTCGGATGAGAAGGACTCAGGGAAG
rattus_norvegicusGAGGGCAGCGATGGGGACGAGGAGGACTACAAGCTATCGGACGAGAAGGACTTGGGGAAA
homo_sapiens      GAAGGCAGTGAAGGTGATGAGGAAGATGAAAAGGTGTCAGATGAGAAGGATTCAGGGAAG
bos_taurus        GAAGGCAGTGAAGGTGAAGATGATGATGAAAAGGTGTCAGATGAGAAGGACGCTGGGAAA
canis_lupus_fam. GAAGGCAGTGAAGGTGATGAAGAAGATGAAAAGGTGTCCGATGAGAAGGATGCAGGGAAA
equus_caballus    GAAGGCAGCGAAGGTGATGAAGAAGATGAAAAGGTGTCAGATGAGAAGGATGCAGGGAAA
                  **.****** **.*** ** ** ** **.*** *.*** ** ***** *****

mus_musculus      GCTGGAGACACGAAGCCCAGCAAAGACGCTAGCTCAGACTCCGAGTACGACTCCGACGAC
rattus_norvegicusGCTGGAGACACGAAGCCCAACAAAGACGCTAGCTCAGACTCCGAGTATGACTCTGATGAC
homo_sapiens      ACATTAGATAAAAAAGCCAAGTAAAGAAATGAGCTCAGATTCTGAATATGACTCTGATGAT
bos_taurus        ACATTGGATAAAAAAGCCAAGCAAAGACGCTGAGCTCAGAATCTGAGGATGACTCTGACGAC
canis_lupus_fam. ATGTTAGATAAAAAACCAAGTAAAGAAATGAGTTCAGAATCTGAATACGACTCTGATGAT
equus_caballus    ACATTGGATAAAAAATCAAGTAAAGAACTGAGCTCAGAATCTGAATATGACTCTGATGAT
                  . ** *..**.* **.* *****. ** ***** ** **.* ***** ** **

mus_musculus      GATCGGACTAAAGAAGAGCGGGCGTACGACAAAAGCGAAACGGAGGATTGAGAAACGACGA
rattus_norvegicusGATCGGACTAAAGAAGAGCGGGCGTACGACAAAAGCGAAACGGAGAATTGAGAAACGACGA
homo_sapiens      GATCGGACTAAAGAAGAAAGGGCTTATGACAAAAGCGAAACGGAGGATTGAGAAACGGCGA
bos_taurus        GATCGAACTAAAGAAGAACGGGCTTATGACAAAAGCGAAACGGAGGATTGAGAAACGGCGA
canis_lupus_fam. GATCGAACTAAAGAAGAACGGGCTTATGACAAAAGCGAAACGGAGGATTGAGAAACGGCGA
equus_caballus    GATCGAACTAAAGAAGAAAGAGCTTATGACAAAAGCGAAACGGAGGATTGAGAAACGGCGA
                  *****.*****.***.*** ** ***** *****.*****.*****.***

mus_musculus      CTTGAACATGGTAAAAATGTAAATACAGAAAAGCTGAGAGCCCCTATCATCTGTGTGCTT
rattus_norvegicusCTTGAACATGGTAAAAATGTAAATACAGAAAAGCTAAGAGCCCCTATCATCTGTGTGCTT
homo_sapiens      CTTGAACATAGTAAAAATGTAAACACCGAAAAGCTAAGAGCCCCTATTATCTGCGTACTT
bos_taurus        CTTGAACACAGTAAAAATGTAAATACAGAGAAGCTGAGAGCTCCTGTTATTTGTGTACTT
canis_lupus_fam. CTTGAACATAGTAAAAATGTAAATACAGAAAAGCTAAGAGCTCCTGTTATTTGTGTACTT
equus_caballus    CTTGAGCATAGTAAAAATGTAAATACAGAAAAGCTGAGAGCCCCTATTATCTGTGTACTT
                  *****.** .*****.***.**.******.***** **.* ** ** **.***

