

**Charakterisierung von reptilienpathogenen  
Paramyxoviren und Analyse des prokaryotisch  
exprimierten partiellen Fusionsgens**

Julia Margareta Franke

Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Hoffmann

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Winfried Ahne

**Charakterisierung von reptilienpathogenen  
Paramyxoviren und Analyse des prokaryotisch exprimierten  
partiellen Fusionsgens**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von **Julia Margareta Franke**

aus Möhrendorf bei Erlangen

München, im Frühjahr 2003

Gedruckt mit Genehmigung  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent:	Univ.-Prof. Dr. W. Ahne
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Für meine Familie Roswitha, Friedrich, Susanne, Matthias und Ella und für  
meinen Freund Thomas.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>II. Literaturübersicht Paramyxoviren</b>	<b>3</b>
1. Taxonomie	3
2. Aufbau	4
2.1. Viruspartikel	4
2.2. Genom und Genomaufbau	5
2.3. Proteine	6
2.3.1. Strukturproteine	6
2.3.2. Nicht-Strukturproteine	7
2.3.3. Fusionsprotein (F Protein)	8
2.3.3.1. Virale F Proteine	8
2.3.3.2. Motive des Paramyxovirus F Proteins	9
2.3.3.3. Antigenetische Eigenschaften des F Proteins	13
3. Virusreplikation	13
4. Reptilienpathogene Paramyxoviren (RPMV)	15
<b>III. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
1. Identifizierung von Reptilien Paramyxoviren (RPMV)	18
2. Phylogenetische Analyse	24
3. Fusionsgen Analyse des RPMV Gono-GER85	25
4. Klonierung des F Gens für die prokaryotische Expression	27
4.1. Expressionssystem	27
4.2. Konstruktion der Plasmide	30
5. Prokaryotische Gen-Expression und Proteinanalysen	36
5.1. Induktion der Expression	36
5.2. Aufreinigung rekombinanter Proteine	37
5.3. Furin Protease-Verdau	38
5.4. Proteinanalyse	39

---

<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
1. Identifizierung der Virusisolate	43
2. Phylogenetische Analyse	51
3. Fusionsgen Analyse	54
4. Vorarbeiten zur prokaryotischen Expression	60
4.1. Expressionssystem	60
4.2. Konstruktion der Plasmide	61
4.3. Modell und Berechnung erwarteter Proteine	63
5. Protein Analyse	64
5.1. Gesamtprotein der induzierten Expressionsansätze und Kontrollen	64
5.2. Aufgereinigte rekombinante Proteine	66
5.3. Furin Protease-Verdau	66
<b>V. Diskussion</b>	<b>68</b>
1. Identifizierung	68
2. Taxonomie	69
3. Fusionsprotein	71
4. Expression	75
<b>VI. Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>VII. Summary</b>	<b>81</b>
<b>VIII. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>IX. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>X. Tabellenverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>XI. Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>XII. Anhang</b>	<b>98</b>
1. Danksagung	98
2. Lebenslauf	100

## I. Einleitung

Im Jahr 1972 ereignete sich eine „fatale endemische Infektion in einem (schweizer) Serpentarium“, das Schlangengift für die Herstellung pharmazeutischer Präparate erzeugte. Erkrankte Tiere zeigten Opisthotonus, ungewöhnliches Verhalten mit zentralnervösen Störungen und respiratorische Symptome mit eitrig-mukösem Sekret aus Rachen und Luftröhre (Fölsch & Leloup, 1976). Die folgende Isolierung eines Paramyxovirus (*Fer-de-Lance Virus*, FDLV) aus dem Lungengewebe einer toten Fer-de-Lance Viper (*Bothrops atrox*), erfolgte durch Clark et al. (1979). Das FDLV ist das erste bei Reptilien nachgewiesene Paramyxovirus.

Seither konnten zahlreiche Paramyxoviren bei Reptilien nachgewiesen werden (Essbauer & Ahne, 2001). Die Isolate wurden von Schlangen mit neurologischen und respiratorischen Symptomen vorwiegend in Europa und den USA gewonnen (Ahne et al., 1999b).

Die Erforschung von reptilienpathogenen Paramyxoviren (RPMV) ist bisher wenig fortgeschritten. Erst in den letzten Jahren wurden partielle Genanalysen einiger RPMV publiziert (Ahne et al., 1999b, Franke et al., 2001). In der vom *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) erarbeiteten Taxonomie der Viren ist das FDLV als ein Paramyxovirus gelistet, das noch keinem Genus der *Paramyxoviridae* zugeordnet werden konnte (*unassigned Virus*; Lamb et al., 2000).

18 mutmaßliche Paramyxoviren, die mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) identifiziert und von Schlangen in den Jahren 1989 bis 1999 isoliert worden waren (Blahak, unpubl.), wurden in der vorliegenden Arbeit molekularbiologisch untersucht. Mittels Sequenzanalysen sollten die Verwandtschaftsbeziehungen der RPMV untereinander und zu den Paramyxoviren homoiothermer Wirbeltiere ermittelt werden.

Außerdem sollten in dieser Arbeit die Fusions (F) Gen- und Proteinsequenzen eines repräsentativen RPMV, des durch Ahne et al. (1987) charakterisierten Isolates Gono-GER85 einer *Gonosoma oxycephala* Schlange, analysiert werden. Es galt, ein F Proteinmodell für das RPMV zu

---

erstellen und dieses mit anderen viralen F Proteinen (Lamb & Kolakovsky, 2001) zu vergleichen.

Um Einsicht in mögliche antigenetische Eigenschaften des Proteins zu erhalten, sollten Interaktionen mit einem Anti-RPMV Serum untersucht werden. Zu diesem Zweck galt es, das Reptilienvirus F Protein und diverse Untereinheiten zu exprimieren.

Im Gegensatz zu oben genannten Genanalysen sind Proteincharakterisierungen von RPMV bisher nicht beschrieben (Essbauer & Ahne, 2001). Das F Oberflächenprotein der Paramyxoviren ist essentiell für die Infektion, Vermehrung und Ausbreitung der Viren (Zhao et al., 2000; Modrow et al., 2003). In Abhängigkeit von seiner Aminosäuresequenz und dessen Schnittmotiv wird dieses Protein als ein *Virulenzfaktor* angesehen (Peeters et al., 1999; Shengqing et al., 2002; De Leeuw et al., 2003).



---

## **II. Literaturübersicht Paramyxoviren**

### **1. Taxonomie**

Paramyxoviren sind Krankheitserreger bei Mensch, Wild-, Haus- und Zootieren, die schwerwiegende Infektionskrankheiten wie beispielsweise Masern, Mumps, Hundestaupe, Rinderpest und atypische Geflügelpest hervorrufen (Modrow et al., 2003).

Die taxonomische Struktur der Familie *Paramyxoviridae* unterliegt derzeit verschiedenen Überarbeitungen. Nach der neuen ICTV-Taxonomie (ICTV, 2003) gliedert sich die Familie in zwei Subfamilien, die *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae*, mit sieben Genera (Tab. 1).

Als *unassigned* Paramyxoviren (vorläufige Spezies) gelten das reptilienpathogene *Fer-de-Lance Virus* (FDLV), das *Nariva Virus* (Nagetiere) und verschiedene, von Pinguinen isolierte, Viren (Lamb et al., 2000).

In der Taxonomie bisher unberücksichtigt sind weitere, diverse Isolate von poikilothermen Vertebraten. Elektronenoptisch konnten Paramyxovirus-ähnliche Partikel bei Fischen, *Oncorhynchus tshawytscha* (Winton et al., 1985) und Schildkröten (Neumann et al., 1986, Zangger et al., 1991) ermittelt werden. Eine Vielzahl von aus Reptilien isolierten Paramyxoviren wird in Kapitel II.4. beschrieben.

**Tabelle 1: Taxonomie der *Paramyxoviridae***

Taxonomisch gliedern sich die *Paramyxoviridae* in zwei Subfamilien und sieben Genera (ICTV, 2003). Typspezies sind in Fettdruck dargestellt.

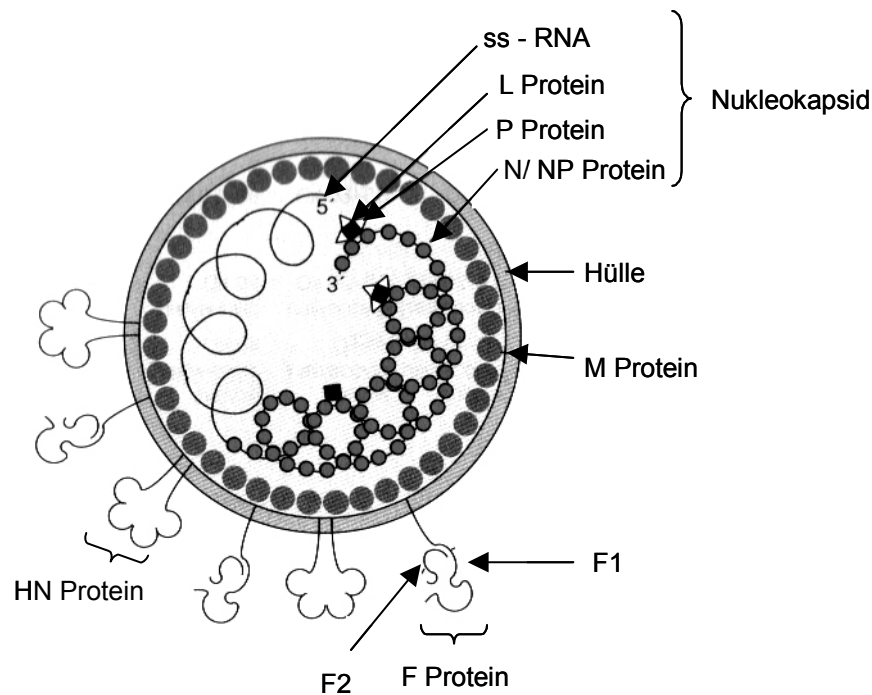
Subfamilie	Genus	Paramyxoviren
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	<b>Sendai Virus</b> <i>humanes Parainfluenzavirus 1</i>
	<i>Morbillivirus</i>	<b>Masern Virus</b> <i>Hundestaubevirus</i> <i>Peste-de-petits-ruminants Virus</i>
	<i>Henipavirus</i>	<b>Hendra Virus</b> <i>Nipah Virus</i>
	<i>Rubulavirus</i>	<b>Mumps Virus</b> <i>Simian Virus 5</i>
	<i>Avulavirus</i>	<b>Newcastle Disease Virus</b>
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	<b>Humanes Respiratorisches Synzytialvirus</b>
	<i>Metapneumovirus</i>	<b>Turkey Rhinotracheitis Virus</b>

In der bestehenden Virustaxonomie nicht etablierte Paramyxoviren

*Fer-de-Lance Virus*  
*Nariva Virus*  
Pinguin Paramyxovirus

**2. Aufbau****2.1. Viruspartikel**

Die Virionen der Paramyxoviren sind von unregelmäßig runder oder filamentöser Morphologie mit einem Durchmesser von etwa 150 bis 350 nm. Sie besitzen eine Membranhülle, deren Innenseite ein virales Matrixprotein (M Protein) auskleidet. Transmembran lokalisiert sind glykosilierte Proteine, die eine Adsorption (HN Protein) und Fusion (F Protein) des Virions an die bzw. mit der Wirtszelle katalysieren. Das Nukleokapsid besteht aus der viralen Ribonukleinsäure (RNA), dem Nukleoprotein (N/ NP Protein), dem Phosphoprotein (P Protein), und der viralen Polymerase (L Protein; Abb. 1; Kap. II.2.3.; Lamb & Kolakovsky, 2001; Modrow et al., 2003).



**Abbildung 1: Modell eines Paramyxovirus (nach Modrow et al., 2003)**

Das virale Genom besteht aus negativ-orientierter Einzelstrang RNA (ss – RNA). Assoziiert sind die virale Polymerase (L, *large*, Protein), das Phospho- (P) und Nukleo-, bzw. Nukleophospho- (N/ NP) Protein und bilden das Nukleokapsid. Die Virushülle wird lumenseitig vom Matrix- (M) Protein ausgekleidet. Transmembran gelegen sind das Hämagglutinin Neuraminidase- (HN) Protein und das Fusions- (F) Protein, die eine Adsorption und Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran katalysieren.

## 2.2. Genom und Genomaufbau

Paramyxoviren besitzen ein nicht-segmentiertes Einzelstrang (*single stranded*) RNA-Genom mit negativer Orientierung (ss – RNA) und gehören daher zu den *Mononegavirales*. Ihre Genome enthalten zwischen 13350 Basen (*Humanes Metapneumovirus*, AF371337) und 18246 Basen (*Nipahvirus*, NC\_002728). Im *Nukleokapsid* liegt das Genom als RNA-Nukleoprotein-Komplex vor (Abb. 1; Kap. II.2.3.) und ist dadurch vor Bruch oder enzymatischem Abbau geschützt. Typisch für Paramyxoviren befinden sich am 3'-Ende des Genoms die *Leader* Sequenz und am 5'-Ende die *Trailer* Sequenz, die transkribiert, aber nicht translatiert werden und ihre Aufgabe in der Steuerung der Genomreplikation erfüllen. Zwischen jedem Gen ist die

Virus-spezifische *Consensussequenz* lokalisiert, die eine präzise Transkription steuert. Das *Masernvirus*-Genom (Genus *Morbillivirus*) beispielsweise umfasst primär sechs Gene (3' N-P-M-F-H-L 5'), die für das Nukleokapsidprotein, das Phosphoprotein, das Matrixprotein, das Fusionsprotein, das Hämagglutininprotein und die virale Polymerase kodieren. Weiterhin befindet sich innerhalb der P Gensequenz ein zweiter Leserahmen, der für ein zusätzliches Protein, *Cellular Protein (C)*, kodiert (Modrow et al., 2003). Diese *open reading frames* (ORF) sind bei bisher allen charakterisierten Paramyxovirus Genomen beschrieben und können bis zu drei weitere Proteine kodieren (Lamb et al., 2000; Lamb & Kolakovsky, 2001; Modrow et al., 2003).

