

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung des Gesamtgenoms P/1C1

Das Genom des TTV-Isolats P/1C1 (3756 bp) lag zu Beginn der Arbeiten als unvollständige Sequenz (3688 bp) im Vektor pGEM-T vor (59) (Abb. 4-1A). Um das Transkriptionsprofil und das daraus resultierende Expressionsmuster dieses Isolates zu ermitteln, musste die fehlende 68 bp Sequenz vervollständigt werden. Durch anschließende Amplifizierung des Gesamtgenoms war die Klonierung in den Vektor pGI3-Promotor möglich. Das fertige Konstrukt wurde für die weiterführenden Versuche zur Replikations- und Transkriptionsanalyse eingesetzt.

4.1.1 Konstruktion des Plasmids pGEM/TTVKus2a (6728 bp) - Auffüllen der 68 bp Deletion

Die Vervollständigung des Genoms erfolgte durch Auffüllen der 68 bp-Deletion (Position im viralen Genom: 114 bp - 181 bp), wobei einander überlappende Oligonukleotide in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt wurden (Abb. 4-1B) (s. 3.2.8). Die Restriktionsschnittstellen der Überhänge des hybridisierten Konstruktes wurden so gewählt, dass eine gerichtete Klonierung über nur einmal in der Sequenz vorhandene Schnittstellen erfolgte. Im Genom wurde *Pst* I (Pos. 306 bp) und innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (MCS) *Sac* I ausgewählt. Für die Insertion der neu generierten 68 bp Sequenz mussten also auch die Bereiche der schon vorliegenden Vektor- und Genombereiche neu hybridisiert werden. Die durch Hybridisierung entstandenen Multimere wurden in einem sequenziellen Verdau mit *Pst* I und *Sac* I geschnitten. Das so konstruierte DNA-Fragment (Pos. 301 - 104 bp) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt und in den *Pst* I/*Sac* I restringierten pGEM/TTVKus kloniert. Im so entstandenen pGEM/TTVKus2a (6728 bp) lag das P/1C1-Genom mit einer Länge von 3766 bp im Vektor pGEM-T vor.

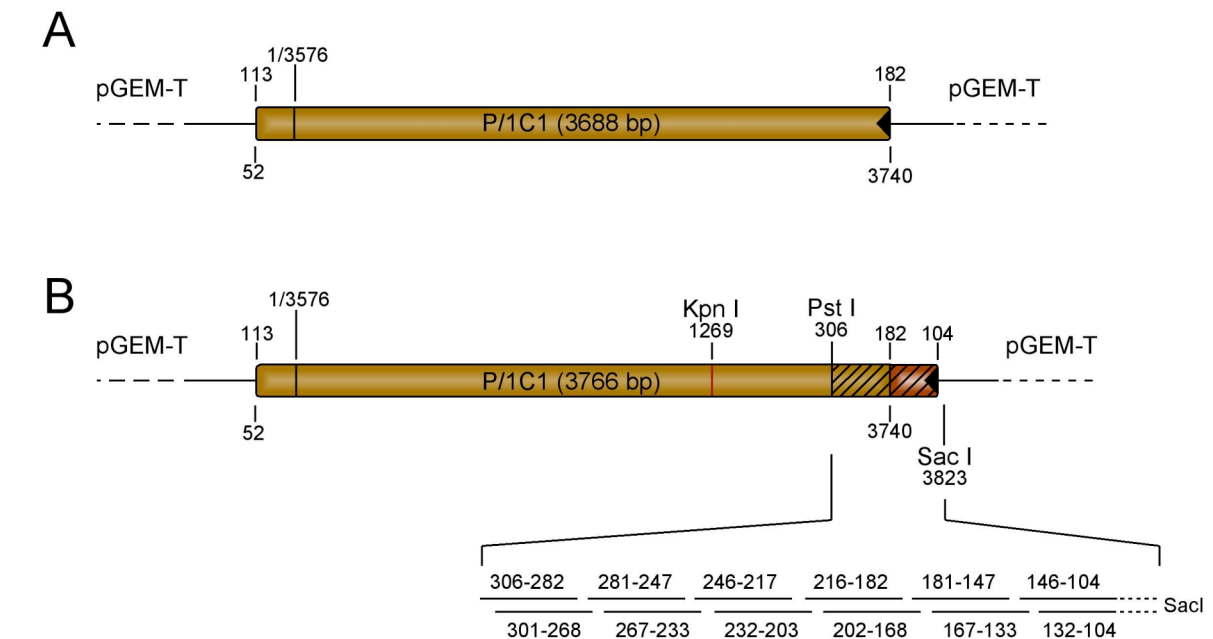


Abbildung 4-1: Generierung des pGEM/TTVKus2a. (A) Ausschnitt aus dem pGEM/TTVKus. (B) Ausschnitt aus dem pGEM/TTVKus2a. Der schraffierte Bereich markiert den durch Oligomerisierung klonierten Abschnitt. Die Darstellung unterhalb zeigt die hybridisierten Oligonukleotide mit Positionsangabe innerhalb des Genoms. Positionsangaben oberhalb der Plasmidausschnitte beschreiben die Position im Genom, Angaben unterhalb der Ausschnitte beschreiben die Position im Vektor.

4.1.2 Konstruktion des Plasmids pGI3-P/1C1

Um das P/1C1-Genom zu mobilisieren, wurde unter Verwendung der Primer 879 und 878 das Gesamtgenom ausgehend vom Vektor pGEM/TTVKus2a amplifiziert. Aufgrund der Länge des Genoms und der GC-reichen Sequenz wurde die LA Taq Polymerase zur Amplifikation eingesetzt und der für GC-reiche Sequenzen optimierte Puffer GC I verwendet (s. 3.1.1.2). Nach Aufreinigung der DNA im Anschluss an eine Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Enden aufgefüllt und phosphoryliert (s. 3.4.1; 3.2.2; 3.2.4). Das Konstrukt wurde religiert, mit dem Restriktionsenzym *Kpn* I (Pos. 1269 bp) linearisiert und in den Vektor pGL3-Promoter eingefügt (Abb. 4-2) (s. 3.2.5, 3.2.1). Das virale Genom lag im Anschluss an die Insertion revers im Vektor vor. Die für die Klonierung verwendeten Primer, die Annealingtemperatur und die verwendete Matrize sind im Anhang (A.1, A.2) aufgeführt.

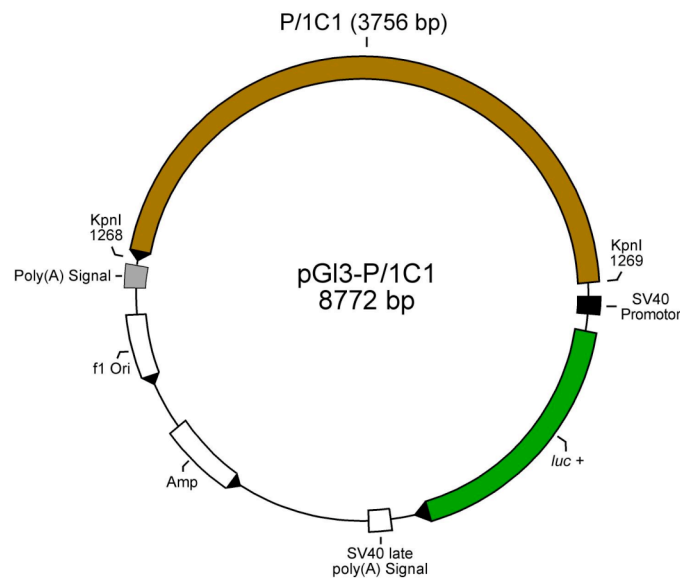


Abbildung 4-2: Vektorkarte des pGI3-P/1C1 (P/1C1: 6-3762; SV40 Promotor: 3810-4012; Firefly Luciferase luc+: 4042-5694; SV40 late Poly(A)-Signal: 5726-5947; β -Laktamase (Amp^r): 7034-7894; f1 Ori: 8026-8481; Poly(A)-Signal: 8612-8765)

4.2 Untersuchung eukaryotischer Zelllinien hinsichtlich TTV-spezifischer DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelllinien Huh7 (humane Leberzelllinie), HeLa (humane Zervixkarzinomzelllinie), HEK 293 (humane Nierenzelllinie), Vero (Green Monkey Nierenzelllinie) und PS (Schweinenierenzelllinie) verwendet (Informationen zu den Zelllinien s. 2.1.10, 3.9.1). Da die Seroprävalenz von TTV bei Menschen und Tieren sehr hoch ist, wurden zu Beginn der Arbeit die verwendeten Zelllinien hinsichtlich humaner TTV-spezifischer DNA untersucht, um eine Verfälschung nachfolgender Experimente durch eine eventuelle Kontamination zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde eine etablierte UTR-A PCR verwendet (s. 3.1.1.3) (13). Diese semi-nested PCR amplifiziert einen bei humanen TTV-Isolaten hochkonservierten Bereich innerhalb der UTR. Als Positivkontrolle wurde das zirkularisierte P/1C1-Genom eingesetzt. Im ersten PCR-Zyklus wurde mit den Primern NG343 und NG344 ein 132 bp DNA-Fragment amplifiziert, welches im zweiten PCR-Zyklus

als Matrize für die Primer NG343 und TTSPEN diene. Das aus dieser Amplifikation resultierende 114 bp DNA-Fragment diene als Nachweis TTV-spezifischer DNA.

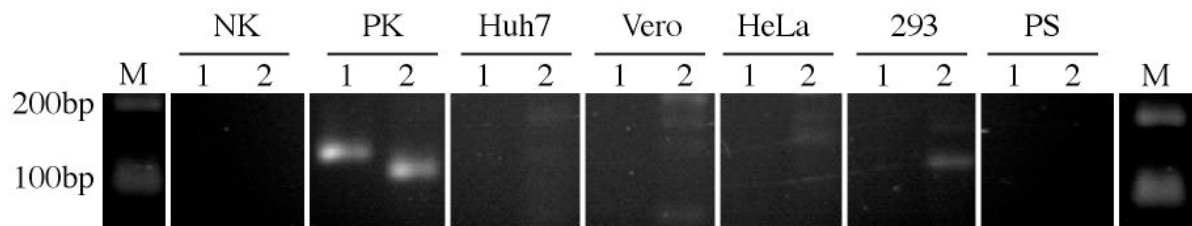


Abbildung 4-3: UTR-A-PCR zur Bestimmung eventueller TTV-Kontaminationen der verwendeten Zelllinien. Amplikate des ersten und zweiten semi-nested PCR-Zyklus wurden in einem 2%igem Agarosegel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid visualisiert. NK: Negativkontrolle; PK: Positivkontrolle (zirkularisiertes P/1C1 Genom). Marker (M): 100 bp DNA Ladder

In Abbildung 4-3 ist das Ergebnis der diagnostischen UTR-A-PCR zur Bestimmung möglicher TTV-spezifischer Kontaminanten dargestellt. Für die untersuchten Zelllinien war nach dem ersten Zyklus keine virale DNA nachweisbar. Allerdings war nach dem zweiten Zyklus bei den humanen Zelllinien und der Affenzelllinie ein schwaches Bandenmuster zu erkennen. Ein DNA-Amplifikat in der zu erwartenden Größe trat nicht auf, was auf eine unspezifische Amplifikation hindeutete. Die humanen Nierenzellen HEK 293 zeigten ein schwaches Signal, dass im Vergleich zur TTV-Referenz größer ausfiel. Um auszuschließen, dass es sich um ein TTV-spezifisches Signal handelte, wurde das Amplifikat aus dem Gel extrahiert und in den Vektor pCR2.1 kloniert (s. 3.2.6). Die nachfolgende Sequenzierung ergab, dass die Zellen nicht mit TTV kontaminiert waren.

4.3 Kartierung der Transkripte von P/1C1

TTV ist durch eine hohe Sequenzdiversität der unterschiedlichen Genotypen gekennzeichnet. Auf Ebene der genomischen Sequenz wird eine Abweichung von über 40 %, auf der Aminosäureebene sogar von über 60 % festgestellt (55, 140, 178). Doch trotz dieser Diversität ist für viele TTV-Isolate die Synthese von drei mRNAs (2.8 kb, 1.2 kb und 1.0 kb) nachgewiesen worden (78, 139). Diese sind durch ein gemeinsames Spleißereignis vor dem kodierenden Bereich charakterisiert. Während die 2,8 kb-mRNA nur dieses eine Spleißereignis aufweist, werden die 1,2 kb- und die 1,0 kb-mRNA durch einen zusätzlichen Spleißprozess gebildet. Für das TTV-Isolat HEL32 aus der Genogruppe 1 wurden Spleißinitiationsstellen definiert und die Expression von sechs Proteinen ausgehend von diesen Transkripten gezeigt (157). In einer kürzlich veröffentlichten Studie ist für mehrere TTV-Isolate das Vorkommen zusätzlicher Spleißereignisse beschrieben worden, die auf die Expression weiterer Proteine hindeuten (90).

Das in der Arbeit untersuchte TTV-Isolat P/1C1 wird der Genogruppe 1 zugeordnet und weist zu HEL32 eine Sequenzhomologie von 70,4 % auf. Für dieses Isolat sollte ein Transkriptionsprofil erstellt werden.

4.3.1 cDNA-Synthese ausgehend von mRNA aus P/1C1 transfizierten Leberzellen (Huh7)

Für die Synthese der cDNA wurde die mRNA P/1C1-transfizierter Huh7-Zellen nach 48 h extrahiert und mittels des optimierten Reaktionsansatz aus Superscript III (Invitrogen) und RLM RACE Kit (Ambion) umgeschrieben (s. 3.1.2.1 und 3.1.2.2).

4.3.2 Synthese der 5'- und 3'-RACE von TTV-Transkripten

Zur Charakterisierung der viralen Transkripte wurden die mRNAs so modifiziert, dass sie unter Verwendung eines 3'-Adapter-Primers oder eines 5'-Adapter-Primers in cDNA umgeschrieben werden konnten (s. 3.1.2.1 und 3.1.2.2). Für das zur Genogruppe 1 gehörende TTV-Isolat HEL32 waren die Spleißinitiationsstellen kartiert. Diese Informationen wurden

auf die Sequenz des P/1C1 übertragen, um sequenzspezifische Primer zu generieren. Diese wurden in einer 5'- und 3'-RACE sowohl zur Identifizierung von Spleißakzeptor- und Spleißdonorstellen als auch zur Kartierung der 3'- und 5-Enden eingesetzt (Abb. 4-4). Die RACE wurde sowohl als semi-nested PCR als auch als nested-PCR durchgeführt. Dafür wurden die 5'-RACE Adapter-Primer 5#1 und 5#2 sowie die 3'-RACE Adapter-Primer 3#1 und 3#2 mit sequenzspezifischen Primern oder auch nur sequenzspezifische Primer verwendet.

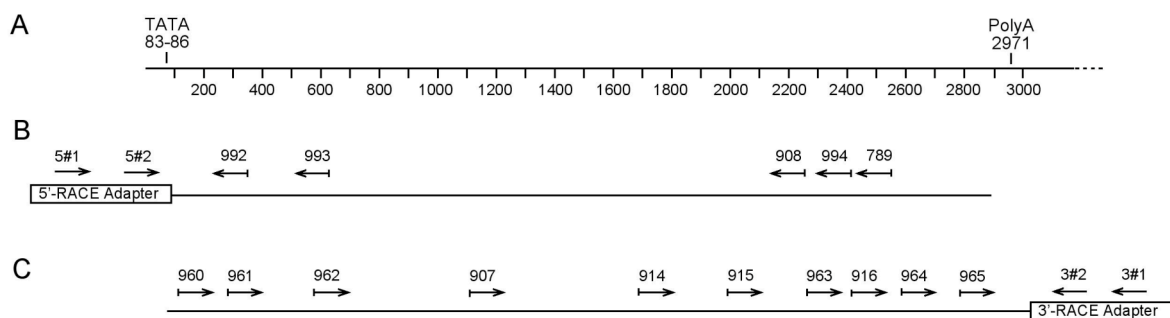


Abbildung 4-4: Strategie zur Durchführung der 3'-RACE und der 5'-RACE (A) P/1C1 Genomausschnitt mit Skalierung (B) 5'-RACE, 5#1: 5'RACE Outer Primer, 5#2: 5'-RACE Inner Primer (C) 3'-RACE, 3#1: 3'-RACE Outer Primer, 3#2: 3'-RACE Inner Primer; Positionsangaben und Sequenzen der genspezifischen Primer sind im Anhang A.1 aufgelistet.

4.3.3 Sequenzanalyse der 5'- und 3'-RACE-Produkte

Die aus der RACE-PCR gewonnenen Amplifikate wurden zunächst in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.5.1). Dabei traten neben den erwarteten Fragmentgrößen weitere Amplifikate auf. Für die Sequenzierung wurden Fragmente der erwarteten Größe und Amplifikate, die im zweiten PCR-Zyklus verstärkt amplifiziert worden waren, aus dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt (s. 3.3.1, 3.4.5). 200 - 400 bp große Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und anschließend mit den Primern M13F und M13R sequenziert (s. 3.2.6; s. 3.4.5). Fragmente mit einer Länge >400 bp wurden direkt mit den RACE-Primern sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der Software SeqMan und MacVector mit der genomischen Sequenz von P/1C1 verglichen. Die beobachteten Spleißstellen sind in Abbildung 4-5 dargestellt.

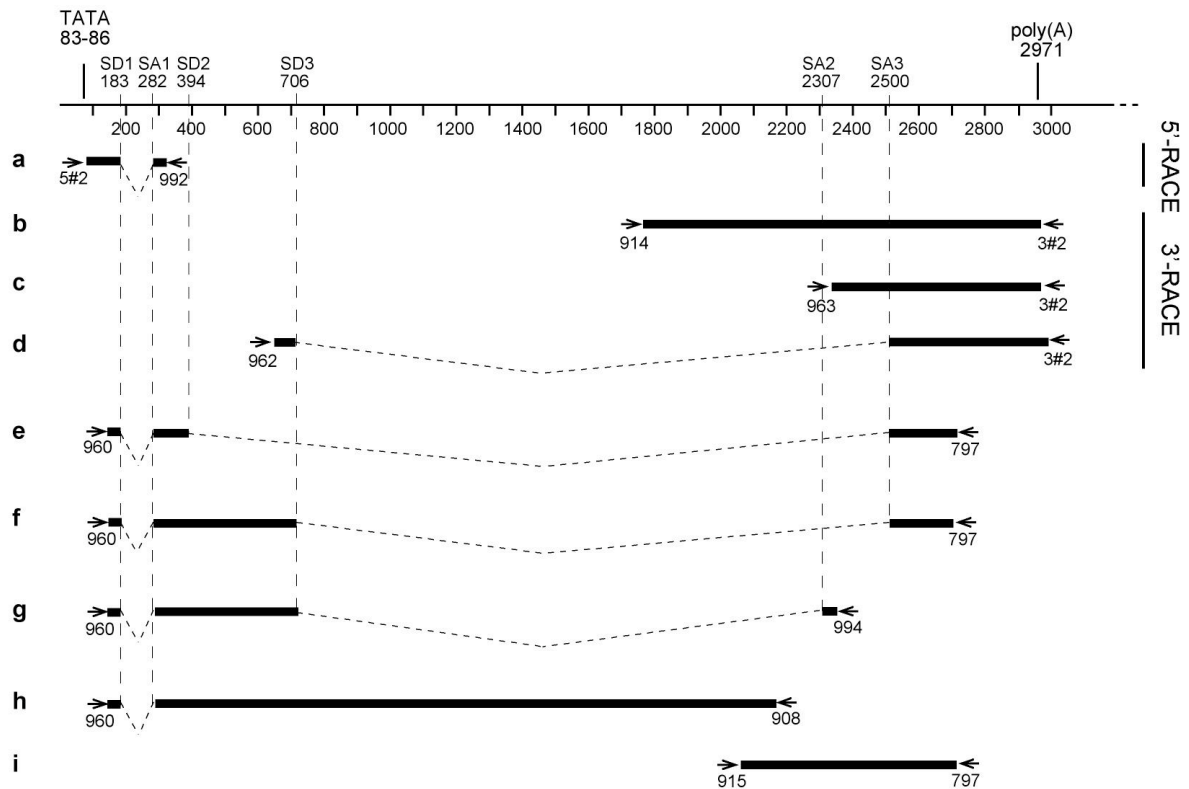


Abbildung 4-5: Ergebnis der Transkriptkartierung. Darstellung der RACE-Produkte hinsichtlich ihrer Position im P/1C1-Genom (oben schematisch dargestellt). Die per RACE kartierten Spleißinitiationsstellen sind durch vertikal gestrichelte Linien dargestellt. Die Positionsangaben der Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen (SD und SA) sind über dem Genom angegeben.