mus_musculus      GGACATGTAGACACAGGAAAGACAAAAATCTAGATAAGCTCCGTACACACATGTGCAA
rattus_norvegicusGGACATGTAGACACAGGGAAGACAAAAATCTAGATAAGCTCCGCCACACTCATGTACAA
homo_sapiens      GGGCATGTGGACACAGGGAAGACAAAAATCTAGATAAGCTCCGTACACACATGTACAA
bos_taurus        GGACATGTGGATACAGGGAAGACAAAAATCTAGATAAGCTCCGTACACACATGTACAA
canis_lupus_fam. GGACATGTGGACACAGGGAAGACAAAAATCTAGATAAACTTCGTACACACATGTACAA
equus_caballus    GGACATGTGGACACAGGGAAGACAAAAATCTAGATAAACTCCGTACACACATGTACAA
                  **.******.* ** *****.*****.*****.*** ** *****.******.***

mus_musculus      GATGGCGAAGCAGGTGGTATTACACAGCAGATTGGTGCCACAAATGTTCCCTCTTGAAGCT
rattus_norvegicusGATGGTGAAGCAGGTGGCATCACACAGCAGATTGGTGCCACAAATGTTCCCTCTCGAAGCT
homo_sapiens      GATGGTGAAGCAGGTGGTATCACACAACAAATGGGGCCACCAATGTTCCCTCTTGAAGCT
bos_taurus        GATGGTGAAGCAGGTGGTATCACACAGCAAATGGTGCCACCAATGTTCCCTCTTGAAGCT
canis_lupus_fam. GATGGTGAAGCAGGTGGCATTACTCAACAAATGGGGCCACCAATGTTCCCTCTTGAAGCT
equus_caballus    GATGGTGAAGCAGGTGGTATCACTCAGCAAATGGGGCCACCAATGTTCCCTCTTGAAGCT
                  ***** ***** ** **.***.****** *****.***** ** ** *****

```

mus_musculus ATTAATGAACAAACTAAGATGATTAATAAATTTTGGACAGAGAGAATGTCCGAATCCCAGGG
rattus_norvegicus ATTAATGAACAAACTAAAATGATTAATAAATTTTGGACAGAGAGAATGTCCGCATCCAGGG
homo_sapiens ATTAATGAACAGACTAAGATGATTAATAAATTTTGGATAGAGAGAGAATGTACGGATCCAGGA
bos_taurus ATTAATGAACAAACTAAGATGATTAATAAATTTTGGATCGAGAGAACGTACGGATCCAGGA
canis_lupus_fam. ATTAATGAACAGACTAAGATGATTAATAAATTTTGGATAGAGAGAACGTACGAATCCAGGA
equus_caballus ATTAATGAACAGACTAAGATGATTAATAAATTTTGGATAGAGAGAGAATGTACGGATCCAGGA
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

mus_musculus ATGCTGATTATTGATACTCCTGGACACGAGTCTTTTCAGTAACCTGAGAAACAGAGGAAGC
rattus_norvegicus ATGCTGATTATTGACTCCTGGACATGAGTCTTTTCAGTAACCTGAGAAACAGAGGAAGC
homo_sapiens ATGCTAATTATTGATACTCCTGGGCATGAATCTTTTCAGTAATCTGAGAAATAGAGGAAGC
bos_taurus ATGCTGATTATTGACTCCTGGGCATGAGTCTTTTCAGTAATCTGAGAAACAGAGGAAGC
canis_lupus_fam. ATGCTCATTATTGATACTCCTGGGCATGAGTCTTTTCAGTAATCTGAGAAACAGAGGAAGC
equus_caballus ATGCTGATTATTGATACTCCTGGGCATGAGTCTTTTCAGTAATCTGAGAAACAGAGGAAGC
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

mus_musculus TCTCTTTGTGACATTGCCATTTTAGTTGTTGACATTATGCATGGTTTAGAGCCCCAGACA
rattus_norvegicus TCTCTCTGTGATATTGCCATTTTAGTTGTTGACATTATGCATGGTTTAGAGCCCCAGACA
homo_sapiens TCTCTTTGTGACATTGCCATTTTAGTTGTTGATATTATGCATGGTTTAGAGCCCCAGACA
bos_taurus TCTCTTTGTGACATTGCCATTTTAGTTGTTGATATTATGCATGGTTTAGAGCCCCAGACA
canis_lupus_fam. TCTCTTTGTGATATTGCTATTTTAGTTGTTGACATTATGCATGGTTTAGAGCCCCAGACA
equus_caballus TCTCTTTGTGATATTGCTATTTTAGTTGTTGATATTATGCATGGTTTAGAGCCCCAGACA
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

mus_musculus ATTGAATCAATCAACATTCTCAAATCTAAAAAGTGCCCTTCATTGTTGCACTTAATAAG