### **2.3. Proteine**

#### **2.3.1. Strukturproteine**

Das transmembrane Zell-Adsorptionsprotein der Paramyxoviren ist das *Hämagglutinin-Neuraminidase* Protein (HN; Abb. 1), das auch als Hämagglutininprotein (H) oder Glykoprotein (G) mit identischer Funktion vorkommt (Modrow et al., 2003). Es katalysiert die Kontaktaufnahme zwischen Virus und Wirtszelle (Lamb & Kolakovsky, 2001). Die Neuraminidase besitzt hohe Sequenzhomologie zur Influenzavirus-Neuraminidase, sie entfernt nach erfolgreicher Adsorption Wirtszell-Rezeptoren (N-Acetyl-Neuraminsäurereste) und verhindert somit eine Reinfektion der gleichen Zelle (Modrow et al., 2003). Das Hämagglutinin trägt seinen Namen aufgrund der erstbeschriebenen Eigenschaft Erythrozyten zu agglutinieren (Rovozzo & Burke, 1973).

Das zweite Transmembranprotein ist das Fusionsprotein (F). Da diese Arbeit z.T. vom F Protein handelt, wird es im anschließenden Kapitel II.2.3.3. ausführlicher dargestellt.

Ihrer Aufgaben entsprechend ragen HN und F Protein nadelförmig bis zu 12 nm über die Virushülle hinaus (Lamb & Kolakovsky, 2001). Sowohl das F Protein, als auch das HN Protein werden während der posttranslationalen Prozessierung in der Wirtszelle glykosyliert (Modrow et al., 2003). Das HN

Protein besitzt vier bis sechs, das F Protein drei bis sechs N-gebundene Zuckerreste, die mit den Wirtszellrezeptoren in Kontakt treten (Lamb & Kolakovsky, 2001).

An der Lumenseite der Hüllmembran ist das nicht-glykosylierte Matrix- (M) Protein lokalisiert (Abb. 1). Es interagiert mit den transmembranen Domänen der Proteine HN und F und auch mit dem Nukleokapsid. Das M Protein ist essentiell für den Vorgang des Virion-Zusammenbaus (Morphogenese), das Abschnüren neuer Partikel (Budding) und bildet die Grundlage der Virusmorphologie (Modrow et al., 2003).

Das Nukleokapsid ist ein Komplex aus dem RNA Genom, dem Nukleokapsid- (N) Protein, dem Phospho- (P) Protein und der viralen Polymerase (L; Abb. 1). Das N Protein ist anteilmäßig am höchsten konzentriert, es interagiert direkt mit der Nukleinsäure und stellt die Verbindung zu den Proteinen P und L her (Modrow et al., 2003). Das L Protein (*large*) ist mit etwa 250 kD das größte Protein, eine RNA-abhängige RNA Polymerase. Die Polymerasen der *Mononegavirales* sind hochkonservierte Proteine mit stark sequenzzhomologen Domänen (Randhawa et al., 1996; Le Mercier et al., 1997).

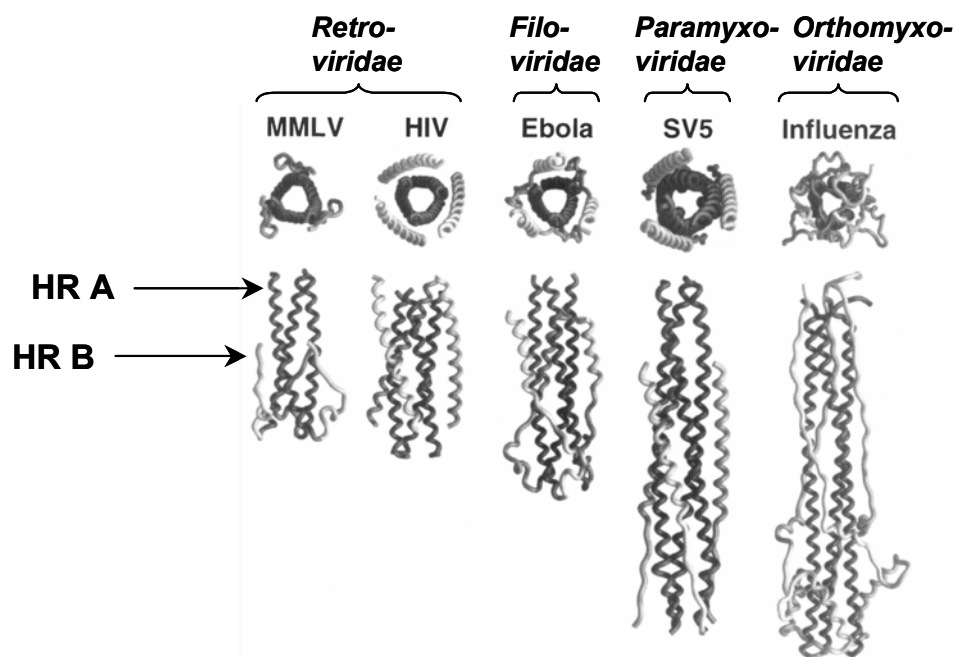
### **2.3.2. Nicht-Strukturproteine**

Nicht-Struktur Proteine sind für die jeweiligen Paramyxovirus Typspezies unterschiedlich (Lamb & Kolakovsky, 2001; Lamb et al., 2000). Ihre Funktion ist nicht oder ungenügend bekannt, aber im Bereich der Transkription und der posttranskriptionellen Modifizierung (RNA Editing) zu suchen. Kodiert werden sie durch offene Leserahmen innerhalb des P Gens oder den gesamten P Gen Leserahmen mit nachfolgendem RNA Editing (Modrow et al., 2003).

### 2.3.3. Fusionsprotein (F Protein)

#### 2.3.3.1. Virale F Proteine

Die Wirtszell-Infektion der Paramyxoviren erfolgt nach der Fusion von Virushülle mit der Wirtszellmembran (Zhao et al., 2000; Lamb & Kolakofsky, 2001). Das F Protein katalysiert diesen Prozess und es kommt bei allen Paramyxoviren vor (Lamb, 1993). Auch behüllte Viren anderer Familien (*Retroviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*) verfügen über derartige Fusionsproteine (Abb. 2; Baker et al., 1999). Gemäß ihrer Aufgabe besitzen sie komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen, die auf verschiedene Proteindomänen zurückzuführen sind (Lamb & Kolakovsky, 2001).



**Abbildung 2: Virale Fusionsproteine (nach Baker et al., 1999)**

Von viralen Fusionsproteinen wurden die für die Gerüststruktur verantwortlichen *Heptad Repeat* Domänen mittels Röntgenstrukturanalyse visualisiert (Baker et al., 1999). Als Beispiele von retroviralen Proteinen sind das Hüll-Transmembranprotein des *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) und das Glykoprotein gp41 des *Humanen Immundefizienz Virus* (HIV) dargestellt. Das *Ebola Virus* besitzt das filovirale Fusionsprotein GP2. Der paramyxovirale Vertreter ist das *Simian Virus 5* (SV5). Das HA2 Transmembranglykoprotein des orthomyxoviralen Influenzavirus ist ausschließlich bei saurem pH Wert funktionell (Fields et al., 2001; Modrow et al., 2003).

### **2.3.3.2. Motive des Paramyxovirus F Proteins**

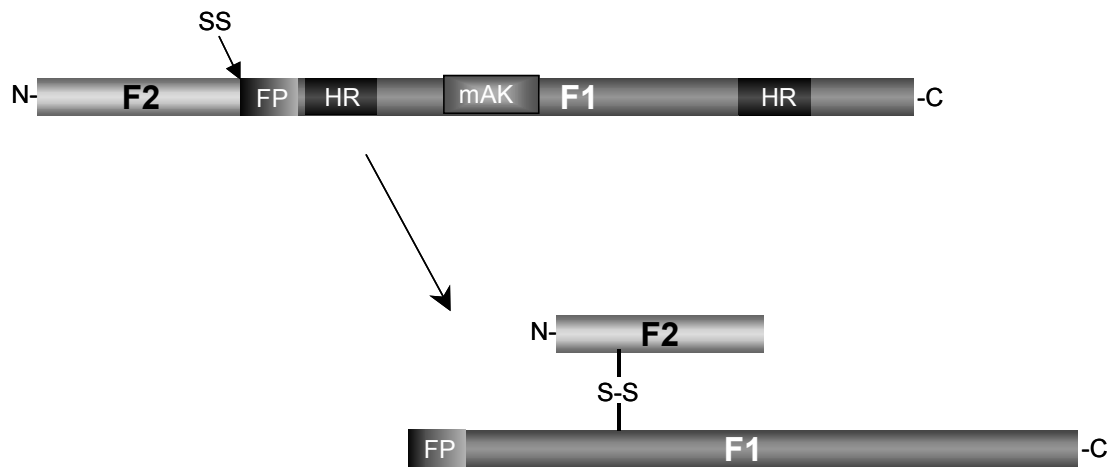
#### **Schnittstelle (SS)**

Das Paramyxovirus F Protein ist ein Typ I Membranprotein und wird posttranslational modifiziert (Klenk et al., 1975). Es erfolgt zunächst die Synthese eines biologisch inaktiven Prä-Proteins mit anschließender Spaltung durch eine Wirtszellprotease (Lamb & Kolakovsky, 2001). Die beiden resultierenden Untereinheiten, F1 und F2, sind durch eine Disulfidbrücke als Heterodimer verbunden (Abb. 3; Scheid & Choppin, 1974).

Das *Sendai Virus* F Protein wird von der *Tryptase Clara*, eine Trypsin-ähnliche Serinprotease gespalten (Tashiro et al., 1999). Diese kommt in sekretorisch aktiven Epithelzellen des Respirationstraktes, in den *Clarazellen*, vor (Kido et al., 1992; Tashiro et al., 1992). Die *Tryptase Clara* schneidet nach einem einzelnen Argininrest an der Schnittstelle des F Glykoproteins und heißt daher *monobasisch*.

Eine von Paramyxoviren weitaus häufiger genutzte Protease ist die Endopeptidase Furin, die ubiquitär in Körpergeweben vorhanden ist (Hatsuzawa et al., 1992). Die Spaltung des F Prä-Proteins erfolgt nach dem Aminosäure Sequenzmotiv R X R/K R und wird daher *multibasisch* genannt (Lamb und Kolakovsky, 2001).

Studien über den Austausch des Schnittmotives, vom Tryptase Clara Motiv zum Furin Motiv, belegen eine Steigerung in der Virulenz von Paramyxoviren (Peeters et al., 1999; Shengqing et al., 2002; de Leeuw et al., 2003).



### Abbildung 3: Schnittprozessierung des F Proteins von Paramyxoviren

Das F Prä-Protein wird durch Proteolyse an der Schnittstelle (SS) in die Untereinheit 1 (F1) und die Untereinheit 2 (F2) gespalten, die über eine Disulfidbrücke (S-S) verbunden bleiben. N-Terminus (N); C-Terminus (C); Es kommt dabei zum Freiwerden des N-terminalen bioaktiven Fusionspeptides (FP; Scheid & Choppin, 1974).

Für das *Humane Respiratorische Synzytialvirus* wurde von Martin-Gallardo et al. (1991) eine antigenetisch reaktive Domäne ermittelt, an die ein monoklonaler Antikörper (mAK) bindet, der sowohl Virus-neutralisierende als auch Fusionsaktivität-inhibierende Eigenschaften besitzt (s. Kap. II.2.3.3.3.).

### Fusionspeptid (FP)

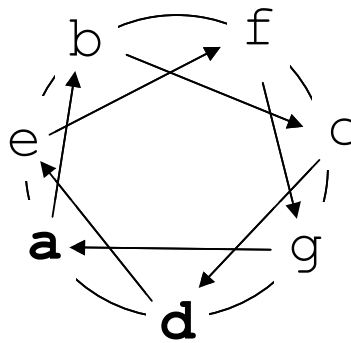
Das Fusionspeptid (FP) schließt direkt an die Schnittstelle an und reicht bis zum Heptad Repeat A des F Proteins. Es wird erst durch die proteolytische Spaltung freigelegt (Abb. 3) und ist im Prä-Protein folglich nicht bioaktiv. Starke Hydrophobizität zeichnet diesen Proteinabschnitt aus (Baker et al., 1999) und verleiht die Eigenschaft Zellmembranen zu penetrieren (Peisajovich & Shai, 2002). Das FP ist ein essentielles Kriterium für die F Proteine und ist in seiner Sequenz hochkonserviert. Die dennoch existierenden einzelnen Aminosäuren-Unterschiede zwischen den verschiedenen Genera stellen jedoch meist ähnliche, funktionell identische, Aminosäuren dar (Lamb & Kolakovsky, 2001).



### Heptad Repeats (HR)

Röntgenstrukturanalysen ergaben, dass das F Protein haarnadelförmig aus der Virushülle ragt (Baker et al., 1999; Lamb & Kolakovsky, 2001). Dies ist auf zwei Heptad Repeat Strukturen (HR) zurückzuführen, die über einen linearen Proteinabschnitt verbunden sind und die sog. *Helix-Loop-Helix* Formation bilden (Abb. 2; Sechoy et al., 1987; Zhao et al., 2000).

Ein einzelnes *Heptad* Motiv besteht aus sieben Aminosäuren, in der Abbildung 4 mit a, b, c, d, e, f und g bezeichnet. Die Positionen a und d sind durch hydrophobe oder polare Aminosäurenreste besetzt, die molekulare Wechselwirkungen aufeinander auswirken. Hierdurch faltet sich der Bereich des HR selbständig zu einer alpha-Helix. Das Heptad wiederholt sich (*Repeat*) vier bis sieben Mal und entspricht je 1,9 Windungen der alpha-Helix (Stryer et al., 1995). HR Motive formen sich nicht nur selbständig zur alpha-Helix, sie veranlassen das Protein auch zur Oligomer-Formation. Beim *Simian Virus 5* lagern sich z.B. drei Heterodimere als Homotrimer aneinander (Baker et al., 1999), beim *Masern Virus* sind es vier als Tetramer (Buckland et al., 1992). Diese Helix Bündel unterliegen einer essentiellen Konformationsänderung der Tertiärstruktur während des Fusionsprozesses (Peisajovich & Shai, 2002). Das Protein ist als Oligomer extrem thermostabil (Dutch et al., 2001).