Das cDNA-Amplifikat *e* ist das Produkt einer semi-nested PCR, wobei im ersten Zyklus der genspezifische Primer 960 und der Adapterprimer 3#1 eingesetzt wurden. Im zweiten PCR-Zyklus wurde unter Anwendung der Primer 797 und 960 ein 425 bp Amplifikat erzeugt, das zwei Spleißinitiationsstellen trägt. Die erste Spleißdonorstelle liegt an Position 183 bp (SD1), die erste Spleißakzeptorstelle (SA1) an Position 282 bp. Dieses erste 99 nt Intron trat auch im 5'-RACE-Produkt *a* und in den cDNA-Amplifikaten *f-h* auf. Eine weitere Spleißdonorstelle an Position 394 bp (SD2) sowie eine Spleißakzeptorstelle an Position 2500 bp (SA3) resultieren in einem 2106 nt-Intron.

Das cDNA-Amplifikat *f* mit 737 bp resultiert ebenfalls aus der oben beschriebenen semi-nested PCR. Zusätzlich zum ersten Intron wurde eine zweite SD an Position 706 bp (SD3) beschrieben, die in Kombination mit SA3 ein 1794 nt-Intron ergibt.

Das cDNA-Amplifikat *g* ist das Produkt einer semi-nested PCR mit den schon beschriebenen Primern im ersten PCR-Zyklus und unter Anwendung des genspezifischen Primers 994 im

zweiten PCR-Zyklus. Das daraus resultierende 571 bp-Amplifikat weist ein zweites Intron von 1601 nt auf, welches durch die SD3 und SA2 an Position 2307 bp entsteht.

Die Existenz eines Transkriptes mit nur einem Intron, welches in der Literatur mehrfach beschrieben worden ist und dem 2,8 kb-Transkript entspricht (78, 139), wurde mit den Primerpaaren 3#1/960 und 3#2/960, 3#1/961 und 3#2/962 sowie 3#1/962 und 3#2/962 untersucht. Ein entsprechendes Transkript wurde nicht amplifiziert. Der Einsatz von genspezifischen Primern, welche im Sequenzbereich 706 bp bis 2307 bp binden, sollte ebenfalls das Bestehen eines nur einfach gespleißten Transkriptes, das dem kompletten Leserahmen *orf1* entspricht, nachweisen. Die Kombination der Primerpaare 960/994 und 960/908 in der semi-nested PCR resultierten in einem 2036 bp-Amplifikat. Dieses Transkript *h* besitzt nur das erste Intron und umfasst zusätzlich den Bereich 706 bp bis 2287 bp, welcher in den drei vorher charakterisierten Transkripten durch alternative Spleißvorgänge nicht mehr vorhanden ist.

Das 3'-RACE-Amplifikat *b* wurde mit dem Primerpaar 907/3#1 im ersten PCR-Zyklus und dem Primerpaar 914/3#2 in der zweiten PCR-Runde amplifiziert. Der Primer 914 kann hierbei nur binden, wenn es sich um ein einfach gespleißtes 3'-RACE-Produkt handelt. Die Existenz des Transkriptes 2,8 kb wird durch die Amplifikate *c* und *i* bestätigt. Die aus den Sequenzanalysen resultierenden Kombinationen von SD und SA sind in Abbildung 4-6 zusammengefasst. Die Sequenzen der Spleißinitiationsstellen entsprechen dabei den eukaryotischen Konsensussequenzen für SD und SA.

Den 3'-RACE-Amplifikaten *b*, *c* und *d* ist ein Polyadenylierungssignal an Position 2971 - 2976 bp gemein (Abb. 4-5; Abb. 4-7B), welches mit dem Stoppcodon *TAA* überlagert. In allen analysierten Transkripten trat ab Position 2994 bp die Poly(A)-Sequenz auf.

		Spleißdonorsequenz		Spleißakzeptorsequenz	
Konsensussequenz		Exon	$\frac{C}{A}AGGT\frac{A}{G}AGT$	$\frac{CC}{TT}N\frac{C}{T}AG\frac{G}{A}$	Exon
Genom	SD1(183)	GGGTGCCG	AAGGTGAGT	TT ACAGAA	SA1(282)
cDNA		GGGTGCCG	AAG	AAAGAA	
Genom	SD2(394)	GAGAGAAA	CTGGTACG	CT ACAGG	SA3(2500)
cDNA		GAGAGAA	CTG	GACCAC	
Genom	SD3(706)	CTCGTCGA	AAGAGTAAGG	AA ACAGG	SA2(2307)
cDNA		CTCGTCGA	AAG	GTCGTC	
Genom	SD3(706)	CTCGTCGA	AAGAGTAAGG	CT ACAGG	SA3(2500)
cDNA		CTCGTCGA	AAG	GACCAC	

Abbildung 4-6: Sequenzanalyse der Spleißdonorsequenzen und Spleißakzeptorsequenzen. Die SD und SA sind grau unterlegt, die Initiationsnukleotide durch Fettdruck hervorgehoben. Die Konsensussequenzen entsprechen der eukaryotischen SD und SA.

Die Amplifikation der 5'-RACE-Produkte erfolgte mit den genspezifischen Primern 992, 993, 908, 994 und 789, welche stromabwärts der SA1 binden, und den Adapterprimern 5#1 und 5#2. Die Mehrzahl der erhaltenen 5'-RACE-Amplifikate (9 von 11) wies einen möglichen Transkriptionsstartpunkt an Position 111 bp auf und stimmt in der Sequenz mit dem a1 Amplifikat überein. Das 5'-RACE-Amplifikat a2 (3 von 11) wies den Transkriptionsstartpunkt an Position 129 bp auf (Abb. 4-7).

Mit Hilfe der 5'-RACE wurden die nicht-kodierenden 5'-Bereiche charakterisiert und die in der 3'-RACE identifizierten Spleißinitiationsstellen SD1 und SA1 verifiziert.

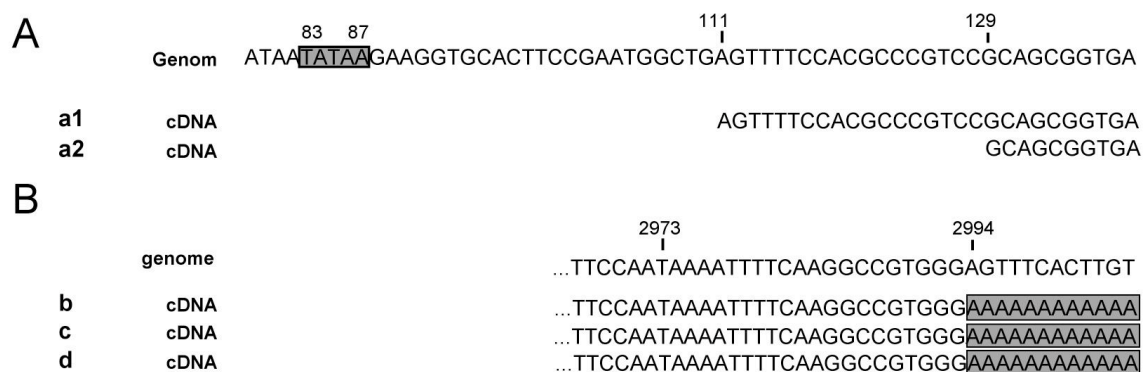


Abbildung 4-7: Darstellung der 3'- und 5'-RACE. (A) 5'-RACE cDNA-Amplifikate a1 und a2. Die TATAA-Box ist in der genomischen Sequenz durch eine graue Box markiert. (B) 3'-RACE Produkte. Der Poly(A)-Anhang ist in einem schattierten Rahmen dargestellt.

4.3.4 Transkriptionskarte und Expressionsmuster

Die Expression von sechs Proteinen ausgehend von drei mRNAs des Genotyps HEL32 wurde 2005 von Qiu et al. nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass die Sequenz des ersten Exons vom Transkriptionsstartpunkt bis zur ersten SD keine Startkodons aufweist, sodass sich die Translationsstartpunkte im zweiten Exon befinden müssen. Die Sequenz des P/1C1 weist bis zur Position 182 nt (SD1) ebenfalls kein Startkodon auf, Exon 1 ist demzufolge nicht kodierend. Auf dieser Grundlage wird für das TTV Isolat P/1C1 die Expression der folgenden Proteine postuliert (Abb. 4-8):

Vom 2,8 kb-Transkript, welches nur das erste Intron aufweist, wird ab dem ATG an Position 583 nt das ORF1-Protein (733 As) und ab Position 347 nt das ORF2-Protein (120 As) exprimiert. O1AUG⁵⁸³ (*GCCAUGG*) entspricht der Kozak-Konsensussequenz für das eukaryotische Startkodon (*((GCC)RCCAUGG)*) und ist das erste AUG im Leserahmen 1. Das erste Startkodon in der 2,8 kb-mRNA ist das O2AUG³⁴⁷ (*AUUAUGU*), welches geringfügig von der Konsensussequenz abweicht.

Das 1,2 kb-Transkript weist ein weiteres Intron auf. Die im zweiten Exon vorhandenen Translationsstartpunkte O1AUG⁵⁸³ und O2AUG³⁴⁷ sind auch Startpunkte für die Expression der Proteine ORF1/1 (199 As) und ORF2/2 (284 As). Aufgrund des gemeinsamen O1AUG⁵⁸³ und des Stoppkodons *TAA* an Position 2784 nt stellt das ORF1/1-Protein ein alternatives Spleißprodukt zum ORF1-Protein dar. Das Stoppkodon für das ORF2/2-Protein ist das TGA an Position 2803 nt.

Für die Expression der Proteine ORF1/2 (141 As) und ORF2/3 (277 As) ausgehend vom 1,0 kb Transkript sind wiederum O1AUG⁵⁸³ und O2AUG³⁴⁷ die Translationsstartpunkte. Das Stoppkodon *TAA* des ORF2/3 überlappt mit dem Poly(A)-Signal an Position 2971 - 2976 nt. Für das 0,6 kb-Transkript kann laut Computeranalyse ein alternatives Spleißprodukt des ORF2/3-Proteins (173 As) gezeigt werden. Die Nomenklatur der Proteine bezieht sich auf den Leserahmen, in dem das Protein kodiert wird. So setzt sich das Protein ORF1/2 aus Exon 1 im ersten Leserahmen und dem kodierenden Bereich des Leserahmens 2 im Exon 3 zusammen. Da für das Protein ORF2/3 zwei unterschiedliche Spleißvarianten vorliegen, wird ORF2/3 vom Transkript 1,0 kb im Folgenden als ORF3 und ORF2/3 vom Transkript 0,6 kb als ORF4 bezeichnet.

Die Expression eines Proteins ausgehend von einem O3AUG⁴¹⁷; O3AUG⁵⁹⁴ oder O3AUG⁶²⁴ im Transkript 1,2 kb, 1,0 kb und 0,6 kb im zweiten Exon ist durch stromabwärtsliegende

Stoppkodons TAA^{528} und TAG^{663} im dritten Leserahmen nicht möglich. Diese Schlussfolgerungen werden durch die Transkriptionsstudie von Qiu et al. 2005 unterstützt.

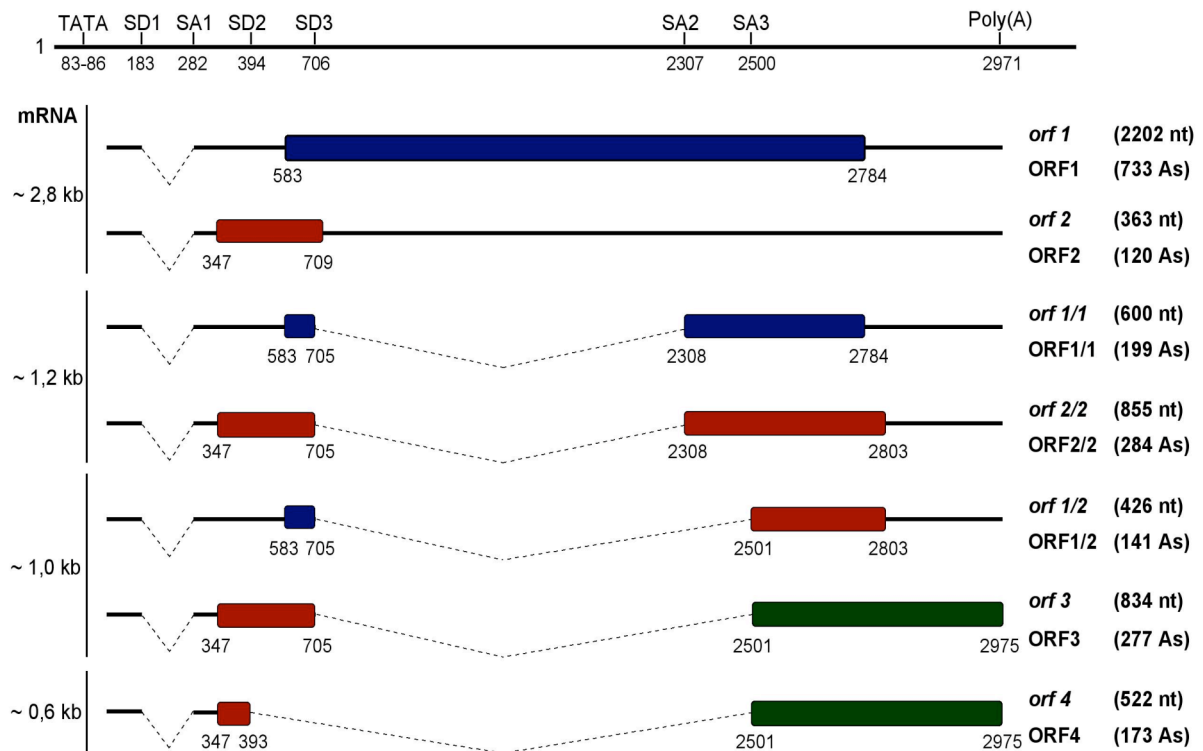


Abbildung 4-8: Schematische Darstellung der potentiellen Leserahmen der kartierten Transkripte. Unterhalb der genomischen Sequenz mit Angabe der SD und SA sowie der Transkriptionsinitiationsstelle *TATA* und dem Poly(A)-Signal *AATAAA* sind die vier kartierten Transkripte dargestellt. Die drei verschiedenen Leserahmen sind farblich gekennzeichnet (Leserahmen 1: blau; Leserahmen 2: rot; Leserahmen 3: grün).

4.3.5 Sequenzanalyse der Proteine des TTV-Isolates P/1C1

Das ORF1-Protein setzt sich aus 733 As zusammen und ist durch einen argininreichen N-Terminus gekennzeichnet, welcher die As 1 - 68 des Proteins umfasst. Das Protein trägt zwei der vier spezifischen Motive, welche für Proteine, die die Replikation über den Rolling Circle Mechanismus vermitteln, charakterisiert sind. Dem Motiv I (FTL, Pos. 124 - 126 As) ist bisher keine Funktion zugeschrieben worden, doch führen Mutationen zur Blockierung der Initiation der viralen Replikation (105). Das Motiv III (YXXK) ist in der ORF1-Sequenz zweimal vorhanden: YKDK (349 - 352 As) sowie YLTK (430 - 433 As). Dieses Motiv wurde für die Katalyse des Einzelstrangbruchs zur Initiation der Replikation als essentiell beschrieben (88, 172, 181).

Das ORF1/1-Protein umfasst 199 As und stellt die gespleißte Form des ORF1-Proteins dar, wobei die ersten 41 As des ORF1/1-Proteins mit den 158 As des C-Terminus des ORF1-Proteins durch alternatives Spleißen verbunden sind. Das Protein trägt einen argininreichen N-Terminus (1 - 68 As) und einen glutaminreichen C-Terminus. Die für den ORF1-Proteins beschriebenen RCM-Motive werden durch den Spleißvorgang im ORF1/1-Proteins entfernt.

Das ORF1/2-Protein umfasst 141 As und trägt den argininreichen N-Terminus, welcher schon für das ORF1/1-Protein beschrieben wurde, unterscheidet sich aber durch eine Leserasterverschiebung am C-Terminus in der entsprechenden Aminosäuresequenz. Diese ist durch einen arginin-/lysinreichen Anteil (78 - 92 As), welcher von zwei Serin-Gruppen (65 - 74 As und 97 - 119 As) eingeschlossen wird, gekennzeichnet.

Das ORF2-Protein umfasst 120 As und trägt das Motiv $WX_7HX_3CXCX_5H$ (16 - 36 As), welches für das VP2-Protein des CAV beschrieben worden ist (55, 151).

Das ORF2/2-Protein besteht aus 284 As und ist am N-Terminus mit der Aminosäuresequenz des ORF2-Proteins und mit den letzten 100 As des C-Terminus mit dem ORF1/2-Protein identisch. Somit trägt auch dieses Protein am N-Terminus das Motiv $WX_7HX_3CXCX_5H$ (16 - 36 As) und am C-Terminus den arginin-/lysinreichen Bereich (212 - 237 As), welcher zwischen zwei serinreichen Regionen (208 - 217 und 240 - 262) liegt.

Das ORF3-Protein setzt sich aus 277 As zusammen und besitzt mit den ersten 120 As den gleichen N-Terminus wie das ORF2/2-Protein. Die folgenden 156 As werden nach Spleißen im dritten Leserahmen kodiert und weisen einen prolinreichen Bereich auf (176 - 265 As).

Das ORF4-Protein stellt eine gespleißte Variante des ORF3-Proteins dar und umfasst 173 As, wobei nur die ersten 16 As dem N-Terminus und die restlichen 157 As dem C-Terminus des ORF3-Proteins entsprechen.

Die Aminosäuresequenzen der einzelnen viralen Proteine sind in Anhang A.3 angegeben. Die arginin- und lysinreiche Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben; die prolin-, serin- und glutaminreichen Sequenzen sind unterstrichen, konservierte Motive sind grau unterlegt. Die Sequenzinformationen sind der Internetseite http://myhits.isb_sib.ch/cgi-bin/motif-scan, die spezifischen Motive der Literatur entnommen.

4.3.6 Klonierung der viralen Leserahmen in den Vektor pcDNA3.1(+)

Die viralen Proteine sollten hinsichtlich ihrer Größe, ihrer Lokalisation in der Zelle und ihrer homologen und heterologen Interaktion untersucht werden. Für diese Experimente wurden die offenen Leserahmen (*orf*) in den Vektor pcDNA3.1(+) zwischenkloniert, wodurch ihre Transkription unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stand. Für die Amplifizierung von *orf1* und *orf2* wurde pGEM/TTVKus als Matrize eingesetzt (s. 3.1.1.1). Nach der Amplifikation erfolgte die Aufreinigung der Amplifikate aus dem Agarosegel und die Klonierung in pcDNA3.1(+) (s. 3.3.1). Um die gespleißten Leserahmen *orf1/1*, *orf1/2*, *orf2/2*, *orf3* und *orf4* zu erhalten wurden humane Leberzellen (Huh7) mit dem Gesamtgenom von P/1C1 transfiziert und die Gesamt-RNA nach 48 h isoliert (s. 3.6.1.2; 3.8.5). Nach dem Umschreiben der RNA in cDNA wurden die unterschiedlichen Leserahmen mit Super Taq Polymerase amplifiziert (s. 3.1.3). Nach Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente in pcDNA3.1(+) kloniert (s. 3.3.1, 3.2.1, 3.5.2). Die Primer, deren Annealingtemperatur und die Restriktionsschnittstellen sind in Anhang A.1 und A.2 aufgeführt.