rattus_norvegicus ATTGAATCAATCAACATTCTCAAATCTAAAAAGTGCCCTTCATTGTTGCACTTAATAAG
homo_sapiens ATTGAGTCTATCAACCTTCTCAAATCTAAAAAGTGCCCTTCATTGTTGCACTCAATAAG
bos_taurus ATTGAATCTATCAACCTTTTGAAATCTAAAAAGTGCCCTTCATTGTTGCACTCAATAAG
canis_lupus_fam. ATTGAATCTATTAATCTTCTGAAATCTAAAAAGTGCCCTTCATTGTTGCACTCAATAAG
equus_caballus ATTGAATCTATCAACCTTCTGAAATCTAAAAAGTGCCCTTCATTGTTGCACTCAATAAG
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

mus_musculus ATTGACAGGTTATATGATTGGAAGAAGAGTCTGATTCTGATGTGGCTGTTACTTTAAAA
rattus_norvegicus ATTGACAGGTTATATGATTGGAAGAAGAGTCTGATTCTGATGTGGCTGTTACTTTAAAA
homo_sapiens ATTGATAGGTTATATGATTGGAAGAAGAGTCTGACTCTGATGTGGCTGTTACTTTAAAG
bos_taurus ATTGATAGGTTGTATGATTGGAAGAAGAGCCCTGACTCTGACGTGGCCGCTACTCTGAAG
canis_lupus_fam. ATTGATAGGTTGTATGATTGGAAGAAGAGCCCTGACTCTGATGTGGCTGTTACTTTAAAG
equus_caballus ATTGATAGGTTGTATGATTGGAAGAAGAGCCCTGACTCTGATGTGGCTGTTACTTTAAAG
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

mus_musculus AAGCAGAAGAAGAATACAAAGGATGAATTTGAGGAGCGTGCAAAGGCCATTATTGTAGAA
rattus_norvegicus AAGCAGAAGAAGAATACAAAGGATGAGTTTGGAGGAGCGTGCAAAGGCCATTATTGTAGAA
homo_sapiens AAGCAGAAAAAGAATACAAAGATGAATTTGAGGAGCGAGCAAAGGCTATTATTGTAGAA
bos_taurus AAGCAGAAGAAGAACACCAGAGATGAATTTGAGGAGCGGGCCAAGGCGATCATTGTGGAA
canis_lupus_fam. AAGCAGAAAAAGAATACAAAGATGAATTTGAGGAGCGAGCAAAGGCTATTATTGTGGAA
equus_caballus AAGCAGAAAAAGAATACAAAGATGAATTTGAGGAGCGAGCAAAGGCTATTATTGTGGAA
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

mus_musculus TTTGCACAGCAGGGTTTGAATGCTGCTTTGTTTTATGAGAATAAAGATCCCCGCACTTTT
rattus_norvegicus TTTGCACAACAGGGTTTAAATGCTGCTTTGTTTTATGAGAATAAAGATCCCCGCACTTTT
homo_sapiens TTTGCACAGCAGGGTTTGAATGCTGCTTTGTTTTATGAGAATAAAGATCCCCGCACTTTT
bos_taurus TTTGCACAGCAGGGGCTGAATGCAGCTTTGTTCTATGAGAATAAAGATCCCCGCACTTTT
canis_lupus_fam. TTTGCACAGCAGGGTTTGAATGCAGCTTTGTTTTATGAGAATAAAGATCCCCGCACTTTT
equus_caballus TTTGCACAGCAGGGTTTGAATGCAGCTTTGTTTTATGAGAATAAAGATCCCCGCACTTTT
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

mus_musculus GTTCTCAAAGATGAATTGATCCATGAGTTAAAGCAGACACTAAATGCTATCAAACCTAGAA
rattus_norvegicus GTTCTCAAAGATGAATTGATCCATGAGTTAAAGCAGACGCTGAATGCTATCAAATTTGGAA
homo_sapiens GTTCTTAAAGATGAATTGATCCATGAGTTAAAGCAGACACTAAATGCTATCAAATTTAGAA
bos_taurus GTTCTTAAAGATGAGCTGATCCACGAGTTAAAGCAGACACTGAACGCTATCAAATTTAGAA
canis_lupus_fam. GTTCTTAAAGATGAGTTGATCCATGAGTTAAAGCAGACGCTAAATGCTATCAAGTTGGAA
equus_caballus GTGCTTAAAGATGAATTGATCCATGAGTTAAAGCAGACACTAAATGCTATCAAATTTAGAA
** ** *****. ***** ***** *****. ** ** *****. * **

mus_musculus GAAAAAGGAGTTTATGTCCAGGCATCTACACTGGGCTCTTTGGAAGCTCTTCTTGAATTT
rattus_norvegicus GAAAAAGGAGTCTATGTTCAGGCATCTACACTGGGCTCTTTGGAAGCTCTTCTTGAATTT
homo_sapiens GAAAAAGGAGTCTATGTTCAGGCATCTACACTGGGCTCTTTGGAAGCTCTACTGGAATTT