**Abbildung 4: Modell des Heptad Repeats im helikalen Rad (Joshi et al., 1998)**

Das Modell des helikalen Rades eines Heptad Repeats entspricht einem Querschnitt durch die alpha-Helix von 1,9 Windungen. Diese werden durch ein Heptad Motiv (a–g) repräsentiert. An Position a und d sind hydrophobe oder polare Aminosäuren lokalisiert, die das Protein durch starke molekulare Wechselwirkung zur Selbstfaltung in eine Helix veranlassen (Chambers et al., 1990).

Leuzin Zipper (LZ)

Charakteristisch für den Leuzin Zipper (LZ) ist die Aminosäure Leuzin oder Isoleuzin an Position a des Heptad Repeats (Buckland et al., 1992). LZ-Proteine sind auch als DNA bindende Proteine, aus dem Bereich der Transkriptionsfaktoren für die Gewebe-spezifische, induzierbare Genexpression bekannt. Sie dienen aufgrund ihrer starken wechselseitigen Anziehungskraft der temporären Assoziation von Proteinabschnitten in der frühen Phase der Genexpression (Stryer et al., 1995). Es wird angenommen, dass der LZ im Paramyxovirus F Protein für die Proteinoligomerisierung verantwortlich ist. Die Leuzinreste sind essentiell für die Fusionsaktivität des Proteins (Buckland et al., 1992; Reitter et al., 1995).

Transmembrananker (TM)

Das F Protein der Paramyxovirus Typspezies ist mittels einer hydrophoben Domäne, dem Transmembrananker (TM) in der Virushülle fixiert (Lamb und Kolakovsky, 2001). Dieser ist sie nahe einer HR Struktur, am C-Terminus des Proteins positioniert (Peisajovich & Shai, 2002). Das lumenseitige Ende des TM interagiert mit der M Protein-Matrix (Modrow et al., 2003).

### **2.3.3.3. Antigenetische Eigenschaften des F Proteins**

Das F Protein hat aufgrund seines transmembranen Charakters eine exponierte Position an der Oberfläche des Virions (Lamb & Kolakovsky, 2001). Monoklonale Antikörper (mAK) gegen das F Protein des *Respiratorischen Synzytialvirus* (RSV) konnten sowohl die Fusionsaktivität, als auch die Infektiosität des Virus neutralisieren (Walsh & Hruska, 1983; Walsh et al., 1985). Mäuse, die mittels neutralisierendem mAK gegen das F Protein des RSV passiv immunisiert worden sind, hatten nach dem Challenge keinen oder einen wesentlich geringeren Virustiter als die nicht-immunisierten Kontrolltiere (Walsh et al., 1984). Die aktive Immunisierung von Mäusen gegen ein F Protein kodierendes Vaccinia-Virus schützte vor der Infektion mit dem RSV (Olmsted et al., 1986).

In biologischen Essays mit mAK konnten vier antigenetisch bedeutende Epitope des *humanen Respiratorischen Synzytialvirus* (HRSV) F Proteins, davon drei mit Virus-neutralisierender Eigenschaft, ermittelt werden (Trudel et al., 1987). In einer von Martin-Gallardo et al. (1991) durchgeführten Studie wurde das F Gen des HRSV prokaryotisch exprimiert. Eine antigenetisch reaktive Domäne konnte mittels eines mAK determiniert werden, der sowohl Virus-neutralisierende, als auch Fusionsaktivität-inhibierende Eigenschaften besaß (Abb. 3).

## **3. Virusreplikation**

Paramyxoviren adsorbieren mittels ihres HN Proteins (bzw. H oder G Protein; Kap. II.2.3.1.) an einen Rezeptor der Wirtszelle. Durch diesen Vorgang wird das F Protein der Membran angenähert und kann die Fusion der Virushülle mit der Wirtszelle einleiten. Im Verlauf der Adsorption und der Fusion findet eine Veränderung der Zelloberfläche statt, die eine Reinfektion

der gleichen Zelle verhindert. Dieser Vorgang ist beispielsweise von Influenzaviren bekannt (Modrow et al., 2003).

Das Nukleokapsid gelangt in das Zytoplasma, die Replikation der Paramyxoviren erfolgt ausschließlich dort. Seine ss – RNA wird von der eigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (L Protein) transkribiert. Der Polymerasekomplex bleibt hierbei mit dem viralen Genom assoziiert und beginnt mit der Transkription komplementärer *messenger* RNA (mRNA) an der 3'-*Leader* Region des Genoms und endet am 5'-Ende, dem *Trailer* (Kapitel II.2.2.). Die Gene, durch *Consensussequenzen* voneinander getrennt, werden in der 3'-5' Reihenfolge des Genoms abgelesen (N-P-M-F-H-L; Kap. II.2.2.). Die Transkription wird oftmals, dennoch nicht komplett wiederholt. Es resultiert ein mRNA Gradient, mit einer höchsten Konzentration für N Transkripte und einer geringsten Konzentration für L Transkripte. Entsprechend dieser Reihenfolge wird auch mehr bzw. weniger Protein benötigt wird.

Das gesamte Genom muss für die Virusreplikation ohne Unterbrechung transkribiert werden. Dies wird durch die steigende Konzentration vorhandener N Proteine gewährleistet, die mit der viralen RNA interagieren. Diese Regulation wird *Antitermination* genannt. Das Genom liegt als Antigenom in Positiv-Orientierung vor. Steigende Konzentration und Wechselwirkungen zwischen den N, P und L Proteinen veranlassen die Polymerase den Positivstrang abzulesen und das virale ss – RNA Genom zu amplifizieren.

Die Transmembranproteine HN (bzw. H oder G; Kap. II.2.3.1.) und F werden am Golgiapparat mit zelleigenen Enzymen modifiziert und zur Zelloberfläche transportiert (Modrow et al., 2003). Bei diesem Vorgang kommt es häufig zur Fusion mit einer benachbarten Zelle. Lichtmikroskopisch ist dieses Phänomen als Syncytium sichtbar, ein Merkmal, das als typischer cytopathischer Effekt (cpE) von Paramyxoviren oft gezeigt wird (Abb. 12B; Mayr et al., 2000).

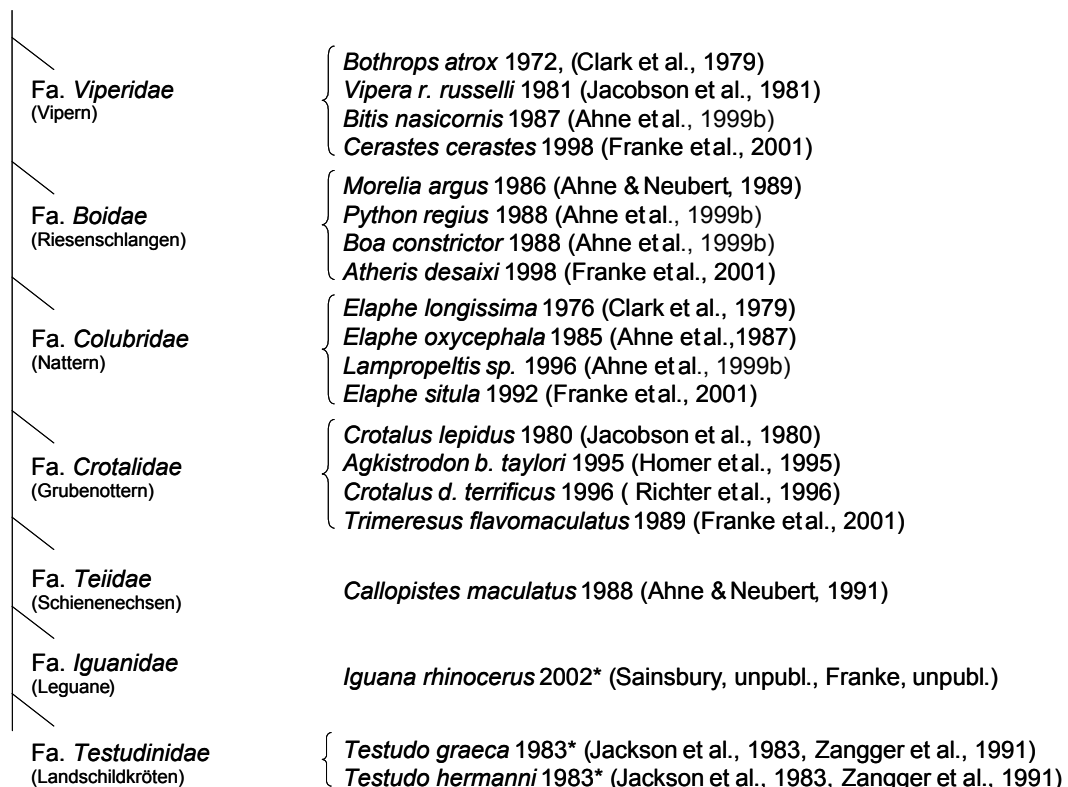
M Proteine bilden die Matrixproteinschicht an der Innenseite der Zellmembran, interagieren mit den Transmembranproteinen und auch dem

entstehenden Nukleokapsid (Kap. II.2.3.1.). Die Zellmembran stülpt sich aus und neue infektiöse Virionen werden abgeschnürt (Modrow et al., 2003).

#### **4. Reptilienpathogene Paramyxoviren (RPMV)**

Wie in der Einleitung dargestellt, stammt das erste aus Reptilien isolierte Paramyxovirus, das *Fer-de-Lance Virus* (FDLV), aus einem 1972 erfolgten Infektionsausbruch in einem Schweizer Serpentarium (Fölsch & Leloup, 1976). Seither wurden in Europa und den USA zahlreiche aus Reptilien isolierte Paramyxoviren, im Folgenden *Reptilien Paramyxoviren* (RPMV) genannt, beschrieben (Jacobson et al., 1981; Jackson et al., 1983; Ahne & Neubert, 1989; Zangger et al., 1991; Homer et al., 1995; Richter et al., 1996; Ahne et al., 1999; Essbauer & Ahne, 2001; Franke et al., 2001). In Abbildung 5 sind exemplarisch einige RPMV mit ihren Wirten dargestellt.

Ein Unterscheidungskriterium der RPMV gegenüber den klassifizierten Paramyxoviren der Säugetiere und Vögel ist die Adaptation an Körpertemperaturen der poikilothermen Wirte. Viren der wechselwarmen Reptilien vermehren sich optimal zwischen 25°C und 30°C (Clark et al., 1979; Ahne et al., 1999a).

**KI. Reptilia****Abbildung 5: Reptilien als Wirte für Paramyxoviren (RPMV)**

Die zoologische Systematik gliedert die Klasse der Reptilien (KI.) verschiedene Familien (Fa.; nach Grzimek et al., 2000). Rechts in der Abbildung stehen die Spezies von denen RPMV im genannten Jahr isoliert und *in vitro* kultiviert wurden. Bei drei Spezies wurden Antikörper gegen RPMV mittels des Serumneutralisationstest ermittelt (\*).

Antigenetische Untersuchungen, sowohl mittels des Serumneutralisationstests, als auch mittels des Virusneutralisationstests, ergaben keine Kreuzreaktion zwischen dem FDLV und dem *Sendai Virus* (Genus *Respirovirus*), dem *Simian Virus 5*, dem *Newcastle Disease Virus* und dem *Mumps Virus* (Genus *Rubulavirus*), dem *Masern Virus*, dem *Rinderpest Virus* und dem *Hundestaube Virus* (Genus *Morbillivirus*), dem *Respiratorischen Syncytialvirus* (Genus *Pneumovirus*) und verschiedenen Influenzaviren (Clark et al., 1979).

---

In einer von Ahne & Neubert (1989) publizierten Arbeit wurde von drei RPMV gezeigt, dass sie untereinander sowohl im Western Blot (WB), als auch in der Virus- und Serumneutralisation kreuz-reagierten. In der WB-Methode interagierten diese jedoch nicht mit Antiseren gegen das *Sendai Virus*, das *Masern Virus*, das *Mumps Virus* und das *humane Respiratorische Syncytial Virus*.

Im Gegensatz zu Clark et al. (1979) befand Blahak et al. (1995) positive Kreuzreaktionen zwischen RPMV und aviären Paramyxoviren im Hämagglutinations-Hemmungstest.

Das FDLV-Genoms wurde kürzlich komplett sequenziert (Kurath et al., 2003). Das Genom, das 15378 Basen umfasst, beinhaltet das N Gen, ein bisher nicht bekanntes U Gen (*unknown*), das P Gen mit drei möglichen Leserahmen, das M Gen, das F Gen, das HN Gen und das L Gen. Das U Gen wurde auch im Genom des RPMV Gono-GER85 gefunden. Die Consensussequenz des FDLV ist paramyxovirus-typisch, weist aber spezifische Unterschiede auf.

### **III. Material und Methoden**

#### **1. Identifizierung von Reptilien Paramyxoviren (RPMV)**

##### **Virusmaterial und Zellkultur**

Im Zeitraum von 10 Jahren, 1989 bis 1999, waren 18 Viren von verschiedenen Schlangen in Deutschland isoliert worden (Tab. 2). Mittels des Hämagglutinations-Hemmungstests waren alle Isolate als Paramyxoviren befunden worden (Blahak, unpubl.). Sowohl diese 18 Isolate, als auch ein Referenzvirus, das charakterisierte RPMV Gono-GER85 (Ahne et al., 1987) wurden in Iguana-Herz-Zellen (IgH<sub>2</sub>; ATCC CL-108) und *African Green Monkey*-Zellen (Vero; ATCC CL-81) vermehrt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 28°C mit Minimum Essential Medium (MEM; Seromed, Berlin) und einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) in Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg). Die Zellen wurden im wöchentlichen Rhythmus mit einer Trypsin-Endkonzentration von 0,25 % (Gibco-BRL, Karlsruhe) abgelöst und im Verhältnis 1 zu 2 geteilt (Rovozzo & Burke, 1973).

Zur jeweiligen Virusvermehrung wurde 24 Stunden (h) nach der Zelleinsaat der Zellrasen mit einer Dosis von 100 TCID<sub>50</sub>/ ml (*tissue culture infectious dose*) nach der Adsorptionsmethode beimpft und bei 28°C inkubiert. Nach einstündiger Adsorption wurden die infizierten Zellkulturen gewaschen, mit Erhaltungsmedium (MEM und 2% FKS) beschickt und bei 28°C inkubiert.