4.4 Subzelluläre Lokalisation von TTV-Proteinen

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der viralen Proteine wurden die *orfs* nach Amplifikation aus den pcDNA-Plasmiden in den Expressionsvektor pCMV-HA subkloniert (s. Anhang A.2), von welchem die viralen Proteine N-terminal HA-fusioniert exprimiert werden konnten. Der Hämagglutinin-Epitop-Tag (HA-Tag) besteht aus neun Aminosäuren (5'-YPYDVPDYA-3'), welche ein Molekulargewicht von 1102.15 Dalton (Da) aufweisen. Die Anwesenheit dieses Epitops erlaubte die Detektion der TTV-Fusionsproteine mittels indirekter Immunfluoreszenz.

4.4.1 Klonierung der ungespleißten ORF1-Isoform ORF1*

Die Ergebnisse der RACE-Analyse geben Hinweise auf die Expression des ORF1-Proteins und der gespleißten Form ORF1/1. Zur Analyse sollte ein ORF1-Konstrukt generiert werden, welches an der SD3 mutagenisiert ist, sodass ausschließlich die ungespleißte Isoform exprimiert wird. Bei der Mutagenese der Nukleotidsequenz wurde durch den Austausch von G zu A an Position 124 bp im Triplet *GTA* die hydrophobe (unpolare) Aminosäure Valin durch Isoleucin aus der gleichen chemischen Gruppe substituiert (Abb. 4-9).

Die Mutation wurde unter Verwendung der mutierten Primer 1088 und 729 in SD3 eingefügt (s. 3.2.1.1). Als Ausgangskonstrukt für die Amplifikation diente pcDNA-ORF1. Mit den Mutageneseprimern wurde ein 2103 bp DNA-Fragment amplifiziert, das nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym *Aar* I (Fermentas) in vier Nukleotiden mit dem Amplifikat der Primer 730 und 1089 überlappt. Nach Aufreinigung und sequentiellm Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Xho* I wurden die rekombinanten Fragmente in den zuvor restringierten Vektor pcDNA3.1(+) ligiert und anschließend transformiert (s. 3.2.5, 3.5.2). Ausgehend vom konstruierten pcDNA-ORF1* erfolgte die Klonierung des pCMVHA-ORF1* (s. A.2), der in den Experimenten zur subzellulären Lokalisation unmittelbare Anwendung fand.

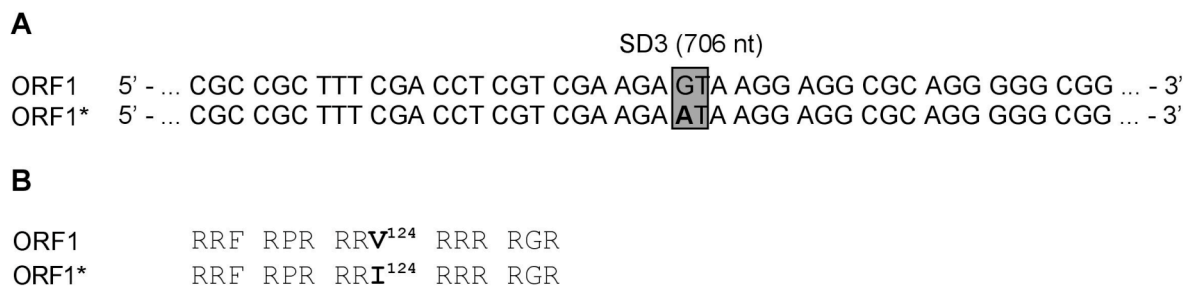
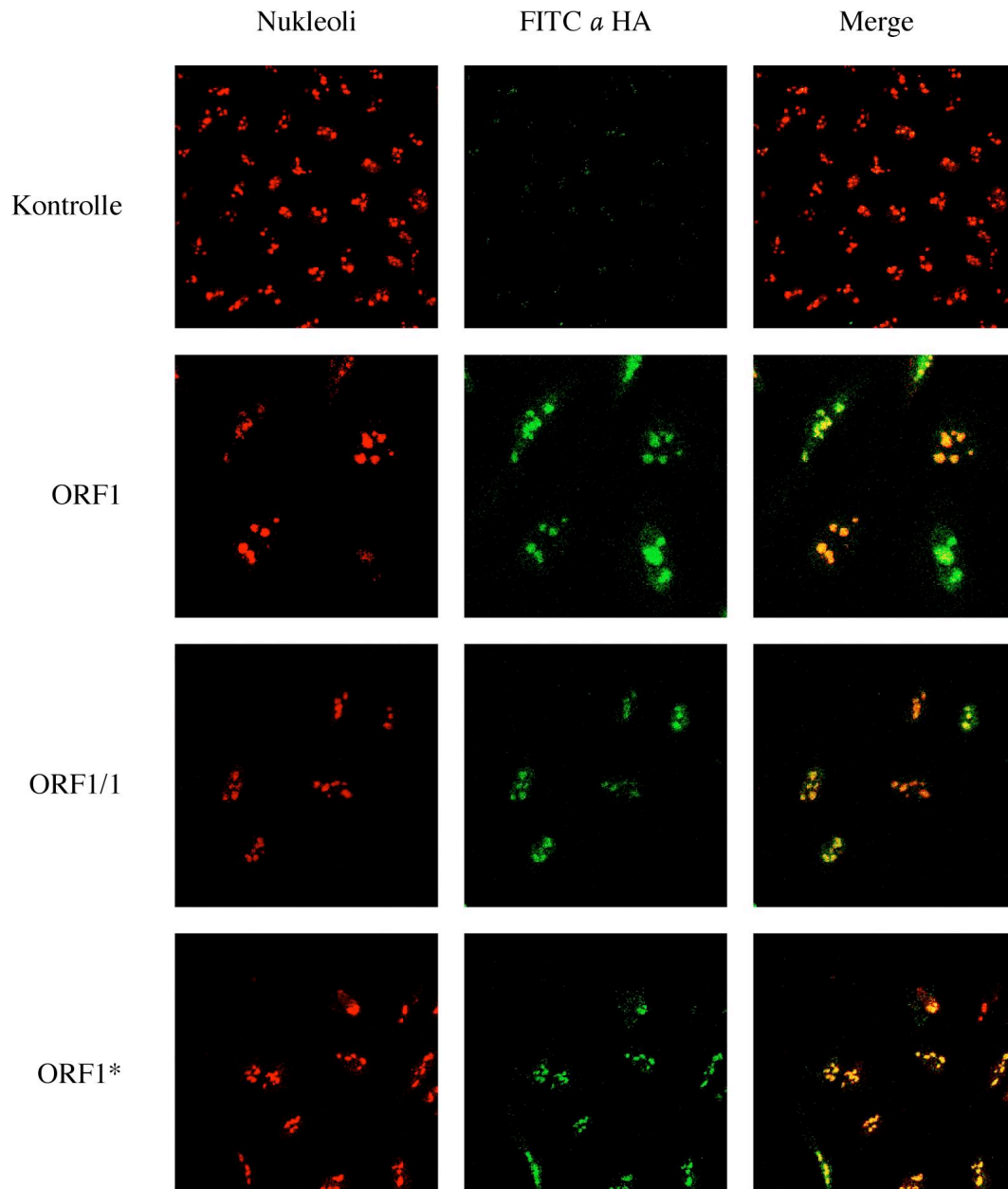


Abbildung 4-9: (A) Nukleotidsequenz des mutagenisierten ORF1*-Bereichs; (B) Aminosäuresequenz von ORF1 und ORF1*

4.4.2 Detektion der viralen Proteine in Huh7-Zellen

Die Detektion der exprimierten viralen Proteine erfolgte mittels indirekter Immunofluoreszenz in Huh7-Zellen. Dabei wurden die Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert und nach 48 h fixiert. Die viralen Proteine wurden mit einem

FITC-gekoppelten anti-HA Antikörper (grün) markiert und die Lokalisation mittels konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht. Um eine Lokalisation in den Nukleoli nachzuweisen, wurde ein primärer anti-human Nukleoli Antikörper mit einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) aus der Maus eingesetzt. Eine eventuelle Kolo­kalisation tritt in der Überlagerung der roten und grünen Signale als gelbe Färbung auf (Abb. 4-10).



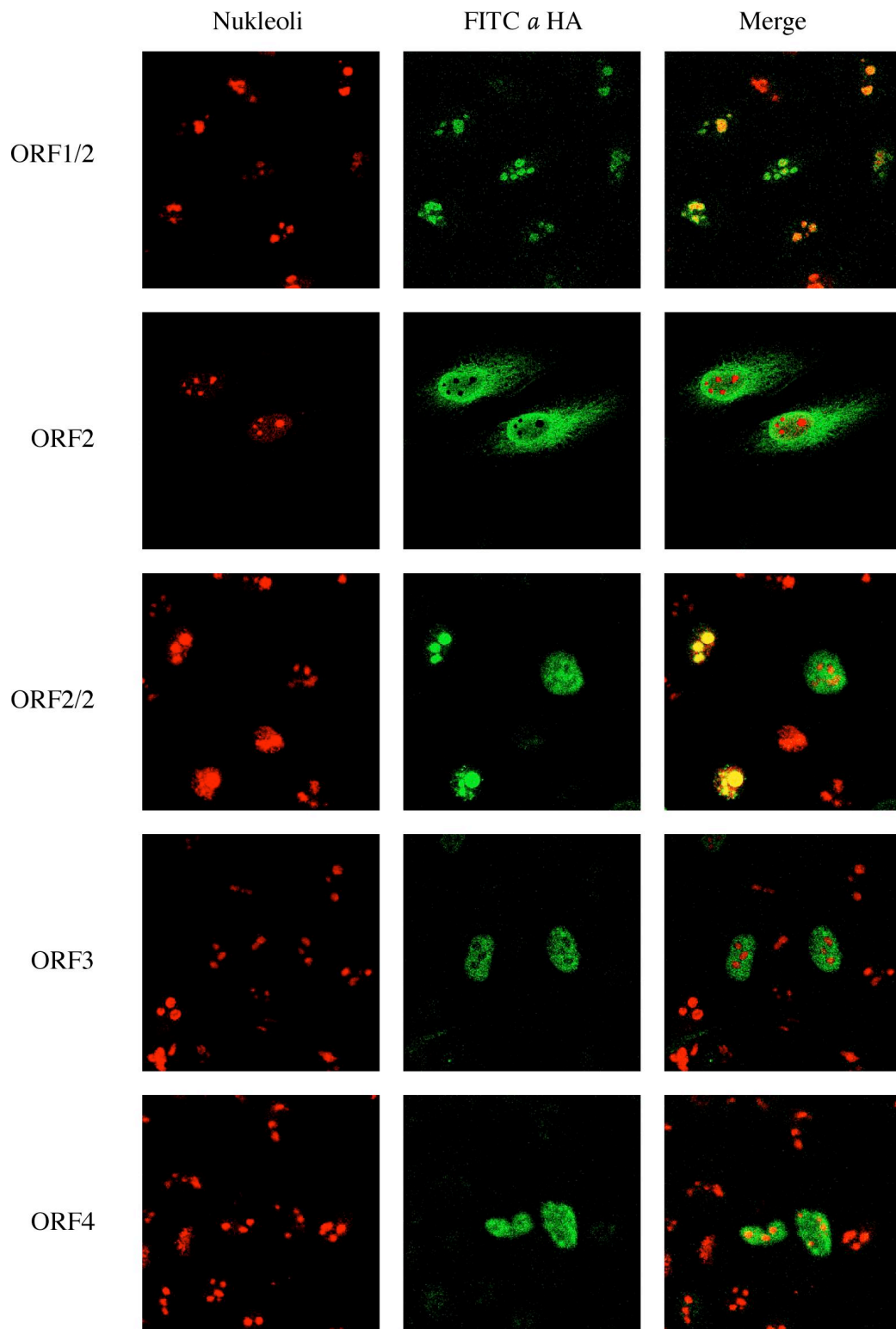


Abbildung 4-10: Subzelluläre Lokalisation der TTV-Proteine in Huh7-Zellen nach 48 h. Die Visualisierung erfolgte in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-gekoppelten anti-HA Antikörper aus Maus bzw. einem primären anti-human Nukleoli Antikörper und einem anti-Maus IgG Rhodamin-Konjugat im konfokalen Laserskanmikroskop (63fache Vergrößerung). In der ersten Spalte sind die Nukleoli durch Rhodamin (rot) angefärbt und in der zweiten Spalte die durch FITC (grün) markierten viralen Proteine sichtbar. In der dritten Spalte wird durch Überlagerung der beiden Signale die Lokalisation bestimmter TTV-Proteine in den Nukleoli der Zelle sichtbar.

In Abbildung 4-10 ist die Lokalisation der HA-fusionierten Proteine in Huh7-Zellen dargestellt. Mit Ausnahme des HA-ORF2, das im Cytoplasma beobachtet wurde, waren alle TTV-Proteine im Zellkern präsent. Unter Verwendung des Nukleoli-Markers war eine genauere Bestimmung der Lokalisation möglich. Die Proteine HA-ORF1, HA-ORF1/1, HA-ORF1* sowie HA-ORF1/2 wurden in die Nukleoli der Huh7-Zellen transportiert. Diesen vier Proteinen sind die ersten 41 Aminosäuren des N-Terminus gemein, der durch einen hohen Anteil an Argininresten gekennzeichnet ist. Die Proteine HA-ORF3 und HA-ORF4 sind im Nukleoplasma in einer granulären Struktur nachweisbar. Das HA-ORF2/2-Protein war in verschiedenen Arealen des Nukleus zu detektieren (Abb. 4-10 und 4-11). In Abbildung 4-10 liegt das Protein sowohl in den Nukleoli als auch im Nukleoplasma vor. Eine dreifache Vergrößerung der Abbildung 4-10 zeigt die Lokalisation von HA-ORF2/2 in punktförmigen Strukturen, welche nicht den Nukleoli entsprechen (Abb. 4-11).

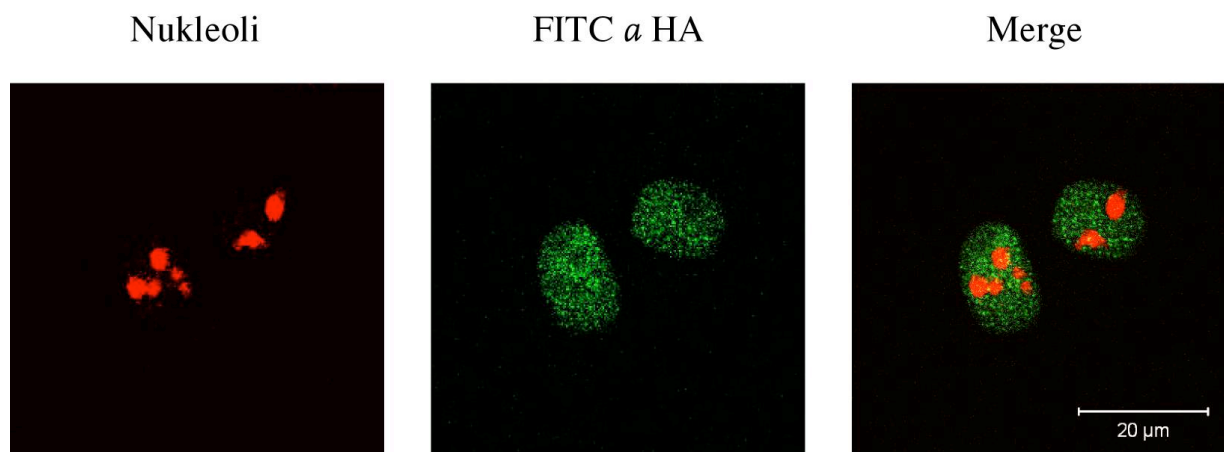


Abbildung 4-11: Lokalisierung des HA-ORF2/2-Proteins in punktförmigen Strukturen in Huh7-Zellen. Dreifache Vergrößerung der Abbildung 4-10.

4.4.3 Nachweis der ORF1-Expression mittels Antiserum AK47

Die Expression des ORF1-Proteins ausgehend vom viralen Genom im Western Blot wurde bislang von anderen Arbeitsgruppen nicht nachgewiesen (157). Um dies zu erreichen, erfolgte die Transfektion von Huh7-Zellen mit dem P/1C1-Genom und nach 48 h die Analyse der Zellextrakte im Western Blot. Für die Detektion der ORF1-Isoformen wurde das Antiserum AK47 verwendet, welches gegen den C-Terminus (402 - 733 Aminosäuren) des ORF1-Proteins gerichtet ist und durch Immunisierung von Kaninchen generiert wurde (Dissertation A. März).

4.4.3.1 Detektion der ORF1-Isoformen mittels Antiserum AK47 im Western Blot

Die Huh7-Zellen wurden mittels „Effectene“ mit dem Gesamtgenom von P/1C1 bzw. den Expressionsplasmiden pCMVHA-ORF1, pCMVHA-ORF1* und pCMVHA-ORF1/1 transfiziert (s. 3.6.1.2). Die exprimierten Fusionsproteine HA-ORF1, HA-ORF1/* und HA-ORF1/1 wurden zum Größenvergleich eingesetzt. Nach 48 h erfolgte der Aufschluss der Zellen (s. 3.8.6), die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel und der Transfer auf eine PVDF-Membran (s. 3.5.2.1; 3.8.5). Die Proteine wurden mit AK47 und nachfolgend mit einem anti-Kaninchen Sekundärantikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, angefärbt (Abb. 4-12).

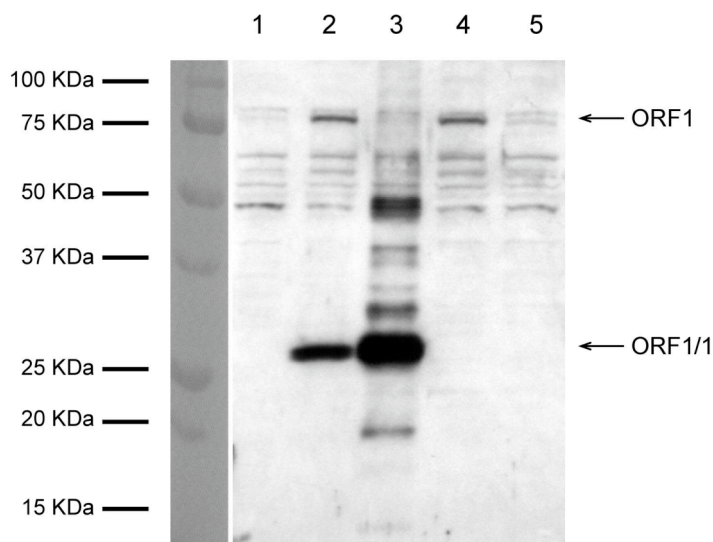


Abbildung 4-12: Expression der ORF1-Isoformen in Huh7-Zellen.
 Spur 1: pCMV-HA; Spur 2: HA-ORF1 Protein; Spur 3: HA-ORF1/1 Protein; Spur 4: HA-ORF1*; Spur 5: P/1C1.

In Abbildung 4-12 ist die Expression der ORF1-Isoformen dargestellt. Spur 1 zeigt als Kontrollansatz mit dem Leervektor transfizierte Zellen. In der zweiten Spur wurde der Zellextrakt der mit pCMVHA-ORF1 transfizierten Zellen aufgetragen. Zwei Banden sind zusätzlich zu den in der Kontrolle sichtbaren unspezifischen Signalen zu erkennen. Mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 80 kDa entspricht das größere Signal dem ORF1-Protein, während das kleinere Signal, mit ca. 27 kDa, dem ORF1/1-Protein, d.h. der gespleißten Isoform des ORF1-Proteins entspricht. Spur 3 zeigt nach Expression des ORF1/1-Proteins nur das kleine Protein, während in Spur 4 die Expression der ungespleißten ORF1-Protein Variante ORF1* ausgehend von pCMVHA-ORF1* nachweisbar ist. Es kann festgehalten werden, dass in Zellkultur ausgehend vom subklonierten *orf1*-Gen von P/1C1 sowohl die ungespleißte als auch die gespleißte Form des ORF1-Proteins exprimiert wird. Im

Vergleich dazu wurde in Spur 5 der Zellextrakt von P/1C1 transfizierten Huh7-Zellen aufgetragen, wobei aber weder die Expression des ORF1-Proteins noch die des ORF1/1-Proteins beobachtet werden konnte.