bos_taurus GAGAAAGGCGTCTACGTCCAGGCCTCGACCCTGGGATCTCTGGAAGCTCTCCTTGAATTT
canis_lupus_fam. GAAAAAGGAGTCTATGTTCAGGCATCTACACTGGGATCTTTGGAAGCTCTACTTGAATTT
equus_caballus GAAAAAGGAGTGTATGTCCAGGCATCTACACTGGGATCTTTGGAAGCTCTACTTGAATTT
** ***** **

mus_musculus CTGAAAACATCAGAGGTGCCATATGCAGGAATTAACATTGGCCCAGTCCATAAAAAGGAC
rattus_norvegicus CTGAAAACATCAGAGGTGCCATATGCAGGAATTAACATTGGCCCAGTCCACAAGAAGGAT
homo_sapiens CTGAAAACATCAGAAGTGCCCTATGCAGGAATTAACATTGGCCCAGTGCATAAAAAAGAT
bos_taurus CTGAAGACATCAGAAGTGCCCTACGCAGGGATCAACATTGGGCCCGTCCACAAAAAGAC
canis_lupus_fam. CTAAAAACATCAGAAGTGCCCTATGCAGGAATTAACATTGGTCCAGTCCATAAAAAAGAT
equus_caballus CTGAAAACATCAGAAGTGCCCTATGCAGGGATTAACATTGGTCCAGTCCATAAAAAAGAT
** ** *****. ***** **

mus_musculus GTTATGAAGGCTTCAGTGATGTTGGAACATGATCCCCAGTATGCAGTAATTTTGGCCTTT
rattus_norvegicus GTTATGAAGGCTTCAGTGATGCTGGAACATGATCCGAGTATGCAGTAATTTTGGCCTTT
homo_sapiens GTTATGAAGGCTTCAGTGATGTTGGAACATGACCCCTCAGTATGCAGTAATTTTGGCCTTC
bos_taurus GTCATGAAGGCTTCAGTGATGCTGGAACACGACCCTCAGTATGCAGTAATTTTGGCCTTC
canis_lupus_fam. GTTATGAAGGCTTCAGTGATGCTAGAACATGATCCCCAGTATGCAGTAATTTTGGCCTTT
equus_caballus GTTATGAAGGCTTCAGTGATGTTGGAGCATGATCCTCAGTATGCAGTAATTTTGGCCTTT
** *****. ***** ** ** ** * * *****. *****

mus_musculus GATGTAAGAATTGAACGGGACGCACAAGAGATGGCTGATAGTTTGGGAGTTAGAATCTTT
rattus_norvegicus GATGTAAGAATCGAACGGGATGCGCAAGAGATGGCTGATAGTTTGGGAGTTAGAATCTTT
homo_sapiens GATGTGAGAATTGAACGAGATGCACAAGAAATGGCTGATAGTTTAGGAGTTAGAATTTTT
bos_taurus GATGTGAGAATTGAACGGGATGCCCAAGAAATGGCTGATAGTTTAGGAGTTAGAATTTTT
canis_lupus_fam. GATGTGAGAATTGAACGGGATGCACAAGAAATGGCTGATAGTTTAGGAGTTAGAATTTTT
equus_caballus GATGTGAGAATCGAACGAGATGCACAAGAAATGGCTGACAGTTTAGGAGTTAGAATTTTT
*****. ***** ***** ** ** *****. ***** ***** *****

mus_musculus AGTGCAGAAATTATTTATCACTTATTTGATGCCTTTACAAAATACAGACAGGACTACAAA
rattus_norvegicus AGTGCAGAAATTATTTATCATTTATTTGATGCCTTTACAAAATACAGACAAGACTACAAG
homo_sapiens AGTGCAGAAATTATTTATCACTTATTTGATGCCTTTACAAAATATAGACAAGACTACAAG
bos_taurus AGTGCAGAAATTATTTATCACTTATTTGATGCCTTTACGAAATACAGACAAGACTACAAG
canis_lupus_fam. AGTGCAGAAATTATTTATCATTTATTTGATGCCTTTACGAAATATAGACAAGACTACAAG
equus_caballus AGTGCAGAAATTATTTATCACTTATTTGATGCCTTTACGAAATATAGACAAGACTACAAG
*****. ***** ***** ***** ***** *****

mus_musculus AAACAAAAACAAGAAGAATTTAAGCACATAGCAGTATTTCCCTGCAAGATGAAAATCCTC
rattus_norvegicus AAACAAAAACAAGAAGAATTTAAGCACATAGCAGTATTTCCCTGCAAGATGAAAGATCTC
homo_sapiens AAACAGAAACAAGAAGAATTTAAGCACATAGCAGTATTTCCCTGCAAGATAAAAATCCTC
bos_taurus AAACAGAAACAAGAAGAATTTAAGCACATAGCAGTATTTCCCTGCAAGATAAAGATCCTC
canis_lupus_fam. AAACAGAAACAAGAAGAATTTAAGCATATAGCAGTATTTCCCTGCAAGATGAAAATCCTC
equus_caballus AAACAGAAACAAGAAGAATTTAAGCACATAGCAGTATTTCCCTGCAAGATGAAAATCCTC
*****. ***** ***** ***** ***** ***** ** **