Nachdem lichtmikroskopisch Synzytien und Zelllyse sichtbar waren, erfolgte die Virusernte etwa sieben Tage nach der Infektion (p.i.). Durch Gefriertauen (-20°C) und Abzentrifugieren der Zellreste bei 3000 x g für 10 min wurde die infektiöse Zellkulturflüssigkeit abgenommen und bei -80°C tiefgefroren. Der Virus-Titer (TCID<sub>50</sub>) wurde mittels Endpunktverdünnungsmethode bestimmt (Rovozzo & Burke, 1973).



**Tabelle 2: Untersuchte Reptilien Paramyxoviren**

Die Referenzviren, FDLV und Gono-GER85, und 18 Isolate wurden in dieser Arbeit untersucht. Es sind die Wirtsspezies, aus denen die Viren isoliert wurden, das Jahr der Isolierung und die Bezeichnung der Viren dargestellt. Vom Isolat der *Bothrops atrox*, 1972, FDLV, wurde ausschließlich ein Teil der Gensequenz verwendet (Kurath et al., 2003). Die Isolate innerhalb eines Kästchens stammen von einem Infektionsausbruch in einem Schlangenbestand.

	Wirtsspezies	Jahr	Virus
<b>Referenzviren</b>	<i>Bothrops atrox</i>	1972	FDLV
	<i>Elaphe oxycephala</i>	1985	Gono-GER85
<b>Isolate</b>	<i>Crotalus cerastes</i>	1996	CrotCe-96
	<i>Atheris squamigera</i>	1996	AtheSq-96
	<i>Crotalus</i> sp.	1996	CrotX2-96
	<i>Crotalus enyo</i>	1996	CrotEn-96
	<i>Elaphe guttata</i>	1991	ElaGut-91
	<i>Crotalus</i> sp.	1996	CrotX1-96
	<i>Trimeresurus flavomaculatus</i>	1989	TrimFI-89
	<i>Pituophis melanoleucus</i>	1989	PituMe-89
	<i>Lampropeltis mexicana</i>	1989	LampMe-89
	<i>Vipera palaestinae</i>	1989	VipPal-89
	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	1989	AgkiBi-89
	<i>Elaphe situla</i>	1992	ElaSit-92
	<i>Bitis nasicornis</i>	1996	BitisN-96
	<i>Cerastes cerastes</i>	1998	CeraCe-98
	<i>Bitis caudalis</i>	1998	BitisC-98
	<i>Atheris squamigera</i>	1998	AtheDe-98
	<i>Crotalus durissus</i>	1998	CrotDu-98
	<i>Crotalus durissus</i>	1999	CrotDu-99

### Elektronenmikroskopie

Die Viruspartikel im infektiösen Überstand (250 ml) wurden für die Elektronenmikroskopie (*Zeiss EM 109*) bei 100000 x g und 4°C für 2 h pelletiert (*Beckmann Ultrazentrifuge L8-70*, Beckmann, München) und das Pellet in TNE Puffer (Sambrook et al., 1989) resuspendiert. Für die Kontrastierung, wurden die Viruspartikel nach dem *negative staining*-Verfahren für 10 sek in 2 %iger Phosphorwolframsäure (pH 7,2) inkubiert (Brenner & Horne, 1959).

### Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Da das Genom der Paramyxoviren als Negativstrang-RNA vorliegt, musste vor der Polymerase Kettenreaktion (PCR) eine reverse Transkription (RT) der RNA erfolgen. Zur Steigerung der Sensitivität, der Quantität und der Spezifität wurde hier nach der ersten RT-PCR eine weitere PCR Runde (*nested* PCR, bzw. *semi-nested* PCR) durchgeführt (Pfeffer et al., 1997).

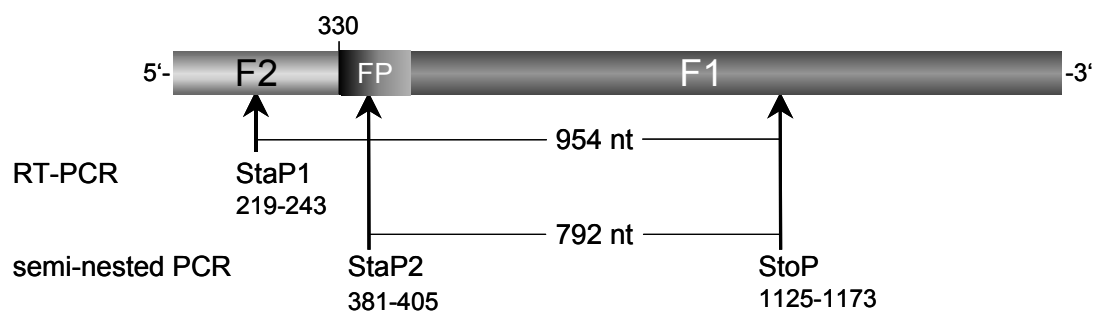
#### L Gen spezifische RT-PCR

Wie von Ahne et al. (1999b) beschrieben, wurde in der RT-PCR ein 626 Basenpaare (bp) großes L Gen Fragment (Position im Genom Nukleotid (nt) 9618 bis nt 10244) und in einer anschließenden *nested* PCR ein 566 bp großes Unterfragment (nt 9661 bis nt 10226) amplifiziert.

#### F Gen spezifische RT-PCR

Für das partielle F Gen musste eine *semi-nested* RT-PCR entwickelt und etabliert werden (Abb. 6). Die RT-PCR umfasste ein 954 bp langes Fragment des FDLV F Gen (nt 219 bis nt 1173), das die Schnittstelle des Fusionsproteins (nt 330) sowie das Fusionspeptid (nt 330 bis nt 408) beinhaltet. Der *semi-nested* Primer entsprach der nt-Sequenz des hochkonservierten Fusionspeptides und umfasste mit dem Stopprimer ein 792 bp großes Fragment im FDLV Genom (nt 381 bis nt 1173; Abb. 6).

Die Konstruktion von Primern erfolgte in Anlehnung an die F Gen Sequenzen des *Sendai Virus* (M30202) des *Humanen Parainfluenzavirus 1* (M22347) und des FDLV (AY141760). Es wurde zunächst ein Alignment auf Aminosäure- (as-) Ebene durchgeführt. Konservierte Bereiche wurden daraufhin auf Nukleotid- (nt-) Ebene aligned (Abb. 7).



### Abbildung 6: Überblick der F Gen spezifischen semi-nested RT-PCR

Das Modell des FDLV F Gens zeigt die F2 und F1 Untereinheit, sowie die Schnittstelle (nt 330) und das zur F1 Untereinheit gehörenden Fusionspeptid (FP). Durch Pfeil markiert sind die Bindungsstellen der Primer. In der RT-PCR bindet Startprimer 1 (StaP1) an nt 219 – nt 243 und der Stopprimer (StoP) an nt 1125 – nt 1173. In der semi-nested PCR bindet Startprimer 2 (StaP2) an nt 381 - nt 405.

as-Sequenz		S/A	A	Q	I	T	A	G	I	A	L	
Sendai V	405	TCAGCACAAATC	ACCGCAGGGATTG	CACTA								435
HPIV	380	GCTGCCCAGATA	ACTGCAGGCATTG	CATTA								410
FDLV	378	TCTGCACAGATA	ACAGCGGGGATTG	CTCTC								408
		*	**	**	**	**	**	**	**	**	*	
Primer		GCACAGATACANGCGGGGATTGC										

### Abbildung 7: Design eines F Gen spezifischen Primers

Am Beispiel des F Gen spezifischen Startprimers (StaP2, Abb. 6) ist das Alignment der F Gen Sequenzen des *Sendai Virus* (Sendai V), des *Humanen Parainfluenzavirus-1* (HPIV), des *Fer-de-Lance Virus* (FDLV) mit entsprechender Proteinsequenz und die Sequenzwahl des Primers dargestellt. Triplets sind durch das Raster getrennt. Im Primerbereich sind die ersten beiden nt von dreien identisch. Der erstellte Primer enthält ein variables nt (N; IUPAC-IUB, 1968).

### Isolierung viraler RNA

Das Negativstrang-RNA Genom der RPMV diene als Matrize für die RT-PCR. Die RNA wurde aus einem Aliquot von 800 µl zellfrei zentrifugierter Virussuspension, bei einem durchschnittlichen Titer von  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ ml gewonnen. Die Extraktion erfolgte mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers, das Elutionsvolumen betrug 30 µl. Als

Negativ-Kontrolle für die RT-PCR wurde Extrakt aus nicht-infizierter Zellkultur verwendet.

### RT-PCR

Das 50 µl Gesamtvolumen für die RT-PCR enthielt 5 µl RNA Extraktionsprodukt, je 10 pmol des Start- und des Stop-Primers (MWG Biotech, Karlsruhe), 200 µmol Desoxyribonukleotide (MWG Biotech, Karlsruhe), 10 µl 10x PCR Puffer (Promega, Mannheim), 50 µM Dithiothreitol (Promega, Mannheim), 1 Unit RNasin (Promega, Mannheim), 2,5 Units AmpliTaq DNA Polymerase (Promega, Mannheim) und 1 Unit Reverse Transkriptase (RAV-2; Amersham, Braunschweig; modifiziert nach Pfeffer et al., 1997). Die RT-PCR wurde im Thermocycler (Minicycler, Biozym, Wien) mit dem in Tabelle 3 genannten Programm durchgeführt.

**Tabelle 3: RT-PCR Temperaturprogramm**

Programm für die F Gen spezifische RT-PCR der RPMV.

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit min:sek</b>	<b>Zyklen</b>
Reverse Transkription	45 °C	30:00	
Denaturieren	94 °C	02:00	
Denaturieren	94 °C	00:30	30x
Primer Anlagern	50 °C	00:30	
Vervollständigen	72 °C	01:00	
Vervollständigen	72 °C	07:00	
Konservieren	4 °C	24 h	

### Nested, semi-nested PCR

Die Durchführung der nested, bzw. semi-nested PCR der L und F Gene erfolgte mit dem unter *RT-PCR* beschriebenen Reaktionsansatz, respektive ohne dem Enzym Reverse Transkriptase und mit nested bzw.

semi-nested Primern. Als Matrize dienten 2 µl des RT-PCR Produktes. Das PCR Temperaturprogramm wurde ohne Reverse Transkription durchgeführt, die Temperatur für das Primer Anlagern wurde von 50°C auf 55°C erhöht.

#### Agarosegelelektrophorese und Sequenzieren der PCR Amplifikate

Die PCR Amplifikate wurden mittels Elektrophorese in einem 1,3 %igen Agarosegel in 1 x TAE Puffer bei 110 V für 90 min aufgetrennt (Sambrook et al., 1989). Als DNA Standard wurde 1 µg einer 100 bp Leiter (Promega, Mannheim) aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte nach Färben mit 0,01 %igem Ethidiumbromid durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Das Sequenzieren (GATC Biotech AG, Konstanz) der RT-PCR Amplifikate erfolgte mit den RT-PCR Primern nach Aufreinigung der Amplifikate mittels *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden).

#### Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzdaten, 18 partielle L Gen Sequenzen und 16 partielle F Gen Sequenzen, wurden mittels des Computerprogramms *Chromas* (Version 1.45, Technelysium Pty Ltd., 1999) editiert. Anschließend erfolgte das Alignment (Clustal V; <http://clustalw.genome.ad.jp/>) und die Berechnung der prozentualen Divergenz (Higgins et al., 1994). Weiterhin wurden die analogen Gensequenzen der Paramyxovirus Typspezies und des FDLV aligned und deren prozentuale Divergenz berechnet (Thompson et al., 1994).

## **2. Phylogenetische Analyse**

In einer Computeranalyse sollte, unter Verwendung der partiellen L Gen und F Gen Sequenzen der untersuchten Isolate und der Paramyxovirus Typspezies die Einordnung der RPMV in die Taxonomie der Familie *Paramyxoviridae* erfolgen (Tab. 4).

### PHYLIP Sequenzberechnung

Die phylogenetische Sequenzberechnung fand mittels des Computerprogramms PHYLIP (Phylogeny Interference Package, Version 3.5c) statt (Felsenstein, 1993). Das Programm besteht aus mehreren Teilprogrammen.

Zunächst wurden die Sequenzen unter Angabe von Anzahl der Sequenzen und Sequenzlänge mit dem Teilprogramm *Seqboot* formatiert und die Virusbezeichnung (Tab. 2) vor jeder Sequenz angegeben.

Die Programme *DNA Pars* für nt-Sequenzen, bzw. *Prot Pars* für Aminosäures- (as-) Sequenzen, verglichen jede Sequenz mit jeder anderen Sequenz 100 Mal, diese Häufigkeit heißt *100 bootstrap value*. Beide Programme rechneten mit IUB *ambiguity codes* (International Union of Biochemistry), das sind definierte Abkürzungen für Oligonukleotid-Formationen (IUPAC-IUB, 1968). Die Sequenzinformation wurde auf diese Weise reduziert, die Ausführung geschah mit maximaler Sparsamkeit, *maximum parsimony*.

Das resultierende *Outfile* wurde in das Teilprogramm *Drawtree* eingegeben. Dieses Programm stellte die berechneten Ergebnisse grafisch als Stammbaum dar.

**Tabelle 4: Repräsentanten der vier phylogenetischen Analysen**

Es sind die Viren und Isolate dargestellt, deren Sequenzen für die phylogenetische Analyse mittels des PHYLIP Programms berechnet wurden. Virus (V), *Humanes Respiratorisches Syncytial Virus* (HRSV). Die Abkürzungen der RPMV sind in Tabelle 2 erläutert. In der derzeitigen Taxonomie sind die RPMV\* nicht eingeordnet.