4.4.3.2 Detektion der ORF1-Isoformen mittels Antiserum AK47 in Zellkultur

In Kapitel 4.4.3.1 wurde gezeigt, dass ausgehend vom klonierten *orf1*-Gen sowohl das Volllängenprotein ORF1, als auch das gespleißte ORF1/1-Protein exprimiert wurde, während die Transfektion von Huh7-Zellen mit dem gesamten Virusgenom von P/1C1 im Western Blot nicht zum Expressionsnachweis der ORF1-Isoformen führte. Dies könnte sowohl auf eine zu schwache Expression des ORF1-Proteins in der Zellkultur durch den viruseigenen Promotor als auch auf die Verdünnung der Proteinmenge durch nicht-transfizierte Zellen zurückzuführen sein. Alternativ wurde die Expression der Proteine ausgehend vom Genom durch indirekte Immunofluoreszenz untersucht. Vergleichend zur P/1C1-vermittelten ORF1-Expression in Zellkultur sollten die N-terminal HA-fusionierten ORF1-Varianten ausgehend von pCMVHA-ORF1, pCMVHA-ORF1* und pCMVHA-ORF1/1 untersucht und deren Lokalisation in den Nukleoli bestätigt werden.

Mit DNA der entsprechenden ORF1-Konstrukte wurden Huh7-Zellen transfiziert und nach 48 h die Lokalisation der Isoformen untersucht (Abb. 4-13).

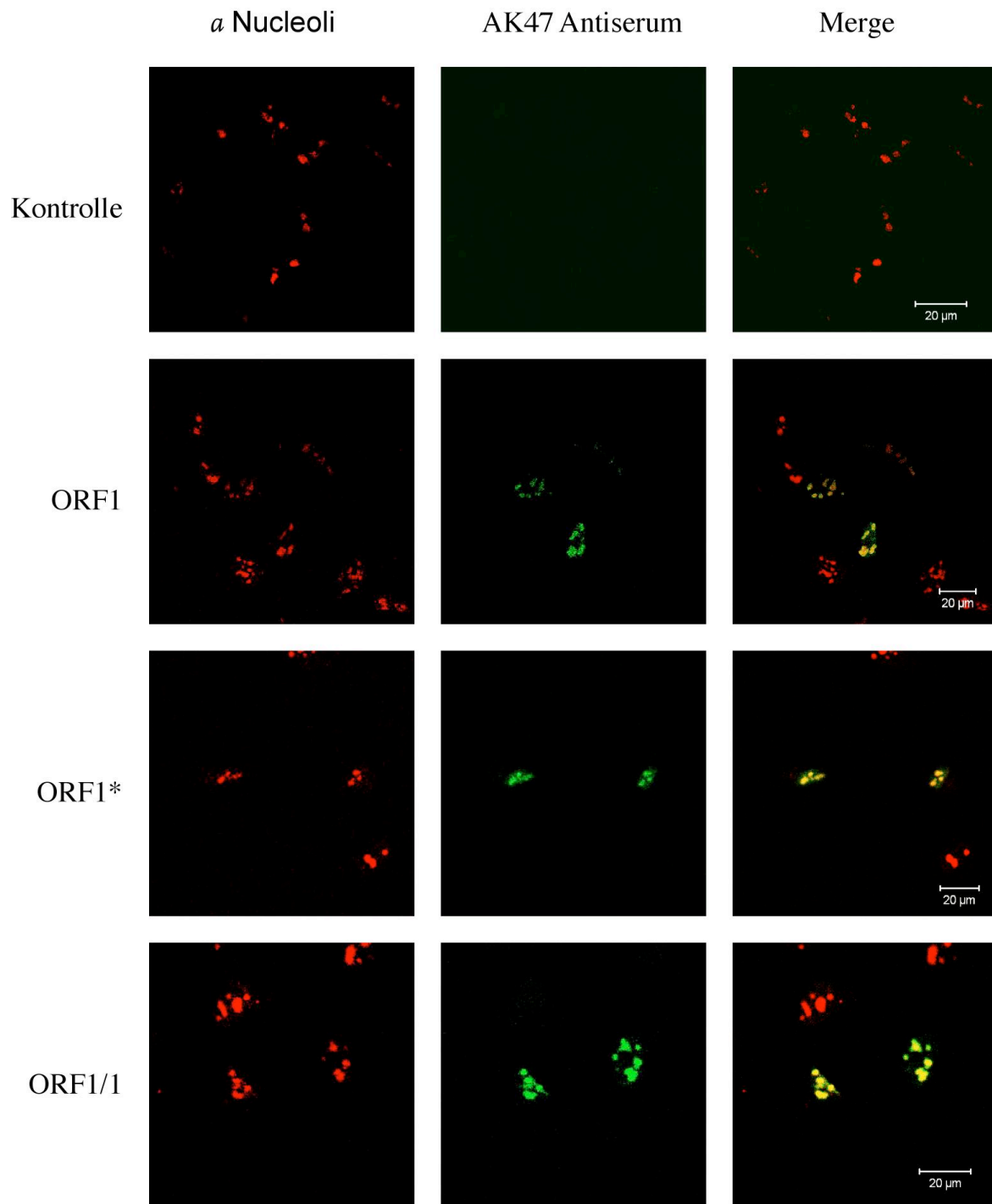


Abbildung 4-13: Lokalisation der ORF1-Isoformen in den Nucleoli von Huh7-Zellen nach 48 h. Die ORF1-Derivate wurden unter Anwendung des primären Antiserum AK47 und des sekundären Antikörper anti-Kaninchen IgG FITC-Konjugat angefärbt. Die Markierung der Nucleoli erfolgte mit dem primären anti-humanen Nucleoli Antikörper und Visualisierung mit dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG Rhodamin-Konjugat. Die Expression und Lokalisation der ORF1-Derivate wurde anschließend durch konfokale Laserscanmikroskopie analysiert.

In Abbildung 4-13 ist die Expression von HA-ORF1, HA-ORF1/1 und HA-ORF1* in Huh7-Zellen dargestellt. Im Gegensatz zu dem unter 4.4.2 geschilderten Experiment erfolgte die immunologische Detektion der Proteine über das Antiserum AK47, das gegen den C-Terminus der ORF1-Varianten gerichtet ist. Übereinstimmend mit der Detektion der N-terminalen Epitop-gekoppelten ORF1-Isoformen, welche in Abbildung 4-10 dargestellt ist, wurde die Lokalisation aller ORF1-Varianten exklusiv in den Nukleoli der Zellen bestätigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Volllängenprodukt ORF1, die modifizierte Variante ORF1* und die verkürzte Variante ORF1/1, nicht nur im Western Blot, sondern auch in der Immunfluoreszenz vom Antiserum AK47 erkannt wurden.

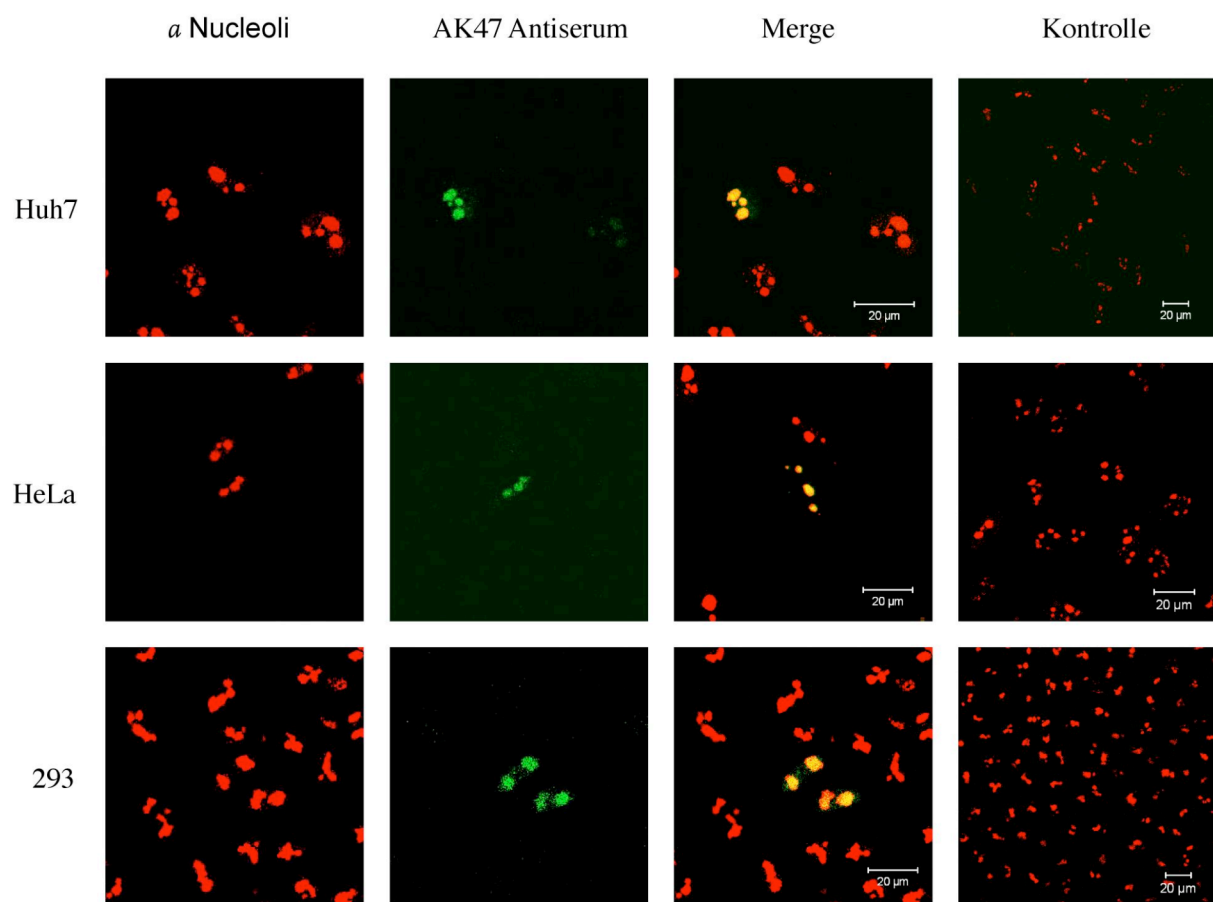


Abbildung 4-14: Expression der ORF1-Isoformen ausgehend vom Gesamtgenom P/IC1 in Zellkultur. Humane Leberzellen (Huh7), Zervixkarzinomzellen (HeLa) und Nierenzellen (HEK 293) wurden mit dem religierten Gesamtgenom von P/IC1 transfiziert und 48 h nach der Transfektion fixiert. Die ORF1-Derivate wurden mit AK47 und anti-Kaninchen IgG FITC-Konjugat angefärbt und anschließend in der konfokalen Laserscanmikroskopie analysiert (grün). Die Visualisierung der Nukleoli erfolgte mittels anti-human Nukleoli (rot). Spalte 1: Nukleoli; Spalte 2: ORF1-Derivat; Spalte 3: Überlagerung der beiden Signale; Spalte 4: mock-transfizierte Kontrollansätze mit visualisierten Nukleoli

Da die Expression der ORF1-Isoformen ausgehend vom Gesamtgenom P/1C1 im Western Blot nicht beobachtet, sollte eine eventuelle Expression in Zellkultur ebenfalls mittels Immunfluoreszenz untersucht werden. Die Transfektion erfolgte mit dem religierten Gesamtgenom des P/1C1 in Huh7-, HeLa- und HEK 293-Zellen und die Visualisierung nach 48 h.

In Abbildung 4-14 ist die Expression von ORF1-Varianten ausgehend von P/1C1 in verschiedenen Zelllinien dargestellt. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zum Western Blot in der Immunfluoreszenz die Expression von ORF1 in allen drei Zelllinien nachzuweisen war. Die Verteilung war für die drei Zelllinien identisch.

4.4.4 Kartierung der Kernlokalisationssequenzen (NLS) des ORF1-Proteins der TTV-Isolate P/1C1 und J01B6

Im Gegensatz zu den vorgelegten Resultaten zur Lokalisation des ORF1-Proteins von P/1C1 in den Nukleoli wurde in der von Qiu et al. veröffentlichten Studie das ORF1-Protein des Isolats HEL32 ausschließlich im Cytoplasma beobachtet (157). Dies ist das bisher einzige Experiment zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation des ORF1-Proteins. Die Isolate P/1C1 und HEL32 sind beide der Genogruppe 1 zugehörig.

Im Folgenden sollten mögliche NLS in der Aminosäuresequenz des ORF1-Proteins kartiert werden. In diese Analyse wurde J01B6 als weiteres TTV-Isolat einbezogen. J01B6 wird der Genogruppe 5 zugeordnet und weist eine Homologie von 40 % zur As-Sequenz des ORF1-Protein des P/1C1 auf (Abb. 4-15). Die Aminosäuresequenzen sind im Anhang A.3 aufgeführt.

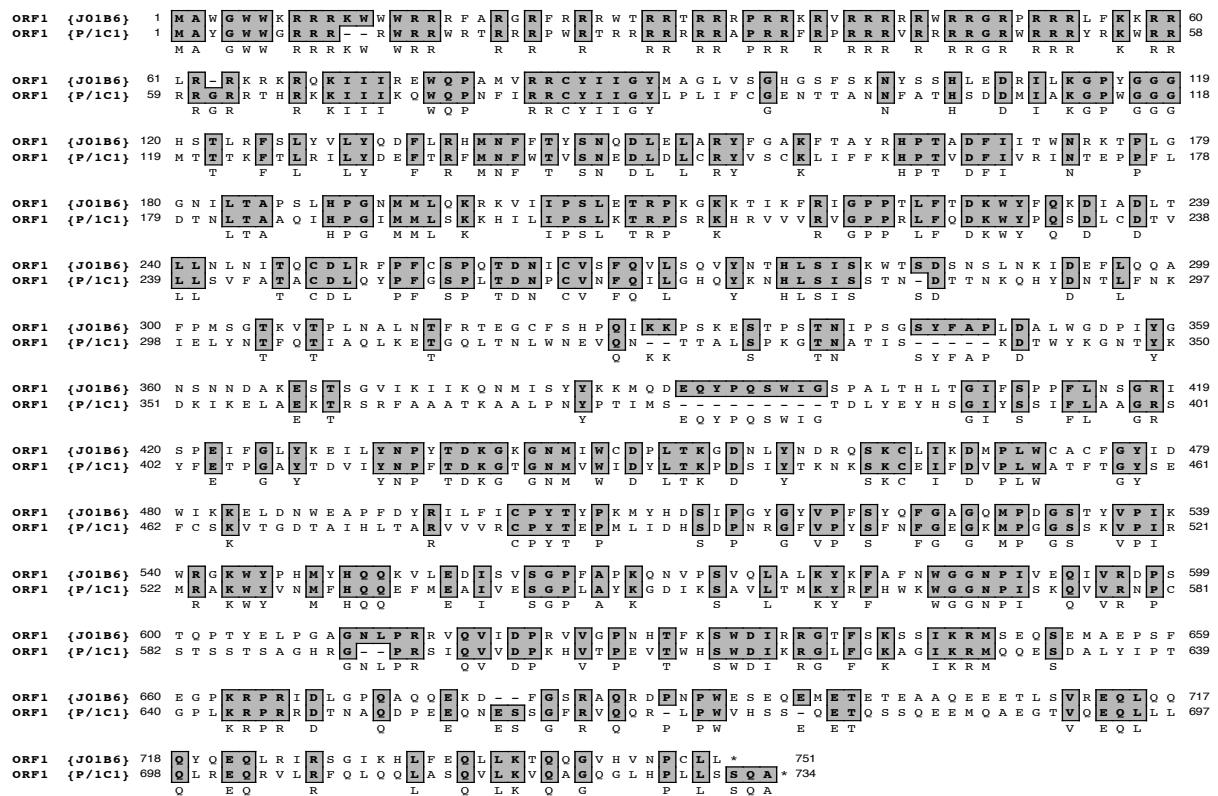


Abbildung 4-15: Sequenzvergleich des ORF1-Proteins der TTV-Isolate P/1C1 und J01B6. Mittels der Computersoftware MacVector wurde ein Abgleich der Aminosäuresequenzen durchgeführt. Homologe Bereiche sind durch grau unterlegte Felder gekennzeichnet.

4.4.4.1 Kartierung der NLS des ORF1-Proteins (Isolat P/1C1)

Die Akkumulation des ORF1-Proteins von P/1C1 in den Nucleoli wurde sowohl über die Detektion des N-terminal fusionierten HA-Epitops (Abb. 4-10) als auch durch das den C-Terminus erkennende Antiserum AK47 nachgewiesen (Abb. 4-13). Proteine bis zu einer Größe von ca. 50 kDa oder 9 nm können den Kernporenkomplex energieunabhängig durch freie Diffusion passieren (30). Für die Mehrzahl der im Kern lokalisierten Proteine ist jedoch ein sequenzvermittelter, aktiver Transport in den Zellkern beschrieben. Die Vielzahl der Signalsequenzen lässt sich nicht auf eine definierte Konsensussequenz reduzieren, doch sind diese Sequenzen durch eine oder mehrere Gruppen basischer Aminosäuren wie Arginin (R) oder Lysin (K) gekennzeichnet. Klassische Kernlokalisationssequenzen (nuclear localization sequences, NLS) können einteilig (monopartit) oder zweiteilig (bipartit) auftreten (76, 162). Verfügen Proteine nicht über eine eigene NLS, können sie in Wechselwirkung mit anderen

Proteinen in den Zellkern translozieren. Die Nukleoli-Lokalisationssequenzen (NuLS) sind für die Akkumulation in den Kernkörperchen verantwortlich und ebenso wie die NLS durch basische Aminosäuren gekennzeichnet. Genauere Sequenzanforderungen sind bisher nicht näher charakterisiert. Die für das ORF1-Protein *in vitro* ermittelte Größe von ca. 80 kDa lässt einen aktiven Transport in den Zellkern vermuten. Im Folgenden sollten mögliche NLS und NuLS des ORF1-Proteins kartiert werden.

Zur Kartierung der NLS und NuLS wurden überlappende Fragmente des ORF1-Proteins N-terminal an das *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP) fusioniert. EGFP ist eine kodonoptimierte Variante und weist gegenüber dem Wildtyp GFP eine 5-10fach stärkere Expression auf. Die Klonierung erfolgte über Generierung eines PCR-Fragments von *orf1*, wobei als Matrize das Plasmid pcDNA-ORF1 eingesetzt wurde. Die verwendeten Primer und die Annealingtemperatur sind in Anhang A.2 aufgeführt. Nach Amplifikation der gewünschten Fragmente und sequenzieller Restriktion wurden die Fragmente in den Expressionvektor pEGFP-2C kloniert. Durch die Klonierung des *orf1*-Gens in den pEGFP-2C wurde der N-Terminus des ORF1-Proteins mit dem EGFP fusioniert. Die erhaltenen Konstrukte sind in Abbildung 4-16 schematisch dargestellt.