```

mus_musculus      CCTCAATACATTTTCAATTCTCGAGATCCAATAGTAATAGGGGTCACTGTGGAGGCTGGT
rattus_norvegicus CCTCAGTACATTTTCAATTCCCAGAGATCCAATAGTAATAGGGGTCACTGTGGAGGCTGGT
homo_sapiens      CCTCAGTACATTTTCAATTCTCGAGATCCGATAGTGATGGGGGTGACGGTGGGAAGCAGGT
bos_taurus        CCTCAGTTTATCTTCAATTCTCGGGATCCGATAGTGATGGGCGTGACTGTGGAAGCAGGG
canis_lupus_fam.  CCCCAGTATATTTTCAATTCTCGAGACCCAATAGTGATGGGAGTGACTGTGGAAGCAGGT
equus_caballus    CCTCAGTATATTTTCAATTCTCGAGATCCAATAGTGATAGGAGTGACTGTGGAAGCAGGT
                  ** *.*: ** ** ***** *.** *.*****.*** ** ** *****.*****

mus_musculus      CAAGTGAAACAAGGAACACCTATGTGCGTTCGAAGCAAAAATTTTGTGACATTGGGATA
rattus_norvegicus CAAGTGAAACAAGGAACACCTATGTGTGTTCCAAGCAAAAATTTTGTGACATTGGGATA
homo_sapiens      CAGGTGAAACAGGGGACACCCATGTGTGTCCCAAGCAAAAATTTTGTGACATCGGAATA
bos_taurus        CAGGTGAAACAGGGGACACCCATGTGCGTGCCCAAGCAAAAATTTTGTGACATTGGAATA
canis_lupus_fam.  CAGGTGAAACAGGGGACACCCATGTGCGTCCCTAGCAAAAATTTTGTGACATTGGAATA
equus_caballus    CAGGTGAAACAGGGGACACCCATGTGCGTCCCTAGCAAAAATTTTGTGACATTGGAGTA
                  **.******.***.***.***** ***** ** ** ********** **.*.***