Genus	Bezeichnung des Stammbaumes				Genbank - Nummer
	L Gen RPMV	F Gen RPMV	L Gen Genera	F Gen Genera	
Respirovirus	Sendai V	Sendai V	Sendai V	Sendai V	M30202
Morbillivirus			Masern V	Masern V	E04903
Rubulavirus			Mumps V	Mumps V	AF143383
Henipavirus			Hendra V	Hendra V	AF017149
Pneumovirus			HRSV	HRSV	HRU27298
RPMV*	FDLV	FDLV	FDLV	FDLV	AY141760
	Gono-GER85	Gono-GER85			AF349404
	CrotCe-96	CrotCe-96			AF349411
	ElaGut-91	--			AF349408
	CrotX1-96	--			AF349405
	TrimFI-89	TrimFI-89			AF349409
	PituMe-89	PituMe-89			AF349406
	ElaSit-92	ElaSit-92			AF349410
	BitisN-96	BitisN-96			AF349407
	CeraCe-98	CeraCe-98			AF351137

### 3. Fusionsgen Analyse des RPMV Gono-GER85

#### Sequenzanalyse des RPMV Fusionsgens (F Gen)

Mittels RT-PCR sollte die F Gensequenz des RPMV Gono-GER85 in seiner gesamten Länge amplifiziert werden. Die Konstruktion spezifischer Primer fand in Anlehnung an die F Gene des *Peste-de-petits-ruminants Virus* (Z37017; 1638 Basen), des *Sendai Virus* (M30202; 1698 Basen) und des FDLV (AY141760; 1695 Basen) statt. Der Proteinsequenz-Start des *Peste-de-petits-ruminants Virus* war homolog zum Start des FDLV.

Für die F Gen spezifische RT-PCR des RPMV Gono-GER85 wurden geeignete Primersequenzen durch das Alignment auf nt-Sequenzebene erhalten. Der Startprimer (FSta: TGA CTA GGA TAA CTA TCC TTC) wurde in

5'-3'-Richtung komplementär, der Stopprimer (FSto: TTA TTT TAT AAA GCC TAG ATT) wurde in 5'-3'-Richtung revers komplementär zu den viralen Genomen gewählt.

#### RT-PCR und Sequenzanalyse

Die RT-PCR erfolgte wie in Kapitel III.1. dargestellt. Das PCR Produkt wurde sequenziert (GATC, Konstanz), nach dem Editieren mittels Computerprogramm *ExPASy-Translate tool* (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://us.expasy.org/tools/dna.html>, Schweiz) in die aa-Sequenz übersetzt und diese auf Paramyxovirus F Protein Motive hin untersucht.

#### Transmembrandomänen

Die Prädiktion von Transmembrandomänen (Moller et al., 2001), wie das Signalpeptid (Nielsen et al., 1997) und hydrophobe Regionen (Kyte & Doolittle, 1982) der F Proteinsequenz erfolgte mittels den Computerprogrammen *SignalP V2.0 Vers. b2* und *TMHMM Server vers. 2.0* (Center for Biological Sequence Analysis, <http://www.cbs.dtu.dk/>, Dänemark).

#### Protease Schnittstelle des F Prä-Proteins

Die RPMV F Protein aa-Sequenz wurde auf die Schnittmotive der Paramyxovirus Typspezies hin geprüft (Lamb und Kolakovsky, 2001).

#### Heptad Repeat und Leuzin Zipper Motive

Das Computerprogramm *Mac Vector* (International Biotechnologies, New Haven, USA) ermittelte Heptad Repeat (HR) Strukturen, das Computerprogramm *2ZIP* (Max Planck Institut für molekulare Genetik, <http://2zip.molgen.mpg.de/>) identifizierte Leuzin Zipper Motive (Bornberg-Bauer et al., 1998).



### Glykosylierung

Eine Angabe über N-glycosylierte Aminosäuren (Hansen et al., 1995) erstellte das Computerprogramm *NetNGlyc 1.0* (Center for Biological Sequence Analysis, <http://www.cbs.dtu.dk/>, Dänemark; Gupta et al., 2002).

### Kodon Zusammensetzung

Die prozentuale Kodon Zusammensetzung (KZ) im RPMV F Gen Leserahmen wurde durch das Sequenzbearbeitungsprogramm *Mac Vector* (International Biotechnologies, New Haven, USA) ermittelt, die KZ für *E. coli* (bct11865) aus der *Codon Usage Database* (Genbank Release 131.0, <http://www.kazusa.or.jp/codon/>) entnommen.

## **4. Klonierung des F Gens für die prokaryotische Expression**

### **4.1. Expressionssystem**

#### Expressionsvektor

Zur prokaryotischen Expression wurde der Expressionsvektor pET-30a(+) (Novagen, Madison, USA) verwendet. Der Vektor trägt zur Vermehrung im Prokaryonten den *Origin of Replication* (Ori) und, weil das Expressionssystem über das *lac-Regulationssystem* verfügt, das *lac-Repressor* Gen (lacR; Abb. 8). Als Selektionsmarker trägt der Vektor das Kanamycin Resistenzgen (Kan). Für seinen eigentlichen Zweck, der prokaryotischen Expression von Insert-DNA, enthält der Vektor als Transkriptionsinitiator den T7 Promotor (T7P). Die Transkription beginnt am anschließenden Startkodon (AUG). Ihm folgt die *multiple cloning site* (MCS), die von beiden Seiten mit der Kodierung für je ein His-Tag umgeben wird. Beendet wird die Translation durch den T7 Terminator (T7T; Novagen, 2002).

Ein His-Tag besteht aus fünf Histidinmolekülen und ist im rekombinanten Protein an beiden Enden, sowohl am C-, als auch am N-

Terminus gelegen. Es dient zum einen der Detektion im Western Blot (WB) mittels Anti-His spezifischem Antikörper und zum anderen der Proteinaufreinigung.

Eine Vektor-spezifische PCR amplifiziert den Bereich zwischen dem T7 Promotor und dem T7 Terminator (Abb. 8, T7P - T7T; Novagen, 2002). Diese PCR dient nach der Amplifikat-Sequenzanalyse der Kontrolle des Leserahmens und der Vollständigkeit der Insert-DNA.

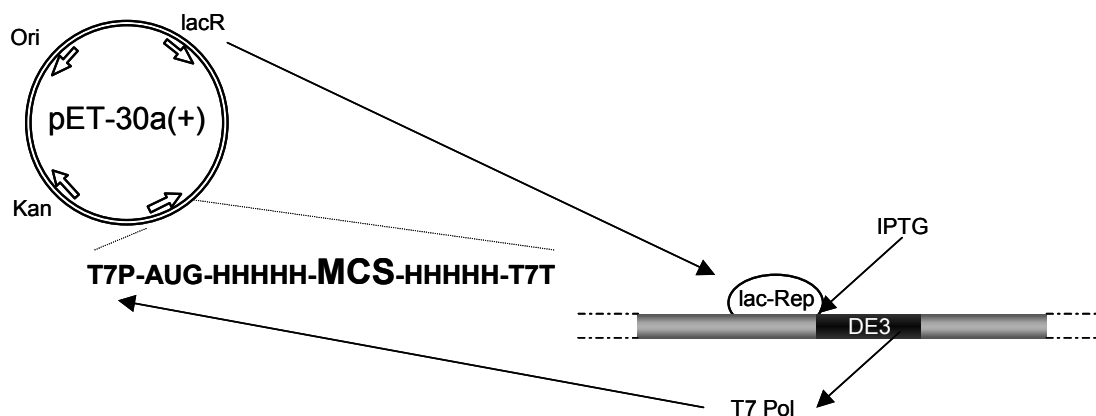
### *E. coli* Stämme

Zur Vektorvermehrung wurde der *E. coli* Stamm *NovaBlue* (Novagen, Madison, USA) verwendet. Dieses *E. coli* K12 Derivat ist eine *recA*<sup>-</sup> *endA*<sup>-</sup> Mutante (Novagen, 2002). Die Abkürzung *recA* steht für ein rekombinantes Protein, dessen Gen mit dem transformierten Insert konkurrieren kann. Die *recA*<sup>-</sup> Mutation sichert folglich die Insert-Stabilität. Zudem ist das Bakterium ohne das *recA* Gen sensitiver gegenüber UV-Licht und daher leichter zu inaktivieren (Stratagene, 2002). Die Abkürzung *endA*<sup>-</sup> steht für den Verlust der Kodierung für die *DNA spezifische Endonuklease*. Dieses bakterieneigene Enzym zerstört bakterienfremde DNA, wie beispielsweise das transformierte Plasmid.

Um einen geeigneten Stamm für die Proteinexpression auszuwählen, wurden die im FDLV F Gen verwendeten Kodons mit denen aus *E. coli* verglichen (Kap. III.3.). Da die Konstellation von den im *E. coli* verfügbaren t-RNAs erheblich abwich (Kap. IV.4.1.), wurde für die Protein Expression der *E. coli* Stamm *Rosetta(DE3)* (Novagen, Madison, USA) verwendet.

Dieser Stamm verfügt über ein zusätzliches Plasmid. Es ist verantwortlich für die Ausbildung größerer Mengen an sieben verschiedenen t-RNA Molekülen, die im Prokaryonten natürlicherweise nicht in diesem Ausmaß benötigt und gebildet werden (Novagen, 2002). Zur Expressionsinduktion verfügt der *E. coli* Stamm *Rosetta(DE3)* über eine, vom Lac-Repressor stillgelegte *DE3*-Sequenz, die für die T7 RNA Polymerase kodiert. Nach Zugabe des Induktionssubstrates Isopropyl-β-D-

thiogalactopyranosid (IPTG) wird der Lac-Repressor kompetitiv verdrängt. Die T7 RNA Polymerase kann exprimiert werden und beginnt mit der Transkription am T7 Promotor des Expressionsvektors (Abb. 8; Novagen, 2002).



#### Abbildung 8: Schema, Expressionsvektor und Induktion

Der Expressionsvektor pET-30a(+) (Novagen) kodiert eine Kanamycinresistenz (Kan), einen Origin of Replikation (Ori) und das lac-Repressor Gen (lacR). Die Insert-Transkription beginnt durch die Aktivierung des T7 Promotors (T7P) am Startkodon (AUG), beinhaltet ein His-Tag (HHHHH), das Insert innerhalb der multiplen Cloning Site (MCS), ein weiteres His-Tag und endet am T7 Terminator (T7T).

Das rechts partiell dargestellte Genom des *E. coli* Expressionsstammes *Rosetta(DE3)* (Novagen) verfügt über eine DE3 Sequenz, die für die T7 Polymerase (T7 Pol) kodiert. Dieses Gen wird vom lac-Repressor (lac-Rep) blockiert. Das Gen für den lac-Repressor (lac Z) ist auf dem Expressionsvektor lokalisiert. Durch die Induktion mit IPTG wird der lac-Repressor kompetitiv verdrängt. Es kann die T7 Polymerase exprimiert werden, die den T7 Promotor (T7P) des Expressionsvektors aktiviert und die Insert-Transkription aktiviert.

Zur Kontrolle des Leserahmens der Inserts mittels PCR und anschließender Sequenzierung setzen Vektor-spezifische Primer am T7P und T7T an.

#### Herstellen kompetenter Bakterienzellen

Die im 15 %igen Glycerolstock bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Bakterienzellen wurden in SOC Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 2 h vorangereichert. Es erfolgte ein Ausstrich auf Luria Bertani (LB) Nähragar mit entsprechendem Selektionsmarker (S) und die Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Als

Selektionsmarker wurde dem Nährmedium für den *E. coli* Stamm *NovaBlue* (Novagen, Madison, USA) das Antibiotikum Tetrazyclin in der Endkonzentration 12,5 µg/ ml und für den *E. coli* Stamm *Rosetta(DE3)* (Novagen, Madison, USA) das Antibiotikum Chloramphenicol in der Endkonzentration 34 µg/ ml zugesetzt. Von den über Nacht gewachsenen koloniebildenden Klonen wurden einzelne gepickt und in 2 ml LBS wiederum über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Der hochgezüchtete Klon wurde durch Zentrifugieren bei 900 x g für 10 min pelletiert und in 100 ml frischem LBS aufgenommen. Es folgte wiederum eine Inkubation bei 37°C und 250 rpm, bis die Kultur eine Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) erreicht hatte. Die Zellen wurden unter Schwenken auf Eis abgekühlt und bei 4°C und 1100 x g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem Transformationspuffer I (TfB I) gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. Der TfB I (pH 5,8) enthielt 30 mM K Azetat, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 15 % Glycerin (mod. nach Sambrook et al., 1989). Anschließend wurden die Zellen bei 1100 x g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem Transformationspuffer II (TfB II) vorsichtig resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der TfB II (pH 7,0) enthielt 10 mM 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub> und 15 % Glycerin (mod. nach Sambrook et al., 1989). Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

## **4.2. Konstruktion der Plasmide**

### **F Protein Fragmente**

Zur Expression wurde das gesamte F Gen des RPMV Gono-GER85 in den Expressionsvektor pET-30a(+) (Novagen, Madison, USA) kloniert. Dieses Konstrukt sollte für das F Protein vom Startkodon (Aminosäure 1) bis zum Stopkodon (Aminosäure 546), das rekombinante Protein 1, kodieren. Das zweite Konstrukt beinhaltete die Sequenz für das F Protein ohne das Signalpeptid und den Transmembrananker (rekombinantes Protein 2, Aminosäuren 25 bis 490). Ein drittes Konstrukt kodierte für das rekombinante Protein 3 und entsprach der F2-Untereinheit des Paramyxovirus F Proteins

ohne dem Signalpeptid (Aminosäuren 25 bis 110). Ein letztes Konstrukt enthielt die Sequenz für das rekombinante Protein 4, das die F1-Untereinheit des F Proteins ohne das Heptad Repeat B repräsentierte (Aminosäuren 111 bis 460; Abb. 9).



#### **Abbildung 9: Modell: F Protein und rekombinante Proteine**

Das Modell des Paramyxovirus F Proteins zeigt vom N- zum C-Terminus die F2-Untereinheit mit Signalpeptid (SP) und Schnittstelle (SS) und die F1-Untereinheit mit Heptad Repeat A und B (HR A, B), sowie den Transmembrananker (TM). Dargestellt sind die Fragmente, die als rekombinante Proteine 1 bis 4 exprimiert werden sollen (Erklärung s. Text).

#### Modellberechnung

Die Größen der jeweiligen Inserts und Plasmide, sowie das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine 1 bis 4, wurden mittels des Computerprogramms *MacVector* (International Biotechnologies, New Haven, USA) berechnet.