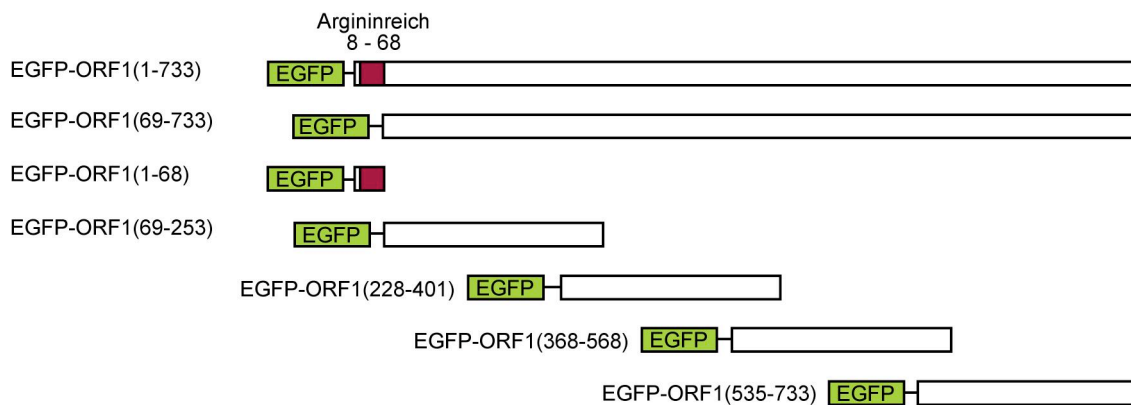


Abbildung 4-16: Schematische Darstellung der EGFP-fusionierten ORF1-Fragmente (P/IC1). Der argininreiche Bereich (8 - 68 As) ist rot hervorgehoben. Das N-terminal an die ORF1-Fragmente fusionierte *enhanced-green-fluorescence-protein* (EGFP) ist als grüne Box dargestellt, die weißen Balken bezeichnen die eingesetzten ORF1-Fragmente.

Die Plasmid-DNA der entsprechenden verkürzten ORF1-Fragmente wurde mittels „Effectene“ in Huh7-Zellen transfiziert (s. 3.6.1.2) und deren Lokalisation nach 48 h durch konfokale Laserscanmikroskopie untersucht.

Die Verteilung der ORF1-Fragmente in den Zellen ist in Abbildung 4-17 gezeigt. Die Expression des gesamten ORF1, fusioniert mit EGFP, resultiert in einer Anreicherung des Fluoreszenzsignals in den Nukleoli und bestätigt damit das Ergebnis der Lokalisationsanalyse von ORF1 mit dem Antiserum AK47 und des N-terminal fusionierten HA-ORF1 (s. 4.4.2; 4.4.3.2). Das Konstrukt pEGFP-ORF1(1-68), welches ausschließlich den basischen N-Terminus umfasst, war nach Transfektion in den Nukleoli angereichert, zeigte aber zusätzlich eine Verteilung des Fluoreszenzsignals in der gesamten Zelle. Die Akkumulation von EGFP-ORF1(1-68) in den Nukleoli deutet auf das Vorhandensein einer NuLS innerhalb dieser Sequenz hin. Nach Transfektion der Konstrukte pEGFP-ORF1(69-253), EGFP-ORF1(228-401) und pEGFP-ORF1(368-569) war das Fluoreszenzsignal sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma zu beobachten. Das Verteilungsmuster entspricht dem des von Plasmid pEGFP-2C exprimierten EGFP und lässt somit auf das Fehlen einer NLS schließen. Das Konstrukt EGFP-ORF1(535-733) zeigt eine Verteilung im Zellkern unter spezifischer Aussparung der Nukleoli. Dieses ORF1-Fragment trägt vermutlich eine weitere NLS, aber keine NuLS.

Für das ORF1-Protein kann somit das Vorhandensein von mindestens zwei Kerntransportvermittelnden Sequenzmotiven nachgewiesen werden. Eine erste NLS liegt im Aminosäuresequenzbereich 1 - 68, eine weitere NLS ist im Bereich 535 - 733 As zu

vermuten. Für die Lokalisation des ORF1-Proteins in den Nukleoli ist der N-Terminus des Proteins ausreichend. Die Expression von EGFP-ORF1(69-733) gelang nicht, möglicherweise sind RNA oder Protein instabil.

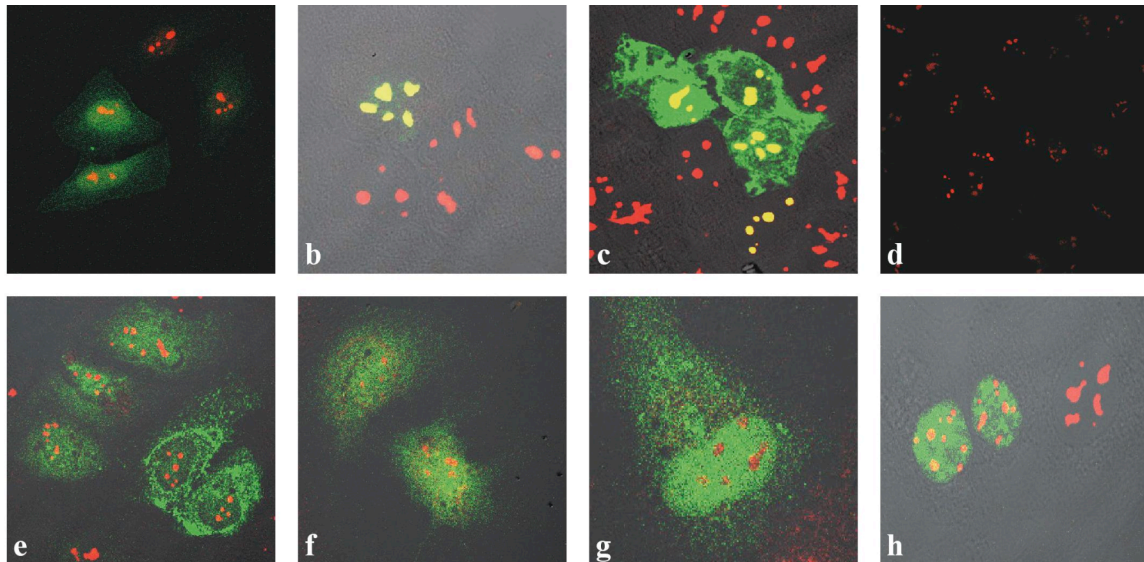


Abbildung 4-17: Kartierung nukleärer Lokalisierungssequenzen (NLS) des ORF1-Proteins. Huh7-Zellen wurden mit den entsprechenden ORF1-Plasmiden transfiziert und nach 48 h fixiert. Die Visualisierung erfolgte in der direkten Immunofluoreszenz durch Anregung des EGFP. (a) pEGFP-2C, (b) EGFP-ORF1, (c) EGFP-ORF1(1-68), (d) EGFP-ORF1(69-733), (e) EGFP-ORF1(69-253), (f) EGFP-ORF1(228-401), (g) EGFP-ORF1(368-569), (h) EGFP-ORF1(535-733). Die Markierung der Nukleoli erfolgte mit dem anti-human Nukleoli Antikörper und dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG Rhodamin-Konjugat.

Betrachtet man die Aminosäuresequenz des ORF1-Proteins hinsichtlich möglicher NLS- und NuLS-Sequenzmotive, so weist der N-Terminus (1 - 68) mit 40 Argininresten die erforderlichen basischen As-Folgen auf. Der C-Terminus trägt ebenfalls basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin, welche entsprechend der Definition von bipartiten NLS die Translokation in den Kern vermitteln könnten. Eine solche Sequenz könnte beispielsweise die Aminosäurefolge $K^{616}RX_4KX_3KR^{627}$ sein.

4.4.4.2 Kartierung der NLS des ORF1-Proteins (Isolat J01B6)

Um einen Einfluss der Aminosäure-Divergenz phylogenetisch abweichender TTV-Isolate zu untersuchen, sollte auch für das Isolat J01B6 die Lokalisation des ORF1-Proteins bestimmt und die verantwortlichen Sequenzen kartiert werden. Für die Kartierung möglicher NLS wurde der oben beschriebene Versuchsablauf gewählt. Die verwendeten Fragmente sind in

Abbildung 4-18 dargestellt. Es wurden der N-Terminus (1-68) und der C-Terminus (69-750) als EGFP-Fusion exprimiert, sowie die überlappenden Fragmente ORF1(69-295), ORF1(231-430), ORF1(398-597) und ORF1(545-750). Die Lokalisation wurde in Huh7-Zellen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie bestimmt. Die verwendeten Primer, die Annealingtemperatur und die verwendete Matrize für die Erzeugung der Konstrukte sind im Anhang A.2 dargestellt.

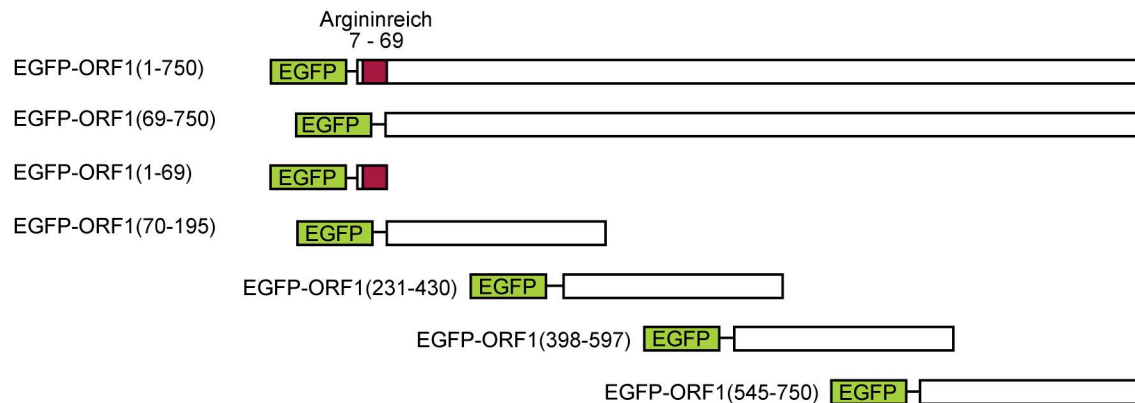


Abbildung 4-18: Schematische Darstellung der EGFP-fusionierten ORF1-Fragmente von J01B6. Der argininreiche Bereich (7-69) ist rot hervorgehoben. Der N-terminal an die ORF1-Bereiche fusionierte EGFP-Anteil ist als grüne Box dargestellt, das ORF1-Fragment als weißer Balken.

In der Abbildung 4-19 ist die zelluläre Lokalisation des ORF1-Protein von J01B6 sowie die Kartierung potentieller NLS in Huh7-Zellen dargestellt. Die EGFP-ORF1-Fusion und das N-terminale Fragment EGFP-ORF1(1-69) waren nach Färbung mit einem anti-human Nukleoli Antikörper und mit dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG Rhodamin-Konjugat ebenfalls in den Nukleoli der Zellen zu beobachten (Abb. 4-19). Der C-Terminus (69-750) konnte nicht in den Zellen exprimiert werden (Abb. 4-19), was auf eine Instabilität dieses Proteins hinweisen könnte. Im Ergebnis weicht das Lokalisationsmuster nicht von dem für P/IC1 bestimmten ab. Die EGFP-fusionierten J01B6-Fragmente ORF1(69-295), ORF1(231-430) und ORF1(398-597) sind diffus über die gesamte Zelle verteilt. Das EGFP-ORF(545-750) Fragment war ausschließlich im Nukleus unter Aussparung der Nukleoli zu sehen.

Es zeigte sich, dass auch für das ORF1-Protein des J01B6 ebenfalls zwei Bereiche die Lokalisation im Zellkern vermitteln: Der durch 36 Arginin- und 8 Lysinreste basische N-Terminus trägt offensichtlich zumindest eine NuLS, während der C-Terminus von J01B6 ähnlich dem ORF1-Protein des P/IC1 eine Vielzahl von basischen Sequenzen trägt, wobei die

Folge $R^{636}RX_4KX_4KR^{647}$ Ähnlichkeit zum Sequenzmotiv $K^{616}RX_4KX_3KR^{627}$ des ORF1-Proteins des P/IC1 aufweist und einer bipartiten NLS entspricht.

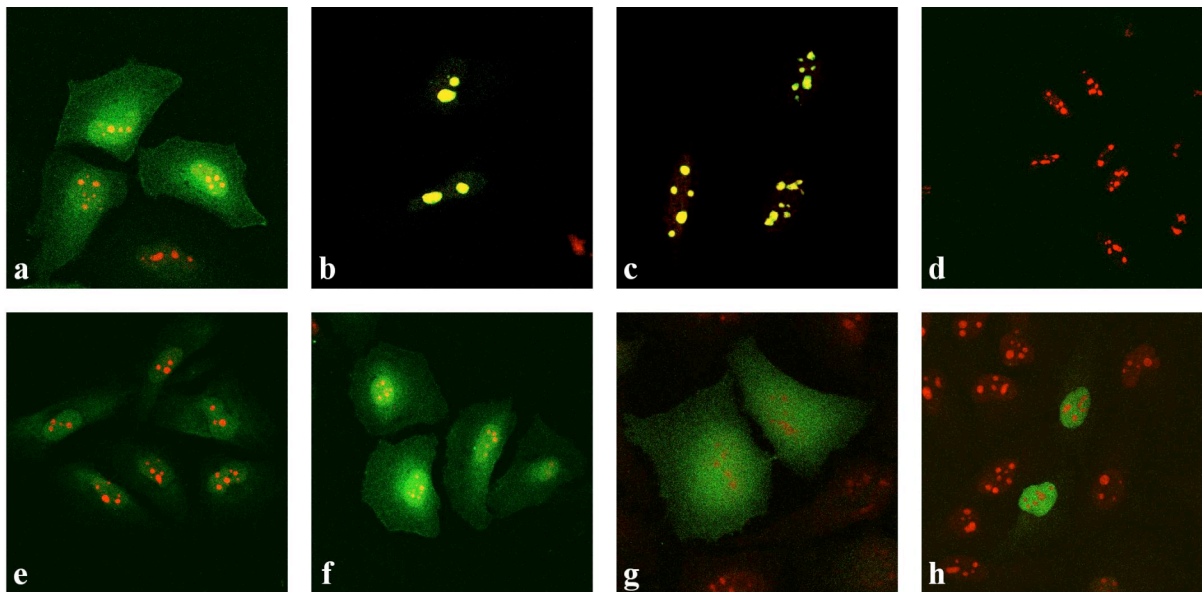


Abbildung 4-19: Kartierung nukleärer Lokalisierungssequenzen (NLS) des ORF1-Proteins (Isolat J01B6) in Huh7-Zellen nach 48 h. Die Visualisierung erfolgte in der direkten Immunofluoreszenz durch Anregung des EGFP. (a) pEGFP-2C, (b) EGFP-ORF1, (c) EGFP-ORF1(1-69), (d) EGFP-ORF1(69-750), (e) EGFP-ORF1(70-195), (f) EGFP-ORF1(231-430), (g) EGFP-ORF1(398-597), (h) EGFP-ORF1(545-750). Die Markierung der Nukleoli erfolgte mit dem anti-human Nukleoli Antikörper und dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG Rhodamin-Konjugat. Die Fluoreszenzanalyse wurde im cLSM durchgeführt.

4.5 In vitro Replikationsstudien

Das ORF1-Protein von TTV weist zwei der vier As-Motive auf, die für Replikation über den Rolling Circle Mechanismus (RCM) charakteristisch sind. Das Motiv I (FTL), dessen Funktion noch nicht näher charakterisiert wurde, ist an Position 124-126 As lokalisiert. Das Motiv III hingegen ist essentiell für die Initiation des Replikationszyklus und tritt zweimal im ORF1-Protein auf: YKDK (349-352 As) und YLTK (430-433 As). Für die Untersuchung einer möglichen Replikationsfunktion des ORF1-Proteins wurde ein Luziferaseassay durchgeführt (s. 3.6.1). Bei diesem Test ist die Initiation der viralen Replikation über die Expression eines Reportergens messbar. Dafür werden zwei Plasmide kotransfiziert, eines trägt neben dem Replikationsursprung des zu untersuchenden Replikons ein konstitutiv exprimiertes Reportergen (Luziferase), dessen Aktivität zur Bestimmung der Replikation herangezogen wird. Replikation kann initiiert werden, wenn die für die Replikation *in trans*

agierende Replikase durch das zweite Plasmid zur Verfügung gestellt wird. Initiierte Replikation ist durch Erhöhung der Kopiezahl des Luc-Plasmides bzw. der Luziferaseaktivität mess- und quantifizierbar (107). Die Standardisierung des Assays erfolgte durch die Transfektion eines dritten Plasmids, das ein β -Galaktosidasegen trägt (pRSV β -Gal). Die Gal-Werte werden zur Normierung gegen Schwankungen in der Transfektionseffizienz benutzt, indem der Quotient aus Luc-Werten und Gal-Werten gebildet wird.

4.5.1 Analyse der essentiellen Replikationskomponenten von TTV

Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen mit den Plasmiden pRSV β -Gal und pGL3-P/1C1 transfiziert. Von pGL3-P/1C1 werden keine viralen Proteine exprimiert, da die Schnittstelle zur Integration des Genoms in den Vektor pGL3-Promotor innerhalb des kodierenden Bereiches liegt. Der Vektor pGL3-P/1C1 trägt zusätzlich zum Replikationsursprung ein Luziferasegen (*luc*) unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Als *in trans* Komponente wurde das religierte Gesamtgenom P/1C1 eingesetzt. Durch diesen Versuchsaufbau ist sichergestellt, dass ausgehend von P/1C1 die für die Replikation notwendigen Faktoren synthetisiert werden und Plasmid pGL3-P/1C1 den Replikationsursprung trägt. Wird ausgehend von P/1C1 die Replikation am Replikationsursprung initiiert steigt die Kopienzahl des pGL3-P/1C1 und somit die Anzahl der exprimierten Luziferasemoleküle. Im Anschluss an die Transfektion wurde die Luziferaseaktivität bestimmt, die nach Standardisierung als Maß für die Replikation gelten kann.

Um das optimale Verhältnis der beiden Plasmide zu ermitteln, wurde der Versuch bei konstanter Kopiezahl von pGL3-P/1C1 mit steigenden Mengen von P/1C1 durchgeführt. Um eine gleich hohe DNA-Menge in allen Ansätzen einzusetzen, wurde pcDNA-MULT1 als Ausgleichsplasmid verwendet. Es exprimiert das MULT1 Protein (*murines UL-16-binding protein-like transcript*), welches keinen Einfluss auf Replikation oder Transkription von TTV besitzt.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 4-20 dargestellt.