mus_musculus      GTAACAAGCATTGAAATAAACCACAAGCAGGTGGATGTTGCAAAAAAAGGACAAGAGGTC
rattus_norvegicus GTAACAAGCATTGAAATAAACCACAAGCAGGTGGATGTTGCAAAAAAAGGACAAGAGGTC
homo_sapiens      GTAACAAGTATTGAAATAAACCATAAACAAGTGGATGTTGCAAAAAAAGGACAAGAAGTT
bos_taurus        GTAACAAGTATTGAAATAAACCATAAACAAGTGGATGTTGCGAAAAAAGGCCAAGAAGTC
canis_lupus_fam.  GTAACAAGTATTGAAATAAACCATAAACAAGTGGATGTCGAAAAAAGGACAAGAAGTC
equus_caballus    GTCACAAGTATTGAAATAAACCATAAACAAGTGGATGTTGCAAAAAAAGGACAAGAAGTC
                  **.****** *****.***** **.*.***** **.******.***.*****.*

mus_musculus      TGTGTCAAAATAGAACCTATCCCTGGGGAATCTCCAAAATGTTTGGGAGACATTTTGAA
rattus_norvegicus TGTGTCAAAATAGAACCTATCCCTGGGGAATCTCCAAAATGTTTGGGAGACACTTCGAA
homo_sapiens      TGTGTAAAAATAGAACCTATCCCTGGTGAAGTCAACCAAAAATGTTTGGGAGACATTTTGAA
bos_taurus        TGTGTCAAAATAGAACCCATCCCAGGTGAATCTCCAAAATGTATGGACGCCATTTTGAA
canis_lupus_fam.  TGTGTCAAAATAGAACCTATCCCTGGTGAATCTCCAAAATGTATGGAGACATTTTGAA
equus_caballus    TGTGTCAAAATAGAACCTATCCCTGGGGAATCTCCCAAGATGTACGGGAGACATTTTGAA
                  *****.****** *****:** **.*:**.*.***:**.*.***:**.*.***

mus_musculus      GCTACAGATATACTTGTGTCAGCAAGATCAGCCGGCAGTCCATCGATGCACTCAAAGACTGG
rattus_norvegicus GCTACAGACATTCTTGTGTCAGCAAGATCAGCCGGCAGTCCATCGATGCACTCAAAGACTGG
homo_sapiens      GCTACAGATATTCTTGTGTCAGTAAGATCAGCCGGCAGTCCATCGATGCACTCAAAGACTGG
bos_taurus        GCTACAGACATTCTCGTCAGTAAGATCAGCCGGCAGTCCATCGATGCTCTCAAAGACTGG
canis_lupus_fam.  GCTACAGACATTCTTGTGTCAGTAAGATCAGCCGGCAGTCCATCGATGCCCTCAAAGACTGG
equus_caballus    GCTACAGACATCCTTGTGTCAGTAAGATTAGCCGGCAGTCCATCGATGCCCTCAAAGACTGG
                  ***** ** ** ** ** ***** ***** *****.*****

mus_musculus      TTCAGAGACGAAATGCAGAAGAGTGACTGGCAGCTTATTGTGGAGCTGAAGAAAGTATTT
rattus_norvegicus TTCAGAGACGAAATGCAGAAGAGTGACTGGCAGCTTATTGTGGAGCTGAAGAAAGTATTT
homo_sapiens      TTCAGAGATGAAATGCAGAAGAGTGACTGGCAGCTTATTGTGGAGCTGAAGAAAGTATTT
bos_taurus        TTCAGAGACGAGATGCAGAAGAGTGACTGGCAGCTTATTGTGGAGCTGAAGAAAGTATTT
canis_lupus_fam.  TTCAGAGATGAGATGCAGAAGAGTGACTGGCAGCTTATTGTGGAGCTGAAGAAAGTATTT
equus_caballus    TTCAGAGACGAAATGCAGAAGAGTGACTGGCAGCTTATTGTGGAGCTGAAGAAAGTATTT
                  ***** **.***********

mus_musculus      GAAATCATCTAA
rattus_norvegicus GAAATCATCTAA
homo_sapiens      GAAATCATCTAA
bos_taurus        GAAATCATCTAA
canis_lupus_fam. GAAATCATCTAA
equus_caballus    GAAATCATCTAA
                  *****

```