#### Insert-flankierende Primer

Um das F Gen und die F Gen Fragmente, im Folgenden als *Insert* bezeichnet, in den Vektor zu klonieren, wurden sie mittels RT-PCR amplifiziert. Die entsprechenden Primer wurden anhand der RPMV Gono-GER85 F Gen Sequenz (Kap. IV.3.) ausgesucht. Für den Start-Primer wurden

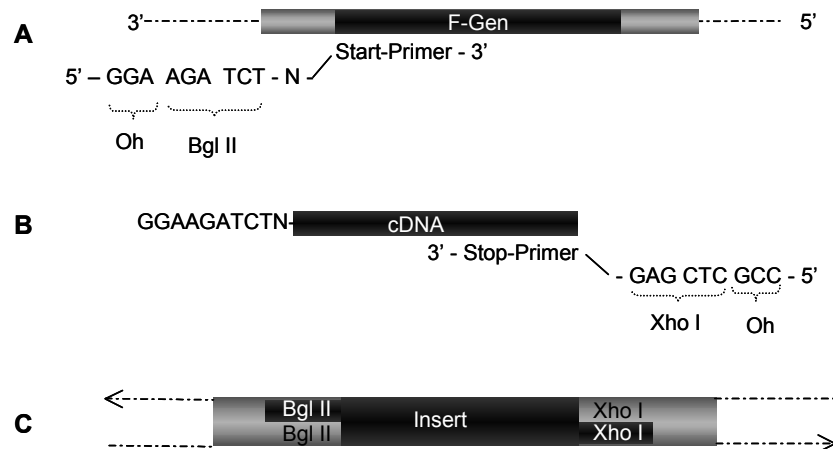
je 21 nt komplementär, für den Stop-Primer wurden je 21 nt revers komplementär zum viralen F Gen in 5'-3' Richtung verwendet.

Zwecks zielgerichteter Ligation wurden zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme (RE) ausgewählt, die sowohl das Insert, als auch den Vektor schnitten. Der Start-Primer beinhaltet das RE *Bgl II* (Biolabs, Beverly, USA), der Stop-Primer das RE *Xho I* (Biolabs, Beverly, USA), da diese sich für das Klonieren in den Expressionsvektor eigneten und für beide Enzyme keine Schnittstelle im F Gen existierte. Der Start-Primer enthielt ein zusätzliches Nukleotid, das den richtigen Leserahmen gewährleistete. Eine, das Angreifen des RE optimierende spezifische Overhangsequenz wurde jeweils am 5'-Ende addiert (Biolabs, 2002; Abb. 10).

**Tabelle 5: Lokalisation Insert-spezifischer Primer**

Zur Amplifizierung der Inserts wurde der Start-Primer komplementär und der Stop-Primer revers komplementär zum RPMV Gono-GER85 F Gen gewählt. Die Primerbezeichnungen und ihre Lokalisationen sind dargestellt.

Insert	Bezeichnung und Position im RPMV Gono-GER85 F Gen			
	Start-Primer		Stop-Primer	
1	1-Start	1 - 21	1-Stop	1618 - 1638
2	2-Start	75 - 95	2-Stop	1450 - 1470
3	3-Start	75 - 95	3-Stop	310 - 330
4	4-Start	331 - 351	4-Stop	1360 - 1380



### Abbildung 10: Modell eines Insert-flankierenden Primerpaares

Beide Primer kodieren für die Restriktionssequenz *Bgl II* bzw. *Xho I* und den Overhang (Oh). Ein zusätzliches Nukleotid (N) im Start-Primer gewährleistet die Einhaltung des Leserahmens.

- A: Das Schema zeigt den F Gen Ausschnitt des viralen Genoms. Das zu amplifizierende Insert ist in schwarz dargestellt. Der Start Primer bindet an das 3' Ende der viralen Negativstrang-RNA und bildet die cDNA.
- B: Der Stop Primer bindet an die cDNA.
- C: Doppelstrang Vektor-DNA nach Ligation des Inserts in den Expressionsvektor mit überlappenden Restriktions-Motiven.

### RT-PCR zur Insertamplifizierung

Die Inserts zu den verschiedenen Plasmid-Konstrukten 1 bis 4 wurden mittels RT-PCR amplifiziert. Die Ausführung der RT-PCR erfolgte wie in Kapitel III.1. dargestellt.

### Restriktionsverdau

Die Aufreinigung amplifizierter Insert-DNA erfolgte über ein 0,7 %iges Agarosegel und mittels *Gel-Extraktionskit* (Qiagen, Hilden), die des Expressionsvektors pET30a(+) (Novagen, Madison, USA) mittels *Plasmid Purification Mini Kit* (Qiagen, Hilden).

Zum Restriktionsverdau wurden 10 µg DNA mit je 7,5 Units Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer (Biolabs,

Beverly, USA) bei 37°C für 3 h inkubiert. Die Kontrolle auf Größe, Reinheit und Quantität der gechnittenen Insert- und Expressionsvektor-DNA folgte nach Visualisierung in einem 1,3 %igem Agarosegel.

### Ligation

Die Inkubation zur Ligation von 30 ng Vektor mit je 100 ng, 1000 ng und 3000 ng Insert-DNA wurde, für 16 h, bei 15°C, mittels 1 Unit T4 DNA Ligase (Biolabs, Beverly, USA) und in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer, durchgeführt.

### Transformation

Es wurde je das halbe Volumen des Ligationsproduktes in den *E. coli* Stamm *NovaBlue* (Novagen, Madison, USA) transformiert. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und für 20 min mit dem Ligationsprodukt auf Eis inkubiert. Als Kontrolle des Transformationsprozesses diente ein mit PBS behandeltes Aliquot der kompetenten Zellen. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min und ein direkt anschließender Kälteschock auf Eis für 2 min. Die Bakteriensuspension wurde mit 200 µl SOC Medium substituiert und für 2 h bei 37°C auf dem Schüttler bei 250 rpm vorangereichert. Es folgte die Inkubation auf LB-Agar mit Kanamycin (30 µg/ ml) bei 37°C über Nacht. Die Transformationskontrolle wurde auf zwei verschiedene LB-Agarplatten, mit und ohne Kanamycin, platiert.

Nach dem Sammeln gewachsener Klone, folgte ihre Vermehrung in 2 ml LBS bei 37°C und 250 rpm für 9 h (nach Sambrook et al., 1989).

### Plasmidvermehrung und Insertkontrolle

Die in der Bakterienkultur vermehrten Plasmide wurden mittels *Plasmid Purification Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers gewonnen.



Die konstruierten Plasmide wurden mittels PCR (Kap. III.1.) mit vektorspezifischen Primern, dem T7 Promotor Primer (Novagen, Madison, USA) und T7 Terminator Primer (Novagen, Madison, USA) auf die Insertpräsenz kontrolliert (Abb. 8). Als Template diente je ein 5 µl Aliquot der Bakterienkultur, nach Abkochen für 1 min bei 100°C und Abzentrifugieren für 1 min bei 9000 x g. Die PCR Amplifikate wurden auf einem 1,3 %igen Gel analysiert, selektiert und anschließend mit den Vektor-spezifischen Primern sequenziert. Das Sequenzieren erfolgte mit dem *Abi Prism, 310 Genetic Analyzer* (Perkin Elmer, Wellesley, USA), nach Anleitung des Herstellers. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels des Computerprogramms *Sequencher* (Perkin Elmer, Wellesley, USA) und *Mac Vector* (International Biotechnologies, New Haven, USA). Es wurden die Insertrichtung und der Leserahmen überprüft. PCR-positive und sequenzgeprüfte Klone wurden weitervermehrt und anschließend einer Plasmidpräparationen mittels *Plasmid Purification Mini Kit* (Qiagen, Hilden) unterzogen.

Eine weitere Kontrolle bestand im Restriktionsverdau der Vektor-DNA mit den spezifischen Enzymen und der anschließenden Visualisierung im Agarosegel.

#### Transformation in den Expressionsstamm

Die jeweiligen Insert-tragenden Plasmide wurden, wie in diesem Kapitel oben beschrieben, in den Expressionsstamm *Rosetta(DE3)* (Novagen, Madison, USA) transformiert, die daraus resultierenden Klone mittels Vektor-spezifischer PCR nochmals kontrolliert.

#### Konservieren der Bakterienklone

Von allen transformierten und geprüften Bakterienklonen wurden Stock-Kulturen angelegt. Hierfür wurden 2 ml einer bei 37°C und über Nacht gewachsenen Kultur bei 2000 x g für 10 min in der vorgekühlten Zentrifuge pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml 15 %igem Glycerol LB-Medium resuspendiert und bei -80°C konserviert.

## **5. Prokaryotische Gen-Expression und Proteinanalysen**

### **5.1. Induktion der Expression**

Je 2 ml eines über Nacht gewachsenen Klones wurden in 20 ml LBS-Medium aufgenommen und inkubiert bis, nach etwa 3 h, eine Dichte von 0,6 im Photometer, *Spectra max 384 plus* (Molecular Devices, Sacramento, USA), bei einer Wellenlänge von  $OD_{600}$  gemessen werden konnte. Die photometrische Dichtebestimmung erfolgte stündlich von allen Proben. Die Inkubation der Bakterienklone erfolgte während der gesamten Zeit bei 37°C und 250 rpm. Es wurden 5 ml Bakterienkultur entnommen und separat inkubiert, die nicht zur Induktion vorgesehen waren. Der zur Proteinexpression vorgesehene Teil wurde mit einer IPTG Endkonzentration von 1 mM induziert (Abb. 8).

Für die Probenentnahme wurde zur Schonung der Proteine je ein Aliquot von 2 ml auf Eis abgekühlt und bei 5000 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C tiefgefroren. Das Zellpellet wurde in eiskaltem PBS (pH 7,4) resuspendiert, unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und bei -80°C tiefgefroren (Novagen, 2002). Es folgte die Proteinanalyse von Überstand und Bakterienpellet.

#### **Positive Induktionskontrolle**

Während der Induktion wurde eine Kontrolle mitgeführt, die die Proteinexpression als positiv anzeigen sollte. Es wurde der vom Hersteller empfohlene Kontrollklon G verwendet (Novagen, Madison, USA). Dieser *E. coli* Expressionsstamm *BL21* war mit dem Expressionsvektor pET-30b (Novagen, Madison, USA) transformiert und enthielt das Gen für die 120 kD große  $\beta$ -Galaktosidase (Novagen, 2002). Das Protein sollte ebenfalls das His-Tag enthalten und daher auch zur Kontrolle im Anti-His spezifischen WB detektierbar sein.

### Negative Induktionskontrolle

Als Negativ-Kontrolle wurde der Expressionsvektor pET-30a(+) (Novagen, Madison, USA) ohne Insertpräparation in den Expressionsstamm *Rosetta(DE3)* (Novagen, Madison, USA) transformiert und im Expressionsversuch mitinduziert.

### **5.2. Aufreinigung rekombinanter Proteine**

Für die Aufreinigung bakteriell exprimierter rekombinanter Proteine über ihr His-Tag wurden 50 ml einer induzierten Bakterienkultur bei 5000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Auflösen des Pellets erfolgte in 30 ml Protein-Extraktionspuffer (PEP, pH 8,0) und durch Beschallen mit dem Ultraschallgerät *Soniprep* (MSE Technology Applications, Denver, USA) für 15 min bei 14 Mikrons. Der PEP enthielt 8 M Urea, 0,2 mM  $\beta$ -Mercapthoethanol, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 M Tris, 0,01 M Imidazol und 0,05 M NaCl (Qiagen, 2002).

Nach Gefriertauen bei  $-80^\circ\text{C}$  wurde die Proteinlösung bei 15000 x g für 10 min pelletiert und der Überstand weiterverwendet (Aufbewahren des Pellets bei  $-80^\circ\text{C}$ ).

Das Ni-NTA Säulenmaterial (Novagen, Madison, USA) wurde im PEP (pH 8,0) gewaschen, bei 2000 x g für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen.

Der Überstand der Proteinlösung (40 ml) wurde mit der pelletierten Agarose (500 mg) vermischt und für 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  und 250 rpm inkubiert. Es folgte das Auftragen und Drainieren der Agarose-Protein-Mischung auf eine Säule (Novagen, Madison, USA) und ein Waschschrift mit 50 ml PEP (pH 6,3). Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte mit 16 ml PEP (pH 4,5) in 1 ml Fraktionen. Die Fraktionen wurden einzeln im Proteingel analysiert.

### **5.3. Furin Protease-Verdau**

Wie bereits in Kapitel II.2.3.3.2. dargestellt, werden paramyxovirale F Prä-Proteine in der posttranslationellen Modifizierung durch eine Wirtszellprotease am Golgi-Apparat in zwei Teile gespalten (Lamb & Kolakovsky, 2001). Mit einem Verdau *in vitro* sollte untersucht werden, ob das prokaryotisch exprimierte rekombinante Protein 2 durch die Endopeptidase *Furin*, die nach der as-Sequenzfolge R X R/K R schneidet, prozessiert wird (Hatsuzawa et al., 1992). Dies ist anzunehmen, da in der RPMV F Protein Sequenzanalyse (Kap. IV.3.) ihr Schnitt-Motiv gefunden werden konnte.

#### **Proteindialyse**

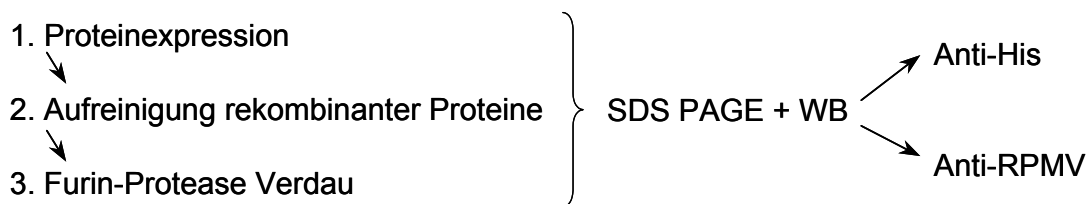
Um das aufgereinigte rekombinante Protein 2 mit *Furin* (Biolabs, Beverly, USA) zu prozessieren, musste es im geeigneten Puffer gelöst vorliegen. Es wurde in einem 30fachen Volumen des Furin Puffers dialysiert. Der Puffer enthielt 1 M HEPES, 5 % Triton X-100, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM β-Mercaptoethanol (pH 7,5; Biolabs, 2002). Die Inkubation der Proteinlösung erfolgte im Dialyserähmchen für Proteine ab 10 kD (Pierce, Rockford, USA) für 18 h bei 4°C und langsamem Rühren mit Wechsel der Dialyselösung alle 6 h.

#### **Proteinverdau**

In einem 100 µl Ansatz wurden 100 ng Protein mit 2 Units Furin (Biolabs, Beverly, USA) im Furin Puffer für 3 h bei 30°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie im anschließenden Kapitel beschrieben.