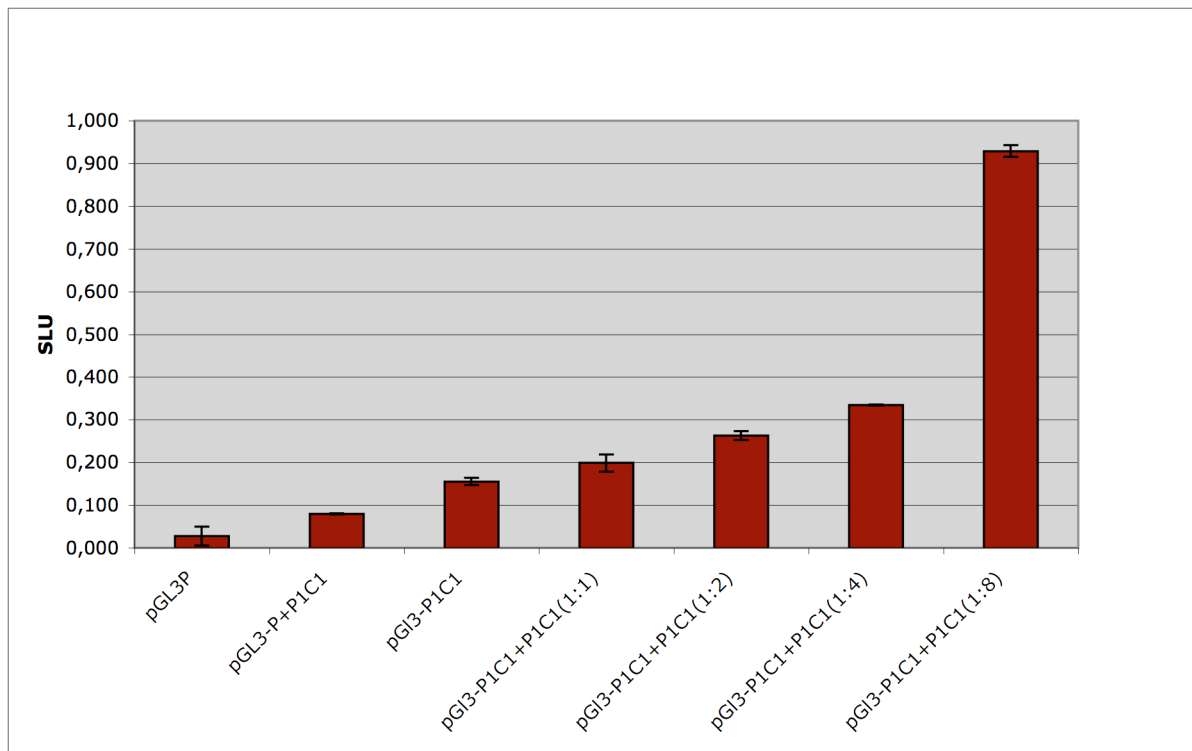


Abbildung 4-20: Die Replikation von pGL3-P/1C1 nimmt mit steigender Menge an P/1C1 zu. HeLa-Zellen wurden mit pGL3-P/1C1 und steigenden Mengen an religiertem P/1C1 transfiziert. Zur Standardisierung wurde als drittes Plasmid pRSVβ-Gal eingesetzt. Die Luc- und Gal-Aktivität der Zellextrakte wurde bestimmt. Als Kontrolle dienten der Leervektor pGL3P (Balken 1), der Leervektor unter Kotransfektion des P/1C1 (Balken 2) und das Plasmid pGL3-P/1C1 (Balken 3). SLU: specific luminescence units

Als Negativkontrolle fungiert das Plasmid pGL3-Promotor (pGL3-P), von dem das Luziferasegen konstitutiv exprimiert wird (Balken 1). Dieser Ansatz ist ein Maß für die basale Aktivität der Luziferase. Im zweiten Ansatz wurde das Gesamtgenom von P/1C1 zusätzlich zu pGL3-P transfiziert, womit ein möglicher Effekt viraler Proteine auf die Expression der Luziferase untersucht werden sollte. Dabei wurde ein schwacher Anstieg der Luziferaseaktivität beobachtet (Balken 2). Der dritte Ansatz zeigt die Luziferase-Aktivität ausgehend vom pGL3-P/1C1 (Balken 3). Eine hohe Luziferaseaktivität wurde verzeichnet, was auf mögliche Enhancerelemente innerhalb des klonierten TTV-Fragmentes hindeutet. In den Ansätzen 4 bis 7 wurde P/1C1 im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 zu pGL3-P/1C1 eingesetzt. Eine Zunahme der Luziferaseaktivität war messbar, die bis zum Faktor 1:4 einen linearen Verlauf nahm, während des Verhältnis 1:8 einen mehr als neunfachen Anstieg der Luziferase Aktivität aufwies. Resultierend aus diesem Anstieg der Luziferaseaktivität gegenüber dem Basalwert wurde auf Replikation geschlossen.

Dieses Experiment zeigte erstmalig, dass die Replikation von TTV wie erwartet durch Genom-kodierte Faktoren initiiert wird und dass das Genom des P/1C1 ein

replikationsrelevantes *in cis* aktives Element trägt. Damit konnten Replikase und Replikationsursprung kartiert werden.

4.5.2 Klonierung der verkürzten UTR in den pGI3-Promotor

Das TTV-Genom umfasst zu zwei Dritteln kodierende Bereiche. Die nicht-kodierende Sequenz (UTR) schließt eine 113 nt GC-reiche Sequenz mit ein, die vermutlich Sekundärstrukturen ausbildet und den Replikationsursprung enthalten könnte. Für die Kartierung des Replikationsursprungs wurde der Bereich Pos. 3205 - 103 bp mit den Primern 958 und 959 aus pGI3-P/1C1 amplifiziert und nach Restriktion mit *Sac* I in pGI3-P kloniert. Das 656 bp große Fragment lag im Anschluss an die Klonierung revers orientiert im Expressionsvektor pGI3-P vor. Das so konstruierte Plasmid pGI3-UTR(3205-103) wurde in weiteren Experimenten mit P/1C1 im Verhältnis 1:4 eingesetzt.

4.5.3 Kartierung des Replikationsursprungs

Das ORF1-Protein des TTV trägt zwei der vier RCM-Motive, was auf eine Funktion dieses Proteins als Replikase hinwies. Um dieser Frage nachzugehen wurde das Plasmid pGI3-UTR(3205-103) zusammen mit pcDNA-ORF1, von welchem ausgehend das ORF1-Protein ohne Fusionstag exprimiert wird, im Replikationsassay untersucht. Ebenso, wie in 4.5.1 beschrieben, wurde pcDNA-MULT1 als Ausgleichsplasmid verwendet, um eine gleich hohe DNA-Menge in allen Ansätzen zu verwenden.

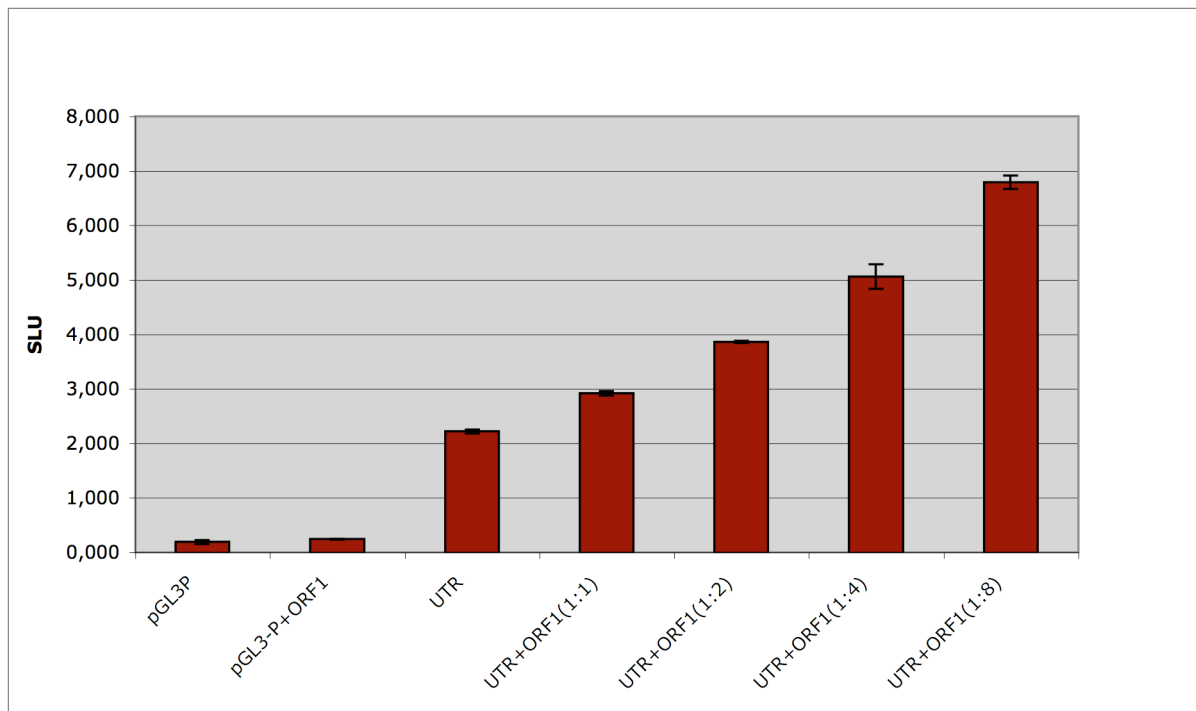


Abbildung 4-21: Der Replikationsursprung von TTV ist im Bereich der verkürzten UTR(3205-103) lokalisiert; das ORF1-Protein des TTV Isolates P/1C1 wirkt als Replikase. HeLa-Zellen wurden mit pGL3-UTR(3205-103) (UTR) und steigenden Mengen an pcDNA-ORF1 (ORF1) transfiziert. Die Luc- und Gal-Aktivität der Zellextrakte wurde bestimmt. Als Kontrollen dienen der Leervektor pGL3P (Balken 1), der Leervektor unter Kotransfektion des pcDNA-ORF1 (Balken 2) und das Plasmid pGL3-UTR (Balken 3). SLU: specific luminescence units

In Abbildung 4-21 ist das Ergebnis des Replikationsassays dargestellt. Die Ansätze 1 und 2 dienten als Negativkontrollen. Ausgehend vom Reportergenplasmid pGL3-P erfolgte die Expression der Luziferase, so dass die basale Luziferaseaktivität ohne externe Beeinflussung gemessen wurde. Im zweiten Ansatz wurde zum Reportergenplasmid der Expressionsvektor pcDNA-ORF1 im Verhältnis 1:1 kotransfiziert, um eine Beeinflussung der Luziferaseaktivität auszuschließen. Im dritten Ansatz wurde nur pGL3-UTR(3205-103) transfiziert, was zu einer annähernd 10fachen Zunahme der Luziferaseaktivität führte. Diese Veränderung ist nicht auf die Aktivität einer Replikase zurückzuführen, da der Ansatz keinen *in trans* agierenden Faktor enthält. Es ist vielmehr zu vermuten, dass in der UTR Enhancerelemente vorhanden sind, welche die Transkription des Luziferasegens verstärkten. Für die Bestimmung der Replikation wird dieser Wert als basale Luziferaseaktivität zugrunde gelegt. Mit zunehmendem Konzentrationsverhältnis von UTR zum ORF1-Protein war eine Erhöhung der Luziferaseaktivität zu beobachten. Dieses Ergebnis ließ die Schlussfolgerung zu, dass der UTR-Bereich 3205 - 103 bp den Replikationsursprung trägt und dass das ORF1-Protein ein essentieller Faktor für die virale Replikation ist.

4.5.4 Identifizierung der Replikase und Austauschbarkeit von Replikationsfaktoren

Aus den vorangegangenen Experimenten konnte geschlossen werden, dass P/1C1 für replikationsrelevante Proteine kodiert und der UTR-Bereich, von Position 3205 - 103 bp, den Replikationsursprung trägt. Zudem wurde gezeigt, dass das ORF1-Protein die Replikationseffizienz beeinflusst. Damit stellte sich die Frage, ob das ORF1-Protein hinsichtlich der Initiation der viralen Replikation ausreichend ist. Da multiple TTV-Infektionen nachgewiesen wurden (8), sollte zusätzlich untersucht werden, ob das ORF1-Protein eines heterologen TTV-Isolates Replikation am Replikationsursprung des P/1C1 initiieren kann. Die Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen den ORF1-Proteinen von P/1C1 und J01B6 (Genogruppe 5) beträgt ca. 40 % (Abb. 4-15). Zudem trägt auch das ORF1-Protein des J01B6 zwei der vier klassischen RCM-Motive (FSL: 124 - 126; YYKK: 383 - 386 oder YTDK: 435 - 438) (Abb. 4-22).

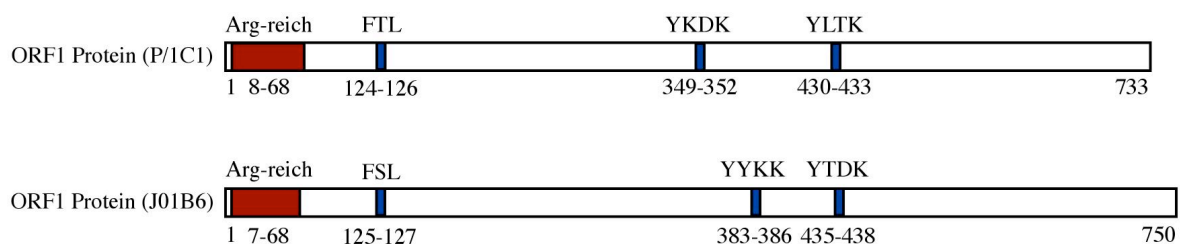


Abbildung 4-22: Schematische Darstellung der ORF1-Proteine der TTV-Isolate P/1C1 und J01B6. Konservierte Motive sind blau, der argininreiche Bereich rot dargestellt.

Das *orf1*-Gen von J01B1 wurde mit den Primern F737 und B738 aus dem Plasmid pUC-J01B6 amplifiziert und nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Bam*H I in den Vektor pcDNA3.1 kloniert (s. A.2). Das resultierende Plasmid pcDNA-ORF1(J01B6) wurde im Replikationsassay in einem Verhältnis von 1:4 zum pG13-UTR(3205-103) des P/1C1 eingesetzt.

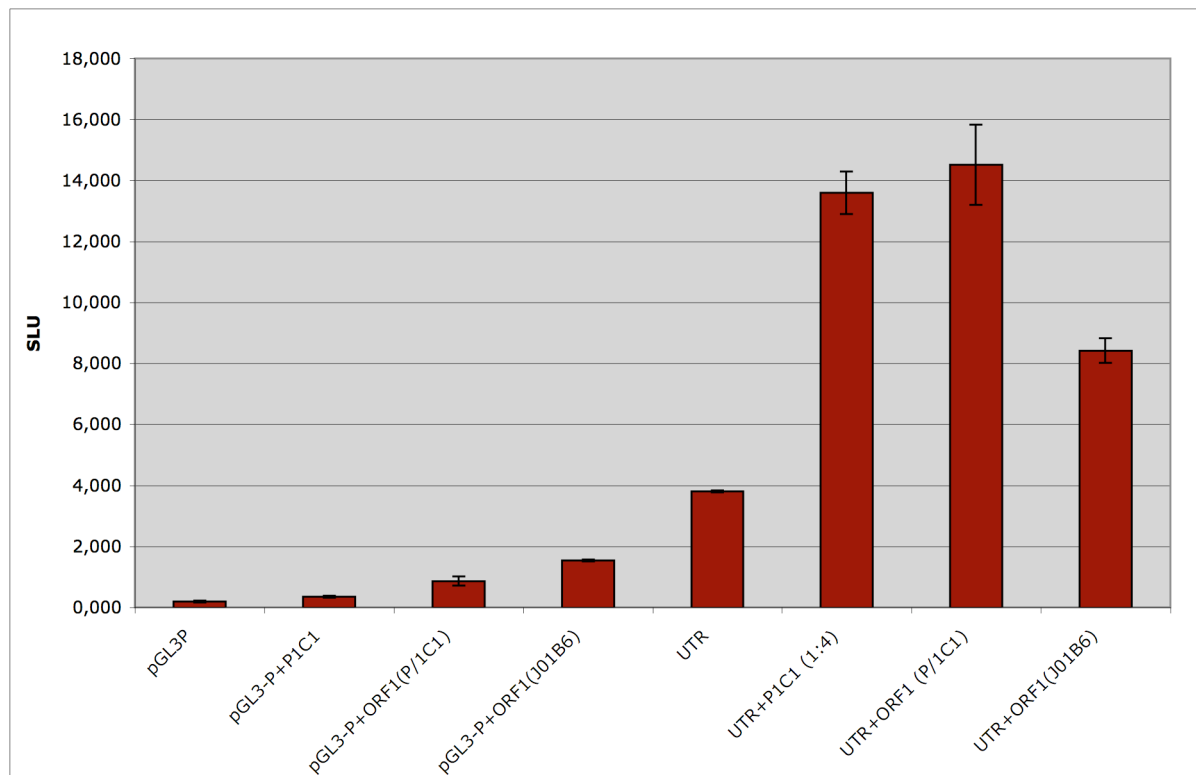


Abbildung 4-23: Das ORF1-Protein des P/1C1 ist ausreichend für die Initiation der Replikation am homologen Replikationsursprung und das ORF1-Protein des TTV-Isolates J01B6 initiiert die Replikation am heterologen Replikationsursprung. HeLa-Zellen wurden mit pGL3-UTR(3205-103) transfiziert und die Replikationsaktivität des P/1C1, ORF1(P/1C1) und ORF1(J01B6) an der verkürzten UTR(3205-103) (pGL3-UTR: UTR) bestimmt. Zur Standardisierung wurde als drittes Plasmid pRSVβ-Gal eingesetzt. Die Luc- und Gal-Aktivität der Zellextrakte wurde bestimmt. Als Kontrollen dienten der Leervektor pGL3P (Balken 1), der Leervektor unter Kotransfektion des P/1C1 (Balken 2), des ORF1-Proteins (P/1C1) (Balken 3) sowie des ORF1-Proteins (J01B6)(Balken 4) und die alleinige Transfektion des pGL3-UTR(3205-103). SLU: specific luminescence units

In Abbildung 4-23 ist das Ergebnis zum Nachweis der Replikaseaktivität des ORF1-Proteins dargestellt. Neben den bereits vorgestellten Kontrollen zur Basalexpression (Balken 1), der *in trans* Komplementation mit P/1C1, ORF1(P/1C1) und ORF1(J01B6) (Balken 2 bis 4) sowie der alleinigen Transfektion des pGL3-UTR(3205-103) (Balken 5) wurde zusätzlich zu pGL3-UTR(3205-103) das Gesamtgenom P/1C1 transfiziert. Es war eine vierfache Zunahme der Luziferaseaktivität messbar. Damit wurde erneut gezeigt, dass P/1C1 für eine Replikase kodiert (Balken 6). Wurde statt P/1C1 das Plasmid pcDNA-ORF1 mit pGL3-UTR(3205-103) kotransfiziert, wurde ein vergleichbarer Wert beobachtet (Balken 7). Das ORF1-Protein des TTV-Isolates P/1C1 ist demnach sowohl essentiell als auch hinreichend für die Initiation der viralen Replikation. Die Kotransfektion des pcDNA-ORF1 vom TTV Isolat J01B6 resultierte in einem 2,5fachen Anstieg der Luziferaseaktivität. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass

das ORF1-Protein von J01B6 die Initiation der Replikation am heterologen Replikationsursprung von P/1C1 trans-komplementieren kann (Balken 8).

4.5.5 Nachweis der Replikation in unterschiedlichen Zelllinien

Das Vorkommen replikativer doppelsträngiger TTV-DNA wurde *in vivo* in Knochenmarkzellen, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) und Leberzellen nachgewiesen (143, 145, 196). Es wird daher vermutet, dass in diesen Zellen virale Replikation stattfindet. Zur Untersuchung der Replikation von TTV *in vitro* in eukaryotischen Zelllinien unterschiedlicher Spezies und Organe wurde ein Replikationsassay durchgeführt. Dazu wurden die humane Leberzelllinie Huh7, die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa, die Nierenzelllinie Vero der grünen Meerkatze, die Schweinenierenzelllinie PS und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 verwendet.

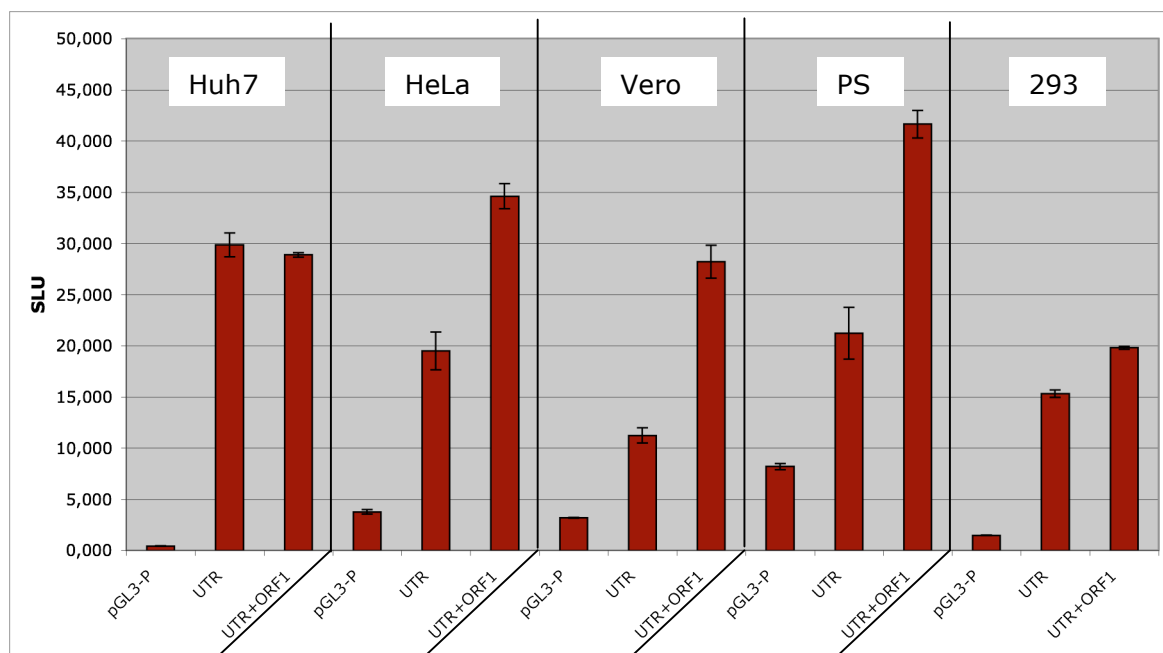


Abbildung 4-24: Replikation von TTV in verschiedenen Zelllinien. Zelllinien unterschiedlicher Spezies wurden mit pG13-UTR(3205-103) sowie ORF1(P/1C1) im Verhältnis 1:4 transfiziert. Als Kontrolle wurde der Vektor pG13-P und zur Bestimmung der basalen Aktivität das Plasmid pG13-UTR(3205-103) transfiziert. Die Zelllinien Huh7, HeLa, Vero, PS und HEK 293 wurden eingesetzt.

In Abbildung 4-24 ist die Replikationsaktivität 48 h nach der Transfektion in unterschiedlichen Zelllinien wiedergegeben. Die in Huh7-Zellen ermittelte basale Luziferaseaktivität für den die UTR tragenden pG13-UTR(3205-103) war sehr hoch. Die

Zugabe der Replikase führte zu keinem weiteren Anstieg der Luziferaseaktivität. Im Falle der Vero-Zellen konnte ein nahezu dreifacher Anstieg, für HeLa- und die PS-Zellen ein zweifacher Anstieg und für die HEK 293-Zellen ein 1,3facher Anstieg verzeichnet werden. Es ist festzuhalten, dass Replikation in allen verwendeten Zelllinien mit Ausnahme der humanen Leberzellen nachgewiesen wurde. Die Replikationsaktivität schwankte und die Transkription ausgehend von der UTR fiel unterschiedlich stark aus.

4.6 Untersuchungen hinsichtlich homologer und heterologer Interaktion zwischen viralen Proteinen in Hefezellen

In den vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass das ORF1-Protein für die virale Replikase kodiert. Für viele Replikationsenzyme ist eine Komplexierung mit ihren Isoformen als zwingend notwendig beschrieben worden, so z. B. auch für die Initiation der Replikation von PCV. Hierbei ist die Wechselwirkung des Rep-Proteins mit dem Rep'-Protein essentiell (173). Um zu überprüfen, ob auch die TTV-Replikase mit sich selbst bzw. ihren Isoformen in Wechselwirkung tritt und so einen Replikationskomplex ausbildet, wurden diese Interaktionen in Hefezellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden ORF1 und ORF1/1 als Fusionsprotein mit der Bindedomäne (BD) bzw. der Aktivierungsdomäne (AD) des Hefetransaktivators Gal4 fusioniert. Werden durch eine Protein:Protein-Interaktion der TTV ORF1-Proteine die BD und AD in räumliche Nähe gebracht, rekonstituiert sich der Gal4-Transkriptionsfaktor. Es kommt nachfolgend zur Expression von Reportergenen, die das Wachstum der verwendeten Hefezellen AH109 auf Selektionsmedium ermöglichen.

Die Expression erfolgte ausgehend von den Expressionsvektoren pGBKT7 und pGADT7 welche die TTV-Proteine als Gal4-BD-Fusionsprotein (pGBKT7) bzw. als Gal4-AD-Fusionsprotein (pGADT7) mit N-terminalem c-Myc (pGBKT7) oder HA-Epitop-Tag (pGADT7) ermöglichen. Zur Kontrolle der konstruierten Expressionsvektoren wurden die Fusionsproteine *in vitro* exprimiert.

Des Weiteren sollten homologe Interaktionen von ORF1/2, ORF2, ORF2/2, ORF3 und ORF4 im Hefesystem untersucht werden.

4.6.1 Klonierung und Expressionskontrolle der N-terminalen HA- und c-Myc-Fusionsproteine

Die Generierung der für das „Yeast Two-Hybrid“-System verwendeten Fusionsproteine erfolgte durch PCR-Amplifikation und anschließender Insertion der Fragmente in die Expressionsvektoren pGBKT7 und pGADT7 (s. Anhang A.2). Nach Sequenzierung der Konstrukte wurden die N-terminal HA- und c-Myc-Fusionsproteine *in vitro* mittels des „TNT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System“ exprimiert (s. 3.7.8). Als Matrize wurden jeweils 1 µg pGBKT-ORF1, -ORF1*, -ORF1/1, -ORF1/2, -ORF2, -ORF2/2, -ORF3 und -ORF4 bzw. 1 µg pGADT-ORF1, -ORF1*, -ORF1/1, -ORF1/2, -ORF2, -ORF2/2, -ORF3 und -ORF4 eingesetzt.

Die Größe der Fusionsproteine wurde unter Verwendung eines geeigneten Größenstandards im Immunoblot kontrolliert. Folgende Molekularmassen wurden für die c-Myc-Fusionsproteine nach Expression der pGBKT7-ORF-Konstrukte ermittelt: 80 kDa (ORF1 und ORF1*), 27 kDa (ORF1/1), 25 kDa (ORF1/2), 19 kDa (ORF2), 40 kDa (ORF2/2), 37 kDa (ORF3) und 23 kDa (ORF4) (Abb. 4-25). Für die pGADT-ORF-Konstrukte wurden vergleichbare Daten ermittelt.

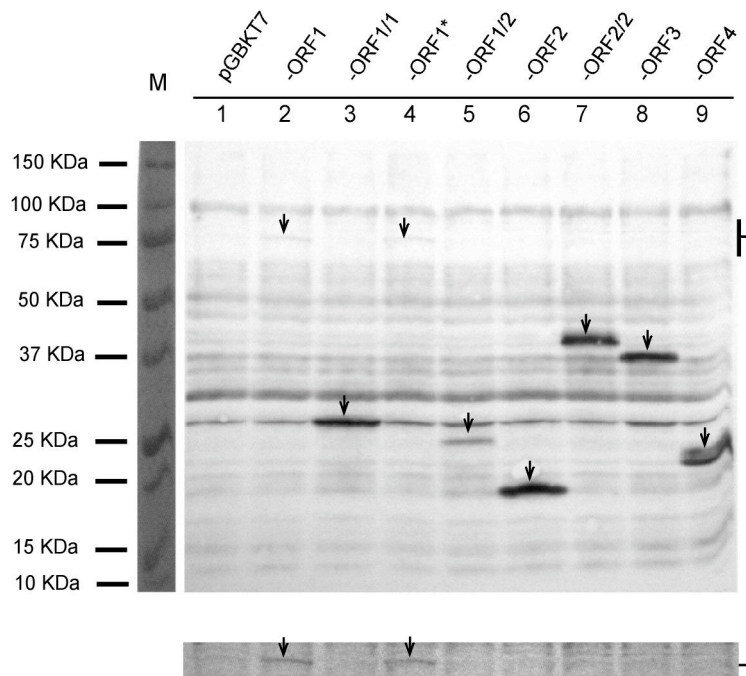


Abbildung 4-25: *In vitro* Expression der c-Myc-gekoppelten TTV-kodierten Proteine des Isolates P/1C1. Spur 1: Leervektor pGBKT7 als Kontrolle; Spur 2: ORF1; Spur 3: ORF1/1; Spur 4: ORF1*; Spur 5: ORF1/2; Spur 6: ORF2; Spur 7: ORF2/2; Spur 8: ORF3 und Spur 9: ORF4. Die Pfeile deuten auf die TT-Proteine. Die untere Abbildung zeigt einen Ausschnitt mit stärkerem Kontrast. Die Pfeile zeigen die Expression des Fusionsproteins c-Myc-ORF1. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein™ eingesetzt.

4.6.2 „Yeast Two-Hybrid“ - ORF1 Derivate bilden keine homologen oder heterologen Komplexe in Hefezellen

Die „Yeast Two-Hybrid“-Analyse wird in Abhängigkeit von der Aufgabenstellung in unterschiedlichen Transformationsmaßstäben durchgeführt. Die homologe oder heterologe Interaktion der TTV-Proteine wurde zunächst im kleinen Maßstab durchgeführt, der geeignet ist, um DNA-BD- oder AD-Fusionsproteine zu identifizieren, die als Transkriptionsfaktoren wirken und um toxische Effekte festzustellen. Beim Auftreten möglicher Interaktionen und bei Durchführungen mit dem ORF1-Protein, wurden die Versuchsansätze in großem Maßstab wiederholt.

Die durchgeführten Kotransformationen sind in Tabelle 4-1 aufgelistet.

Die DNA der die zu untersuchenden Interaktionspartner kodierenden Plasmide wurde in Hefezellen transformiert. Diese wurden auf Nährbodenplatten mit hoher Stringenz (-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal) ausplattiert und für mindestens 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Tabelle 4-1: YTH Ansätze

Ansatz	DNA-BD-Fusionsprotein	AD-Fusionsprotein	Transformationsmaßstab
Negativkontrolle			
BD-Lamin C:AD-SV40 Antigen	T- pGBKT7-lam	pGADT7-T	<i>small</i>
Positivkontrolle			
BD-p53:AD-SV40 T-Antigen	pGBKT7-53	pGADT7-T	<i>small</i>
Homologe Interaktion			
BD-ORF1:AD-ORF1	pGBKT7-ORF1	pGADT7-ORF1	<i>small / large</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF1	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF1	pGADT7-T	<i>small</i>
BD-ORF1/1:AD-ORF1/1	pGBKT7-ORF1/1	pGADT7-ORF1/1	<i>small / large</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF1/1	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF1/1	pGADT7-T	<i>small</i>
BD-ORF1*:AD-ORF1*	pGBKT7-ORF1*	pGADT7-ORF1*	<i>small</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF1*	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF1*	pGADT7-T	<i>small</i>

Ansatz	DNA-BD-Fusionsprotein	AD-Fusionsprotein	Transformations- maßstab
BD-ORF1/2:AD-ORF1/2	pGBKT7-ORF1/2	pGADT7-ORF1/2	<i>small</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF1/2	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF1/2	pGADT7-T	<i>small</i>
BD-ORF2:AD-ORF2	pGBKT7-ORF2	pGADT7-ORF2	<i>small</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF2	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF2	pGADT7-T	<i>small</i>
BD-ORF2/2:AD-ORF2/2	pGBKT7-ORF2/2	pGADT7-ORF2/2	<i>small</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF2/2	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF2/2	pGADT7-T	<i>small</i>
BD-ORF3:AD-ORF3	pGBKT7-ORF3	pGADT7-ORF3	<i>small / large</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF3	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF3	pGADT7-T	<i>small</i>
BD-ORF4:AD-ORF4	pGBKT7-ORF4	pGADT7-ORF4	<i>small / large</i>
	pGBKT7	pGADT7-ORF4	<i>small</i>
	pGBKT7-ORF4	pGADT7-T	<i>small</i>
Heterologe Interaktion			
BD-ORF1:AD-ORF1/1	pGBKT7-ORF1	pGADT7-ORF1/1	<i>large</i>
BD-ORF1/1:AD-ORF1	pGBKT7-ORF1/1	pGADT7-ORF1	<i>large</i>
BD-ORF3:AD-ORF4	pGBKT7-ORF3	pGADT7-ORF4	<i>large</i>
BD-ORF4:AD-ORF3	pGBKT7-ORF4	pGADT7-ORF3	<i>large</i>

Der qualitative Nachweis einer Protein:Protein-Interaktion erfolgte über die Aktivierung der Reportergene, in deren Folge sich Hefekolonien auf Selektionsmedium mit X- α -Gal blau verfärbten. Falsch-positive Ergebnisse können Proteine hervorrufen, die durch eine eigene DNA-Bindedomäne an den Promoter binden und somit selbst als Transkriptionsfaktoren wirken. Um die Rate an falsch-positiven Kandidaten zu ermitteln, wurden die „leeren“ Expressionsplasmide pGBKT7 und pGADT7 mit den AD-TTV-Expressionsplasmiden bzw. mit den BD-TTV-Expressionsplasmiden kotransfiziert (Tab. 4-1). Als Positivkontrolle diente die Kotransformation der Plasmide pGBKT7-53 und pGADT7-T, welche die Interaktion zwischen dem Protein p53 und dem T-Antigen von SV40 gewährleisten (69, 91). Als Negativkontrolle und somit als Nachweis der Spezifität fungierte die Kotransformation von pGBKT7-Lam und pGADT7-T, da Lamin C und das SV40 T-Antigen keine Komplexe ausbilden (10, 193). Die Kontrollansätze wurden auf Selektionsmedium mit niedriger

(-Leu/-Trp) und mit hoher (-Leu/-Trp/-His/-Ade) Stringenz ausplattiert (s. Abb. 4-26). Unter hoher Stringenz wuchs nur die Positivkontrolle (pGBKT7-53 und pGADT7-T), nicht aber die Negativkontrolle (pGBKT7-Lam und pGADT7-T) (Abb. 4-26).

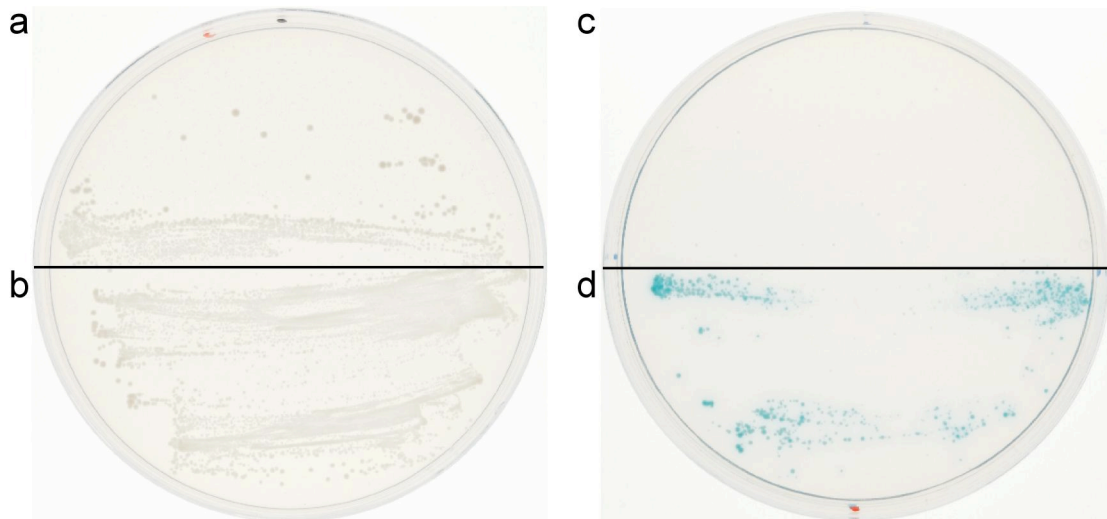


Abbildung 4-26: Transformationskontrollen für den „Yeast Two-Hybrid“-Assay. a) und c) pGADT7-T + pGBKT7-Lam (Negativkontrolle), b) und d) pGADT7-T + pGBKT7-53 (Positivkontrolle) nach Transformation in den Hefestamm AH109. Die Ansätze wurden auf einer Platte mit geringer Stringenz (-Leu/-Trp) kultiviert (a, b) bzw. auf einer Platte mit hoher Stringenz (-Leu/-Trp/-His/-Ade Platten +X-α-Gal) (c, d).

Beim Test auf Autoaktivierung der TTV-Fusionsproteine wurde nach Kotransfektion von pGADT7 und pGBKT-ORF4 ein Wachstum von Hefezellen und deren Blaufärbung auf Nährboden mit hoher Stringenz beobachtet, sodass hier von falsch-positiven Resultaten ausgegangen werden muss (s. Abb. 4-27). Dabei weist das Wachstum im Kontrollansatz auf eine mögliche Funktion des Proteins ORF4 als Transaktivator hin. BD-ORF4 bindet über die Bindedomäne an den Promotorbereich und eine durch den ORF4 bereitgestellte AD vermittelt die Initiation der Transkription. Bei der Kombination von pGBKT7 + pGADT-ORF4 konnte nach fünf Tagen kein Wachstum beobachtet werden. Geht man davon aus, dass die Gal4-BD spezifisch an das Promotorelement bindet, wird diese für andere BD, welche unspezifisch binden, blockiert und es kann keine Transkription nachgewiesen werden.

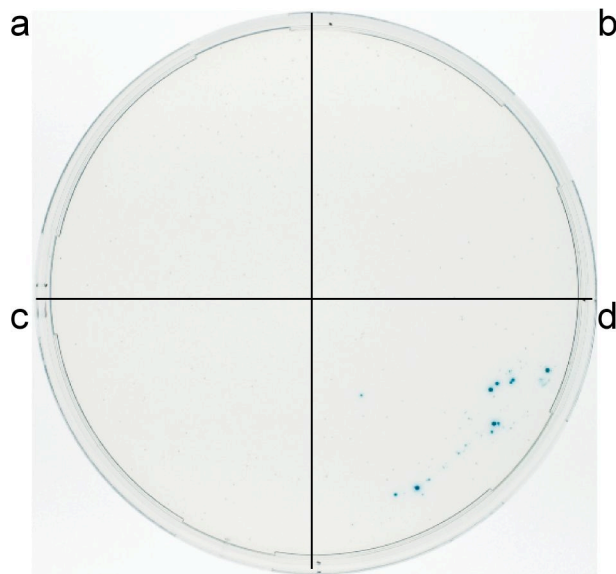


Abbildung 4-27: Untersuchung der Fusionsproteine auf Autoaktivierung. Die Analyse erfolgte auf hoch-stringenten Platten (-Leu/-Trp/-His/-Ade Platten + Xalpha Gal). a) pGADT7 + pGBKT7-ORF3, b) pGADT7-ORF3 + pGBKT7; c) pGADT7 + pGBKT7-ORF4, d) pGADT7-ORF4 + pGBKT7.

Die Analyse möglicher homologer und heterologer Interaktionen der Fusionsproteine erfolgte in der ersten Durchführung im kleinen Maßstab (s. Tab. 4-1). Für die ORF1-Isoformen und die ORF2-Derivate wurde keine Interaktionen im „Yeast Two-Hybrid“-Assay beobachtet. Die Ausbildung heterologer Komplexe wurde ausschließlich für die Proteine ORF3 und ORF4 sowohl in der Kombination BD-ORF3/AD-ORF4 als auch für BD-ORF4/AD-ORF3 gezeigt (s. Abb. 4-28c, d). Die Blaufärbung ist dabei im Falle der Kombination BD-ORF3/AD-ORF4 stärker als für den inversen Ansatz (BD-ORF4/AD-ORF3).

Die Analyse der homologen Interaktion der Proteine ORF3 und ORF4 ergab einen positiven Befund und wird in Abbildung 4-28a und b veranschaulicht. Damit konnte die Befähigung von ORF3 und ORF4 zur Ausbildung von ORF3:ORF3, ORF4:ORF4 Komplexen gezeigt werden. Die Ausbildung einer heterologen Interaktion zwischen ORF3 und ORF4 wurde ebenfalls nachgewiesen Abbildung 4-28c und d.