## **5.4. Proteinanalyse**

Die Proteinanalyse der prokaryotisch exprimierten Plasmidkonstrukte (Kap. III.5.1.), der aufgereinigten rekombinanten Proteine (Kap. III.5.2.) und des Proteins aus dem Furin Protease-Verdau (Kap. III.5.3.) erfolgte mittels Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE) und Western Blot (WB). Im anschließenden WB sollten ein Anti-His-Tag Antikörper und ein Anti-RPMV Kaninchenserum geblottetes Protein detektieren (Abb. 11).



**Abbildung 11: Übersicht des Protein Nachweisverfahrens**  
Erläuterung im Text.

### **Kontrollen**

Als Positiv-Kontrolle des Anti-RPMV Kaninchensersums im WB dienten gereinigte Virusproteine des RPMV Gono-GER85. Hierfür wurden 400 ml zellfrei zentrifugierte Virussuspension des RPMV Gono-GER85 mittels Ultrazentrifugation für 90 min bei 90000 x g über einem 60 %igen Sucrose-Kissen auf 6 ml konzentriert (Maramorosch & Koprowski, 1967). Nach dieser Konzentration erfolgte die Trennung von Virusproteinen und virusfremden Proteinen mittels Sucrose-Gradient (Maramorosch & Koprowski, 1967). Hierbei wurde ein 20-60 %iger Sucrose-Gradient (Gradientengießßer, *Auto Densi Flow II C*, Haake Buchler, Fair Lawn, USA) mit den gewonnenen Fraktionen überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 90000 x g für 6 h, die Gewinnung der Virusfraktion durch Tube-Piercing bei einer Dichte von 1,2 g/

ml. Die verwendeten Pufferlösungen (pH 8,0) enthielten 1 M NaCl, 20 mM Tris HCl, 5 mM EDTA und 40 % (w/v) Sucrose bzw. 60 % (w/v) Sucrose (Sambrook et al., 1989).

Als Negativ-Kontrolle im Proteingel und WB dienten IgH<sub>2</sub>-Zellen, die auch der RPMV Antikörpergewinnung dienten. Im WB sollte diese Probe anzeigen, welche Banden auf IgH<sub>2</sub>-Zellproteine zurückzuführen sind. Hierfür wurden IgH<sub>2</sub>-Zellen bei 1100 x g für 30 min pelletiert und wie pelletierte Bakterienzellen für die Proteinanalyse präpariert.

### Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

In diesem Verfahren werden die Proteine denaturiert und wandern abhängig von ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht (MW) im elektrischen Feld (Bollag & Edelstein, 1991).

Das 12 %ige Trenngel wurde aus 375 mM Tris HCl (pH 8,8), 12 % Acrylamid/ Bis Stocklösung (Bio Rad, Hercules, USA), 0,1 % SDS, 0,05 % Ammoniumpersulfat und 0,05 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) hergestellt (modifiziert nach Sambrook et al., 1989). Das Sammelgel bestand aus 125 mM Tris HCl (pH 6,8), 5 % Acrylamid/Bis Stocklösung (Bio Rad, Hercules, USA), 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumpersulfat und 0,1 % TEMED (modifiziert nach Sambrook et al., 1989).

### Probenpräparation

Die verschiedenen Proben setzten sich aus pelletiertem bakteriellem Gesamtprotein (Kap. III.5.1.), pelletierten IgH<sub>2</sub>-Zellen, gereinigten Virusproteinen (Kap. III.5.4., Kontrollen), in Proteinextraktionspuffer eluiertem aufgereinigtem rekombinanten Protein (pH 4,5; Kap. III.5.2.) und dialysiertem Furin Protease-verdautem Protein zusammen (Kap. III.5.3.).

Pelletierte Bakterien und IgH<sub>2</sub>-Zellen (je 1 µl) wurden im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt, aufgereinigtes Protein, Bakterienüberstand und

aufgereinigte Virusproteine hingegen unverdünnt verwendet. Nach dem Mischen im Verhältnis 1:1 mit der *2x Sample Dye* kochten alle Proben für 3 min bei 100°C (Sambrook et al., 1989). Alle mit PBS verdünnten Proben wurden für 10 sek bei 14 Mikrons mittels des *Soniprep Ultrasound* Gerätes (MSE Technology Applications, Fair Lawn, USA) beschallt. Die Proteinstandards, *Prestained SDS Molecular Weight Markers* (Abb. 28, M1; Sigma, St. Louis, USA) und *Multi Mark Multi-Colored Standard* (Abb. 28, M2; Novex, San Diego, USA) wurden gemäß der Anleitung des Herstellers präpariert.

### Elektrophorese

Der Elektrophorese-Puffer enthielt 3 mM Tris HCl, 50 mM Glycin, 0,001 % Thiomerosal und 0,01 % SDS (mod. nach Sambrook et al., 1989). Im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt bis die Lauffront dieses nach etwa 20 min passiert hatte. Im Trenngel erfolgte daraufhin eine Erhöhung auf 200 V, die solange aufrecht erhalten wurde, bis die Lauffront nach etwa 60 min den distalen Rand der Gele erreicht hatte.

### Färben und Fixieren von PAGE Gelen

Die Proteingele wurden für 60 min mit Coomassie Färbelösung gefärbt und anschließend nach Ermessen etwa 3 h entfärbt (Sambrook et al., 1989). Die Fixierung erfolgte durch Trocknen im *Slab Gel Dryer* (Savant, New York, USA) bei 50°C für 60 min auf Whatman-Blotpapier.

### Western Blot (WB)

Direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte der Western Blot (WB). In zwei verschiedenen Ansätzen sollte ein Anti-His monoklonaler Mausantikörper (mAK; Novagen, Madison, USA) rekombinantes Protein detektieren und ein Anti-RPMV polyklonales Kaninchenserum (pAK) das

prokaryotische exprimierte F Gen. Das Antiserum war im Kaninchen gegen das RPMV Gono-GER85 hergestellt worden (Ahne & Röder, unpubl.).

Für den Proteinblot wurde eine Nitrocellulose Membran der Porengröße 0,45 µm (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet. Der Transferpuffer enthielt 3 mM Tris Base, 50 mM Glycine, 20 % Methanol und 0,01 % Thiomerosal (Towbin et al., 1976). Es wurde bei 80 V für 60 min geblottet (Sambrook et al., 1989; Bollag & Edelstein, 1991). Um die Vollständigkeit des Proteintransfers zu überprüfen, wurde das Gel nach dem Blot zur Kontrolle gefärbt.

Nach dem Blot-Vorgang wurde die Nitrozellulose Membran zum Blocken unspezifischer Proteine für 1 h bei 37°C mit 10 % Magermilchpulver (Nestle, Glendale, USA) PBS-Lösung inkubiert (mod. nach Sambrook et al., 1989).

Zur Detektion des His-Tags rekombinanter Proteine folgte die Inkubation mit dem Anti-His mAK in der Verdünnung 1:1000 mit PBS. In einem Parallelansatz erfolgte die Inkubation mit dem Anti-RPMV pAK in der Verdünnung 1:1000 mit PBS. Es wurde für 2 h und 20 rpm bei Raumtemperatur inkubiert, die Membran im Anschluss für 30 min mit 0,1 %igem Tween-20 in PBS (PBST) gewaschen. Das PBST wurde alle 10 min gewechselt. Der Anti-His mAK wurde mit einem Anti-Maus IgG Alkalische Phosphatase (AP) Konjugat (Promega, Madison, USA), der Anti-RPMV pAK mit dem Anti-Kaninchen IgG AP Konjugat (Stressgen, St. Paul, Kanada) gebunden. Die Inkubation erfolgte für 1 h und 20 rpm bei Raumtemperatur. Die Membran wurde im Anschluss für 30 min mit PBS gewaschen, das PBS alle 10 min gewechselt. Der Sekundärantikörper wurde mittels des *Alkaline Phosphatase Immun Blot Assay Kits* (Bio-Rad, Hercules, USA), gemäß der Anleitung des Herstellers, visualisiert. Die Auswertung erfolgte nach Umfärbung der Membran und Trocknen auf Whatman Blot-Papier.

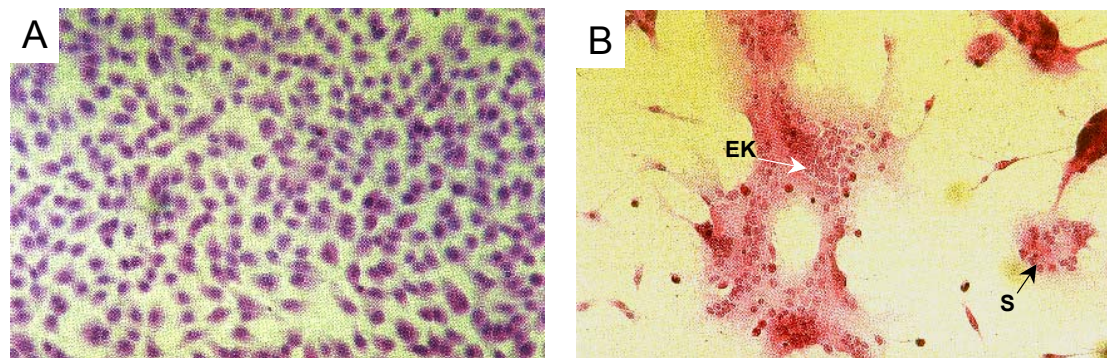


## IV. Ergebnisse

### 1. Identifizierung der Virusisolate

#### Zellkultur

Die 18 Virusisolate, sowie das Referenzvirus Gono-GER85 (Tab. 2), konnten in IgH<sub>2</sub>-Zellen und Vero-Zellen mit für Paramyxoviren typischem cytopathischen Effekt (cpE) vermehrt werden. Charakteristisch war die Ausbildung von vielkernigen Riesenzellen (Syncytien) mit intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen (Abb. 12B). Zellabkugelungen und finale Zelllysis fanden innerhalb von sieben Tagen statt. Die Titration der infektiösen Zellkulturüberstände ergaben durchschnittliche Titer von 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> / ml.

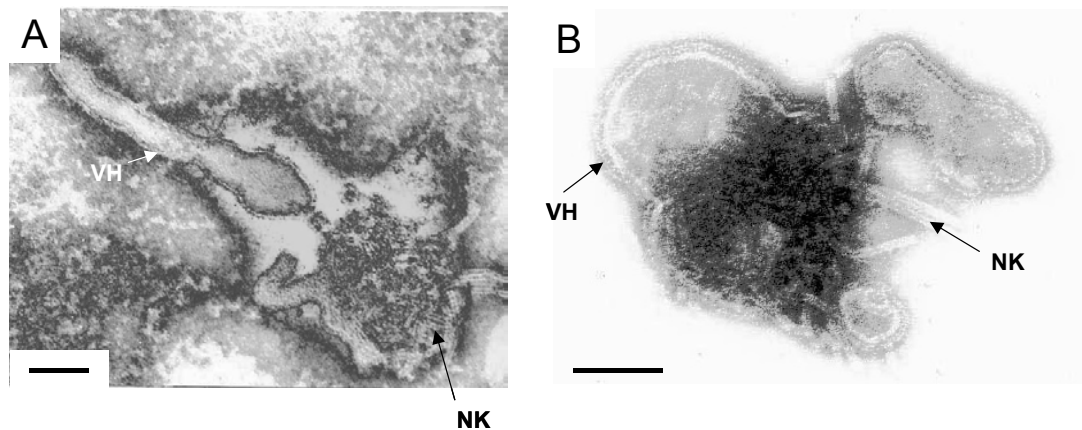


#### **Abbildung 12: Cytopathischer Effekt der RPMV**

Vero-Zellen, HE Färbung A) Kontroll-Zellen. B) RPMV infizierte Vero-Zellen (3 d p.i.) bilden vielkernige Syncytien (S) und zytoplasmatische Einschlusskörperchen (EK).

#### Elektronenmikroskopie

Bei der elektronenoptischen Darstellung der Virionen wurden runde und tubulär-geformte, behüllte Partikel mit einer Größe von 190 nm bis 480 nm ermittelt. Teilweise war die Virushülle rupturiert und gab dabei das helikale Nukleokapsid frei (Abb. 13A, B). Die Größe und Morphologie der Partikel entspricht den Beschreibungen von Paramyxoviren (Lamb et al., 2000).



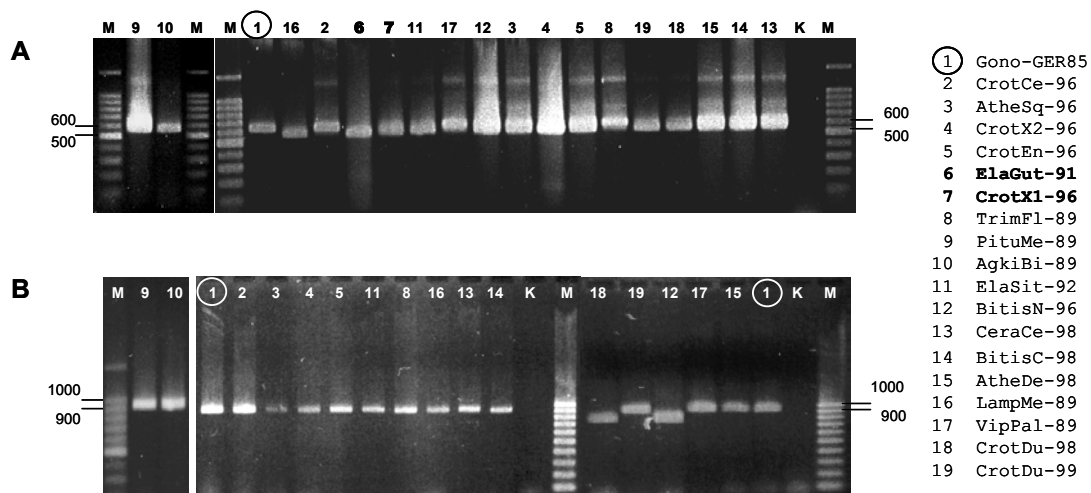
### **Abbildung 13: Elektronenoptische Aufnahmen der RPMV**

Das Negativ Staining von pelletiertem Virusmaterial zeigt einen tubulär (A) und einen rund (B) geformten Partikel. Virushülle (VH), Nukleokapsid (NK). Der Balken entspricht je einer Größe von 100 nm.