Durch das positive Ergebnis im Experiment zum Nachweis der Autoaktivierung des BD-ORF4, kann der Interaktionsnachweis zwischen ORF4:ORF4 und ORF4:ORF3 vorerst nur kritisch betrachtet werden. Eine Möglichkeit zur Verminderung der Autoaktivierung wäre die Zugabe von 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) zum Reaktionsansatz. Dieses Reagenz ist ein kompetitiver Inhibitor des His3-Proteins und unterdrückt somit das Wachstum auf Histidindefizientem Medium. Des Weiteren erfordert eine im „Yeast Two Hybrid“-Assay gezeigte Protein-Interaktion die Bestätigung durch mindestens ein weiteres Experiment. Im Falle der hier dargestellten Interaktionen wurde die Koimmunopräzipitation angewendet (s. 4.7).

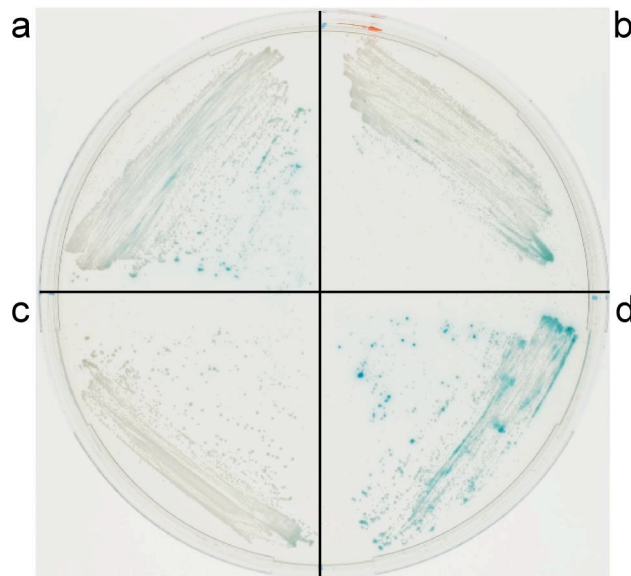


Abbildung 4-28: Die viralen Proteine ORF3 und ORF4 bilden heterologe und homologe Komplexe aus. Der Nachweis erfolgte im „Yeast Two-Hybrid“-Assay auf hochstringenten Platten (-Leu/-Trp/-His/-Ade Platten + Xalpha Gal): a) pGADT7-ORF4 + pGBKT7-ORF4, b) pGADT7-ORF3 + pGBKT7-ORF3; c) pGADT7-ORF3 + pGBKT7-ORF4, d) pGADT7-ORF4 + pGBKT7-ORF3

4.7 Koimmunopräzipitation

Die im „Yeast Two-Hybrid“-System ermittelte homologe und heterologe Wechselwirkung der Fusionsproteine AD-ORF3, BD-ORF3, AD-ORF4 und BD-ORF4 sollte in einem alternativen System verifiziert werden. Neben dem Pull-Down-Assay kommt häufig die Koimmunopräzipitation zur Anwendung (33), die auch in der vorliegenden Arbeit zur Bestätigung der Interaktion eingesetzt wurde. Die Proteine ORF3 und ORF4 mussten hierzu mit einem Epitoptag fusioniert exprimiert werden. Dafür wurden die Expressionsplasmide pGADT-ORF3, pGADT-ORF4, pGBKT-ORF3 und pGBKT-ORF4 verwendet, von denen ausgehend das ORF3- und ORF4-Protein N-terminal HA- bzw. Myc-fusioniert *in vitro* exprimiert werden kann. In diesem System können keine Spleißprozesse ablaufen, sodass die ausschließliche Expression des ORF3-Proteins oder ORF-4 Proteins gewährleistet ist. In der Koimmunopräzipitation werden zwei Proteine miteinander kombiniert und durch die Präzipitation mit einem, in diesem Fall gegen den HA-Tag gerichteten, Antikörper ausgefällt. Eine Wechselwirkung der beiden Kandidaten wird in der darauf folgenden Western Blot-Detektion über den Antikörper, der das andere Epitop des Bindepartners (hier: c-Myc) erkennt, nachgewiesen (s. Abb. 4-29).

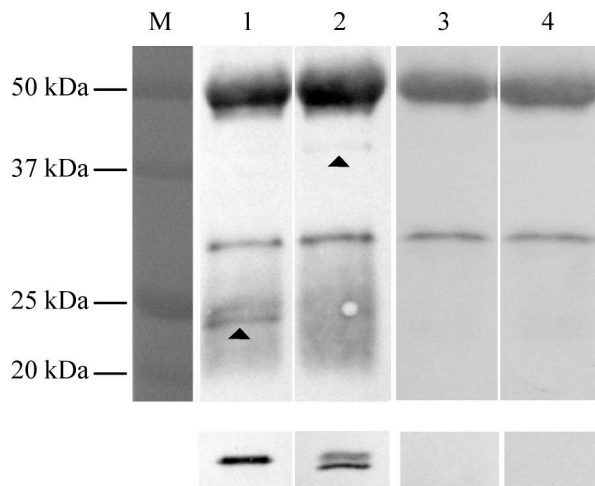


Abbildung 4-29: Heterologe Interaktion zwischen den Proteinen ORF3 und ORF4.

(1) Präzipitat aus HA-ORF3 und Myc-ORF4, der Pfeil markiert das ca. 23kDa Myc-ORF4-Protein; (2) Präzipitat aus Myc-ORF3 und HA-ORF4, der Pfeil markiert das ca. 37kDa Myc-ORF3-Protein. Kontrollen: (3) Präzipitat aus Myc-ORF3 und pCMV-HA; (4) Präzipitat aus Myc-ORF4 und pCMV-HA. Unterhalb der Gelspuren sind die jeweiligen Interaktionspartner im Rohlysate durch Detektion mit einem anti-HA Antikörper nachgewiesen: (1) HA-ORF3; (2) HA-ORF4; (3) und (4) pCMV-HA.

Die Abbildung 4-29 zeigt die Interaktion zwischen den Proteinen ORF3 und ORF4. Im Ansatz 1 wurden die Konstrukte pGADT-ORF3 und pGBKT-ORF4 *in vitro* exprimiert, was zur Synthese von HA-ORF3 und Myc-ORF4 führte. Das ORF3-Protein wurde mit dem anti-HA Antikörper präzipitiert. Die Detektion erfolgte im anschließenden Western Blot mit einem anti-Myc Antikörper, der zur Markierung des ORF4-Protein (23 kDa) eingesetzt wurde. Die Visualisierung erfolgte durch Chemilumineszenz nach Anwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Im zweiten Ansatz wurden die Proteine mit dem heterologen Tag fusioniert exprimiert und das ORF3-Protein (37kDa) detektiert. Da in beiden Ansätzen nach Immunpräzipitation der jeweilige Reaktionspartner immunologisch nachgewiesen wurde, konnte die Interaktion zwischen ORF3 und ORF4 bestätigt und die Ergebnisse des YTH-Assay verifiziert werden.

Die Abbildung 4-30 zeigt das Ergebnis eines gleichartigen Experiments, dass die Di- oder Multimerisierung von ORF3 und in einem separaten Ansatz von ORF4 untersucht. Für Ansatz 1 wurde das ORF3-Protein sowohl HA- als auch c-Myc-fusioniert exprimiert und gemeinsam inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mittels eines anti-HA-, die Detektion mit Hilfe eines anti-c-Myc Antikörpers. Die auftretende Bande von 37 kDa zeigte, dass nach Präzipitation von HA-ORF3 auch das Myc-fusionierte ORF3-Protein nachgewiesen werden kann. In Ansatz 2 wurde nach dem gleichen Prinzip die homologe Bindung von ORF4-Molekülen bestätigt.

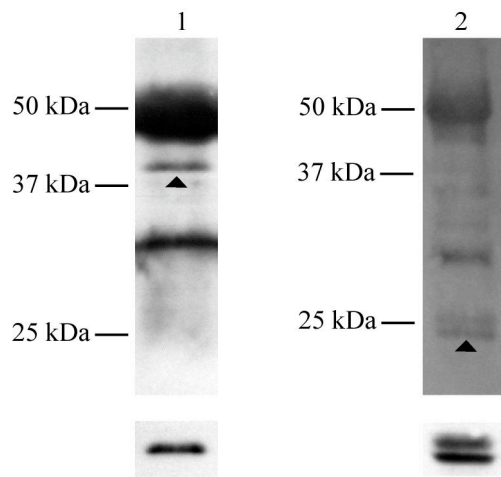


Abbildung 4-30: Homologe Interaktion zwischen der Proteine ORF3 und ORF4.

(1) Präzipitat aus HA-ORF3 und Myc-ORF3, der Pfeil markiert das ca. 37kDa Myc-ORF3-Protein; (2) Präzipitat aus Myc-ORF4 und HA-ORF4, der Pfeil markiert das ca. 23kDa Myc-ORF4-Protein. Kontrollen: (3) und (4) der Abb. 29. Unterhalb der Gelspuren sind die jeweiligen Interaktionspartner im Rohlysat durch Detektion mit einem anti-HA Antikörper nachgewiesen: (1) HA-ORF3; (2) HA-ORF4.

4.8 Untersuchung zur subzellulären Lokalisation der TTV-Proteine ORF3 und ORF4

Da die Proteine ORF3 und ORF4 sowohl homolog als auch heterolog interagieren und beide Proteine im Nukleoplasma von Huh7-Zellen lokalisiert waren (s. 4.3.3), sollten in einem weiterführenden Experiment die Proteine in Huh7-Zellen koexprimiert und auf Veränderungen des Lokalisationsmuster untersucht werden.

4.8.1 Detektion der Proteine ORF3 und ORF4 im Nukleoplasma

Um die Synthese von Myc-fusionierten ORF3- und ORF4-Proteinen zu gewährleisten, mussten *orf3* und *orf4* in den Vektor pCMV-myc kloniert werden. *Orf3* und *orf4* lagen im Vektor pGBKT7 unter Kontrolle des T7 Promotors vor und konnten deshalb nicht in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Die für die Klonierung notwendigen Primer, die Annealingtemperatur und die verwendete Matrize, der für die Bestimmung der Zelllokalisierung verwendeten Konstrukte, sind im Anhang A.2 dargestellt.

Zur Bestimmung der Lokalisation der Proteine ORF3 und ORF4 nach Koexpression wurden die Plasmide in Huh7-Zellen kotransfiziert und die Lokalisation der exprimierten Proteine nach 48 h bestimmt. In Abbildung 4-31 ist die Lokalisation der Proteine in den Huh7-Zellen

dargestellt. Nach Überlagerung des grünen Fluoreszenzsignals (FITC) für ORF3 und des violetten Signals (Cy5) von ORF4 ergab sich eine hellblau-weiße Verteilung, die auf eine Kollokalisierung hindeutete. Die Nukleoli verblieben in der Überlagerung der Signale als rotes Fluoreszenzsignal und blieben demzufolge von ORF3 und ORF4 ausgespart (Abb. 4-31b und c). Mit diesem Ergebnis wird das unter 4.3.3 gezeigte Resultat bestätigt, zu einer Umverteilung der koexprimierten Proteine kam es nicht.

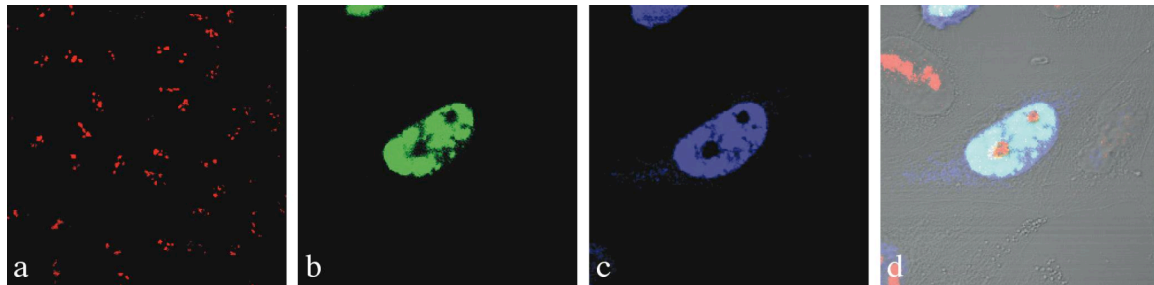


Abbildung 4-30: Die Proteine ORF3 und ORF4 sind im Nukleoplasma lokalisiert. Huh7 wurden mit Expressionsplasmiden für ORF3 und ORF4 kotransfiziert und nach 48 h fixiert. Das ORF3-Protein wurde mit dem FITC-konjugierten Antikörper anti-HA aus Kaninchen angefärbt, während das ORF4-Protein erst mit dem primären Antikörper anti-c-Myc aus Kaninchen (SIGMA, USA) und anschließend mit dem Sekundäntikörper anti-Kaninchen IgG Cy5-Konjugat (SIGMA, USA) markiert wurde. Die Lokalisation der viralen Proteine wurde anschließend durch konfokale Laserscannmikroskopie untersucht. (a) Huh7-Zellen mit den Vektoren pCMV-HA und pCMV-myc transfiziert, Markierung der Nukleoli mit anti-human Nukleoli Antikörper und anti-Maus IgG Rhodamin-Konjugat); (b) Visualisierung des HA-fusionierten ORF3 (c) Visualisierung des c-Myc-fusionierten ORF4, (d) Überlagerung der Fluoreszenzsignale in der Durchlichtmikroskopie von Huh7-Zellen.

4.9 Einfluss der Proteine ORF3 und ORF4 auf die virale Transkription

Um zu überprüfen, ob das ORF3-Protein und das ORF4-Protein die Transkription von P/1C1 begünstigt, wurde ein Luziferaseassay durchgeführt, indem das die UTR tragende Plasmid pGI3-UTR(3205-103) mit den jeweiligen Expressionsplasmiden pcDNA-ORF3 oder pcDNA-ORF4 kombiniert eingesetzt wurden. Da die Sequenzen der Proteine ORF3 und ORF4 keine Replikase-typischen Sequenzen tragen, wurde im folgenden Experiment davon ausgegangen, dass ein Anstieg der Luziferaseaktivität auf transaktivatorische Einflüsse zurückzuführen ist. Um einen Einfluss auf die Replikation experimentell vollständig

ausschließen zu können, hätte eine Plasmidvariante konstruiert werden müssen, die einen replikationsdefekten Replikationsursprung trägt, was im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich war. Als *in cis* agierendes Fragment wurde die UTR (3205-103 bp) eingesetzt, welche auch Enhancerelemente trägt (174). Als Vergleichswert wurde die Luziferaseaktivität nach Replikation durch Kotransfektion des Gesamtgenoms von P/1C1 gemessen.

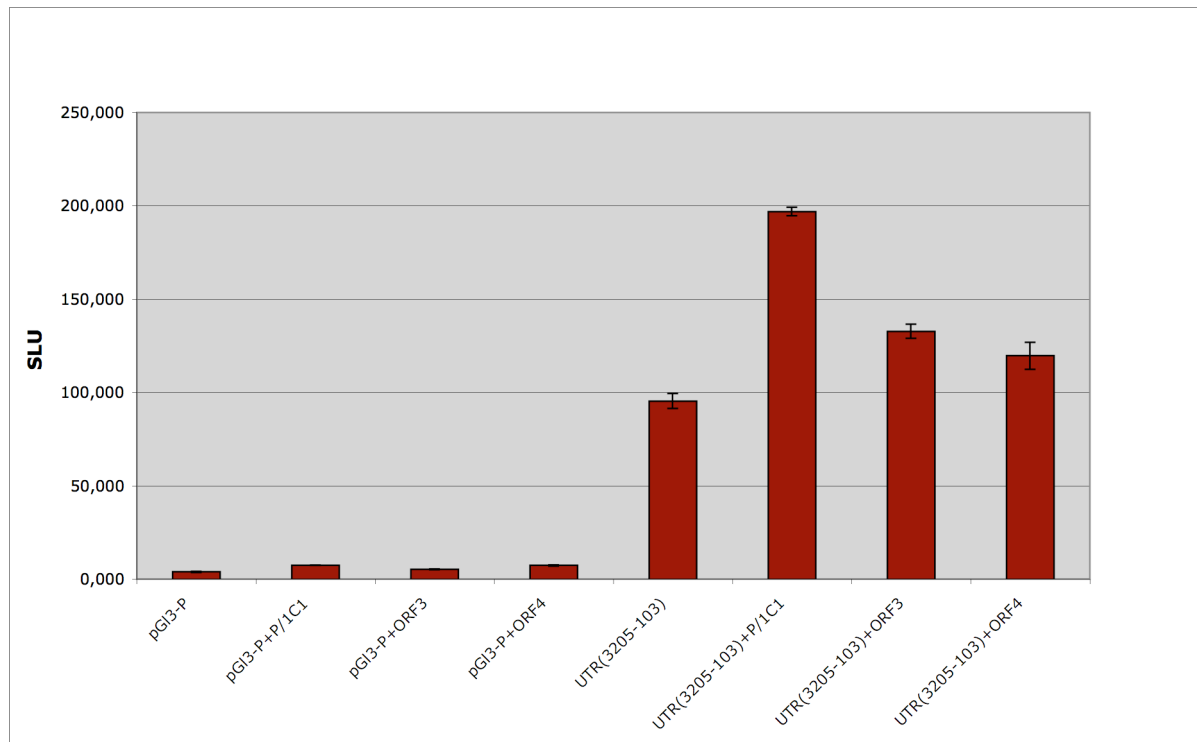


Abbildung 4-31: Die Proteine ORF3 und ORF4 zeigen geringen transaktivatorischen Einfluss. pGI3-UTR(3205-103). HeLa-Zellen wurden mit pGL3-UTR(3205-103) transfiziert und ein viral induzierter transaktivatorischer Effekt ausgehend vom P/1C1, ORF3 und ORF4 an der verkürzten UTR(3205-103) (pGI3-UTR: UTR) bestimmt (Verhältnis UTR:*in trans* Faktor: 1:4). Zur Standardisierung wurde als drittes Plasmid pRSVβ-Gal eingesetzt. Die Luc- und Gal-Aktivität der Zellextrakte wurde bestimmt. Als Kontrollen dienten der Leervektor pGI3P (Balken 1), der Leervektor unter Kotransfektion des P/1C1 (Balken 2), des ORF3 (Balken 3) sowie des ORF4 (Balken 4) und die alleinige Transfektion des pGI3-UTR(3205-103) (Balken 5). SLU: specific luminescence units

In Abbildung 4-32 ist das Ergebnis des Luziferaseassay dargestellt. Die ermittelte basale Luziferaseaktivität für den Ansatz pGI3-UTR(3205-103) (Balken 5) zeigt einen erhöhten Wert gegenüber den Kontrollwerten, bei denen nur das den Basalpromotor und das Luziferasegen tragende Plasmid pGI3-P bzw. der Vektor mit den *in trans* agierenden Interaktionspartnern in die Zellen kotransfiziert wurde (Balken 1-4). Dies deutet auf einen Einfluss der Enhancerelemente innerhalb der UTR hin, welche die Transkription begünstigen. Wird dieses Plasmid zusätzlich zu P/1C1 transfiziert (Balken 6), war ein Anstieg der

Luziferaseaktivität messbar. Bislang wurde davon ausgegangen, dass dieser Anstieg allein auf die Replikaseaktivität des ORF1-Proteins zurückzuführen ist. Die nachfolgenden Befunde deuten allerdings an, dass auch die Proteine ORF3 und ORF4 durch Steigerung der Transkriptionsaktivität dazu beitragen: Werden anstelle von P/1C1 die Plasmide pcDNA-ORF3 bzw. pcDNA-ORF4 kotransfiziert, ist ein weniger stark ausgeprägter Anstieg der Luziferaseaktivität zu messen. Diese Zunahme kann vermutlich nicht auf Replikation zurückgeführt werden, da die beiden Proteine keine Homologie zu bekannten Replikasen aufweisen. Die Proteine ORF3 und ORF4 induzieren keine Steigerung der Luziferaseaktivität im Falle der Kotransfektion mit dem pG13-P, was auf eine Interaktion mit den TTV-spezifischen Enhancerelemente in der UTR hinweist.