### Nachweis der Virus-RNA durch RT-PCR

Aus der L Gen spezifischen RT-PCR und nested PCR resultierten Amplifikate der RNA aller 18 Virusisolate und des Referenzvirus Gono-GER85 mit einer Größe von 626 bp für die erste Runde der PCR (RT-PCR) und 566 bp für die nested PCR (Abb. 14A).

Dagegen reagierte in der F Gen spezifischen RT-PCR und semi-nested PCR nur die RNA von 16 Virusisolaten und dem Referenzvirus mit Amplifikaten von 954 bp für die erste Runde der PCR (RT-PCR) und 792 bp für die semi-nested PCR (Abb. 14B).



#### Abbildung 14: Amplifikate aus den partiellen L und F Gen spezifischen PCR der RPMV

Agarosegel (1,3 %) der Amplifikate aus der L Gen (A) und der F Gen (B) spezifischen PCR. Als Kontrollen wurden das Referenzvirus Gono-GER85 (1) und ein PCR-Ansatz ohne virale RNA (K) verwendet. Marker (M).

- A) Spuren 1, 2 und 17 zeigen Amplifikate der ersten Runde der RT-PCR (626 bp), die anderen Spuren von der nested PCR (566 bp).
- B) Alle Spuren zeigen Amplifikate aus der RT-PCR (954 bp), außer den Spuren 18 und 12, die aus der semi-nested PCR (792 bp) stammen. Die Isolate 6 und 7 konnten in der semi-nested RT-PCR nicht amplifiziert werden.

#### Beweis der Einheitlichkeit durch Sequenzanalyse

Das Sequenzalignment zeigte die Übereinstimmung von 100 % für diejenigen Isolate, die aus einem Ausbruch und Bestand stammten (vgl. Tab. 2; Abb. 15, 16). Weiterhin besteht eine Einheitlichkeit (Homologie) der untersuchten Reptilienviren untereinander und zu den Referenzviren Gono-GER85 und FDLV (Abb. 15, 16). Die Sequenz des *Sendai Virus* wurde als Fremd-Vergleich mit einbezogen und unterscheidet sich auf nt- und as-Sequenzebene von den RPMV. Das Alignment der L Gensequenzen zeigte, dass sich die Sequenzen der Isolate ElaGut-91 und CroTX1-96 von den anderen RPMV Sequenzen unterschieden (Abb. 15). Dies ist bemerkenswert, da sich deren RNA in der F Gen spezifischen PCR nicht amplifizieren ließ.

Die prozentuale Übereinstimmung der L und F Sequenzen innerhalb der RPMV Gruppe betrug mindestens 79 % auf nt-Ebene und 94 % auf as-Ebene. Die as-Ähnlichkeit betrug mindestens 98 % für die partielle L Protein-Sequenz (Tab. 6).

Die Homologie der Reptilienviren zu den Paramyxovirus Typspezies wurde durch die prozentuale Übereinstimmung der Sequenzen zum FDLV berechnet. Übereinstimmungen betragen maximal 56 % auf nt-Ebene und 61 % auf as-Ebene für die L Sequenz mit dem *Sendai Virus*. Die as-Ähnlichkeit betrug maximal 79 % (Tab. 6).

Die erhaltenen Sequenzen der partiellen L und F Gene wurden in der Genbank publiziert, Referenznummern sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

FDLV	9670	GTTACTGCTGCTGATAAAAGTGAGAGATCATATGTGTAAAGCCTAAAGTCTTAGACTATGAG	9729
GonGer-85	9670	.....C.....A.....A.....C...	9729
CrotCe-96	9670	.....C.....C.....A.....GA.....C...	9729 *
AtheSq-96	9670	.....C.....C.....A.....GA.....C...	9729 *
CrotX2-96	9670	.....C.....C.....A.....GA.....C...	9729 *
TrimFl-96	9670	.....C.....C.....A.....GA.....C...	9729 *
<b>ElaGut-91</b>	<b>9670</b>	.....C.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....	<b>9729</b>
<b>CrotX1-96</b>	<b>9670</b>	.....C.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....	<b>9729</b>
TrimFl-89	9670	.....T.....A.....C.....G.....GA.....T.....A	9729
PituMe-89	9670	.....C.....A.....A.....C.....G.....GA.....C.....T.....A	9729 °
LampMe-89	9670	.....C.....A.....A.....C.....G.....GA.....C.....T.....A	9729 °
VipPal-89	9670	.....C.....A.....A.....C.....G.....GA.....C.....T.....A	9729 °
AgkiBi-89	9670	.....C.....A.....A.....C.....G.....GA.....C.....T.....A	9729 °
ElaSit-92	9670	.....A.....A.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....GA.....C.....T.....A	9729
BitisN-96	9670	.....A.....A.....C.....C.....G.....C.....C.....GA.....C.....T.....A	9729 °
CeraCe-98	9670	.....T.....A.....A.....C.....G.....C.....GA.....C.....T.....A	9729 °
BitisC-98	9670	.....T.....A.....A.....C.....G.....C.....GA.....C.....T.....A	9729 °
AtheDe-98	9670	.....T.....A.....A.....C.....G.....C.....GA.....C.....T.....A	9729 °
CrotDu-98	9670	.....T.....A.....A.....C.....G.....C.....GA.....C.....T.....A	9729 °
CrotDu-99	9670	.....T.....A.....A.....C.....G.....C.....GA.....C.....T.....A	9729 °
Sendai	9661	..G.TC..A.....G..A..G.CC.....A.GCA.AA..G.CAA..A.GCT.A..	9720
		**.* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** ** * ..* . ** * : ** .	
FDLV	9730	ACACTGCAGAAAGGACATGCAGTATTCTGTTCTATGATAATCAACGGATTTCAGAGAGAGA	9789
GonGer-85	9730	.T.....C.....T.....C.....G..T.....	9789
CrotCe-96	9730	.T.....C.....T.....T.....T.....	9789 *
AtheSq-96	9730	.T.....C.....T.....T.....T.....	9789 *
CrotX2-96	9730	.T.....C.....T.....T.....T.....	9789 *
TrimFl-96	9730	.T.....C.....T.....T.....T.....	9789 *
<b>ElaGut-91</b>	<b>9730</b>	<b>.T..A.....G..G..C.....</b>	<b>9789</b>
<b>CrotX1-96</b>	<b>9730</b>	<b>.T..A.....G..G..C.....</b>	<b>9789</b>
TrimFl-89	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T.....T..G.....	9789
PituMe-89	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T.....T..G.....	9789 °
LampMe-89	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T.....T..G.....	9789 °
VipPal-89	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T.....T..G.....	9789 °
AgkiBi-89	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T.....T..G.....	9789 °
ElaSit-92	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T..G..T..G.....	9789
BitisN-96	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T..G..T..G.....	9789
CeraCe-98	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T..G..T..G.....	9789 °
BitisC-98	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T..G..T..G.....	9789 °
AtheDe-98	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T..G..T..G.....	9789 °
CrotDu-98	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T..G..T..G.....	9789 °
CrotDu-99	9730	..G..C..A..G..G.....T..T.....C.....C..T..T..G..T..G.....	9789 °
Sendai	9721	..C..AT.CG.GT.T.....T..T..CA.T..C..C..A..T..G.AT.....G	9780
		* ** * . * ** ** ** ** ** * ** ** * ** ** * ** * ** * : ** .	

FDLV	9790	CACGGAGGATCTTGGCCACCATGCTTCCTCCAGACTATGCATCATCTGAGCTCAAAGCG	9849
GonGer-85	9790	..T.....T.....C.....A.....T	9849
CrotCe-96	9790	..T.....C.....T.....C.....A.....T	9849 *
AtheSq-96	9790	..T.....C.....T.....C.....A.....T	9849 *
CrotX2-96	9790	..T.....C.....T.....C.....A.....T	9849 *
TrimFl-96	9790	..T.....C.....T.....C.....A.....T	9849 *
<b>ElaGut-91</b>	<b>9790</b>	<b>..T...G..C.....C.....G..C...A.....A</b>	<b>9849</b>
<b>CrotX1-96</b>	<b>9790</b>	<b>..T..G..G..C.....C.....G..C...A.....A</b>	<b>9849</b>
TrimFl-89	9790	..T..G..G.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849
PituMe-89	9790	..T..G..G.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 "
LampMe-89	9790	..T..G..G.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 "
VipPal-89	9790	..T..G..G.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 "
AgkiBi-89	9790	..T..G..G.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 "
ElaSit-92	9790	..T..G..G..C.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849
BitisN-96	9790	..T..G..G..C.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849
CeraCe-98	9790	..T..G..G..C.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 °
BitisC-98	9790	..T..G..G..C.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 °
AtheDe-98	9790	..T..G..G..C.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 °
CrotDu-98	9790	..T..G..G..C.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 °
CrotDu-99	9790	..T..G..G..C.....T..T.....G..C...AT..G...A	9849 °
Sendai	9781	..T..C...CAG...C..C...TGA..T...T..TC..C..TG..GTCTA...AC..A..GGAAC	9840
		** * * * . * * * * * . *	
FDLV	9850	GTTATGGCAAATCATGCCGCAATTCCTTATGAGTTAAGTGTAATAACTGGGAATCTTTT	9909
GonGer-85	9850	.....G.....T.....C.....T.....C...	9909
CrotCe-96	9850	.....G.....T.....C.....T.....C...	9909 *
AtheSq-96	9850	.....G.....T.....C.....T.....C...	9909 *
CrotX2-96	9850	.....G.....T.....C.....T.....C...	9909 *
TrimFl-96	9850	.....G.....T.....C.....T.....C...	9909 *
<b>ElaGut-91</b>	<b>9850</b>	<b>.....G.....T.....A.....T..C.....C...</b>	<b>9909</b>
<b>CrotX1-96</b>	<b>9850</b>	<b>.....G.....T.....A.....T..C.....C...</b>	<b>9909</b>
TrimFl-89	9850	.....T..G..A.....C.G...T.GC.....G..C...	9909
PituMe-89	9850	.....T..G..A.....C.G...T.GC.....G..C...	9909 "
LampMe-89	9850	.....T..G..A.....C.G...T.GC.....G..C...	9909 "
VipPal-89	9850	.....T..G..A.....C.G...T.GC.....G..C...	9909 "
AgkiBi-89	9850	.....T..G..A.....C.G...T.GC.....G..C...	9909 "
ElaSit-92	9850	.....T..G..A.....C.G...T.GC..T...G..C...	9909
BitisN-96	9850	.....T..G..A.....C..C.G...T.GC..T...C...	9909
CeraCe-98	9850	.....T..G..A.....C..C.G...T.GC..T...G..C...	9909 °
BitisC-98	9850	.....T..G..A.....C..C.G...T.GC..T...G..C...	9909 °
AtheDe-98	9850	.....T..G..A.....C..C.G...T.GC..T...G..C...	9909 °
CrotDu-98	9850	.....T..G..A.....C..C.G...T.GC..T...G..C...	9909 °
CrotDu-99	9850	.....T..G..A.....C..C.G...T.GC..T...G..C...	9909 °
Sendai	9841	..C..CAA..GGTCCA...A..G..A...T.....A..GTGC...G..C...ATAC..AG...C	9900
		* *	

### Abbildung 15: Alignment der partiellen L Gen Sequenzen

Das Alignment zeigt die ersten 240 nt der partiellen L Gen Amplifikate der untersuchten RPMV mit Gono-GER85 und FDLV, sowie dem *Sendai Virus*. Punkte zeigen identische Nukleotide an. Die Anmerkungen \* " ° bezeichnen Isolate des gleichen Ausbruchs (vgl. Tab. 2). In Fettdruck dargestellt sind die Sequenzen der Isolate für die keine Amplifikate in der F Gen spezifischen PCR erhalten werden konnten.

FDLV	103	ISNKREK..VGIAI AVGAVALATSQAQITAGIALSNTIKNAEAIESIKSSIQASNQAIQKV	162
GonGER-85	103	.P.....	162
CrotCe-96	103	.P.....	162 *
AtheSq-96	103	.P.....	162 *
CrotX2-96	103	.P.....	162 *
TrimFl-96	103	.P.....	162 *
TrimFl-89	103	TLSR.....FS.....A.....L.....	162
PituMe-89	103	TLSR.....A.....L.....	162 "
LampMe-89	103	TLSR.....A.....L.....	162 "
VipPal-89	103	TLSR.....A.....L.....	162 "
AgkiBi-89	103	TLSR.....A.....L.....	162 "
ElaSit-92	103	TLSR.....A.....L.....	162
BitisN-96	103	TLSR.....A.....L.....	162
CeraCe-98	103	TLSR.....A.....L.....	162 °
BitisC-98	103	TLSR.....A.....L.....	162 °
AtheDe-98	103	TLSR.....A.....L.....	162 °
CrotDu-98	103	TLSR.....A.....L.....	162 °
CrotDu-99	103	TLSR.....A.....L.....	162 °
Sendai	114	MPDAPQS..F.AV.GTI.LGVA.....AEAREAKRD.ALI.E.MTKTHKS.ELL :.*.*.*.....*****::: : . * :*.*: ::::*: :	173
FDLV	163	IDAQGRVTVTINGIQDHINSVINPALNQLGCDVAKNTLAISLTQYFSKLSLLFGPNLRNP	222
GonGER-85	163	.....	222
CrotCe-96	163	.....	222 *
AtheSq-96	163	.....	222 *
CrotX2-96	163	.....	222 *
TrimFl-96	163	.....	222 *
TrimFl-89	163	.....	222
PituMe-89	163	.....	222 "
LampMe-89	163	.....	222 "
VipPal-89	163	.....	222 "
AgkiBi-89	163	.....	222 "
ElaSit-92	163	.....	222
BitisN-96	163	.....	222
CeraCe-98	163	.....	222 °
BitisC-98	163	.....	222 °
AtheDe-98	163	.....	222 °
CrotDu-98	163	.....	222 °
CrotDu-99	163	.....	222 °
Sendai	174	QN.V.EQILALKTL..FV.DE.K..ISE...ET.ALRLG...T..Y.ELL..F.SNFGTI :* .* : ::: :***:* .***:***:* .***:** * **.*: .	233
FDLV	223	VEQPLSVQAIAGLMDGDINAVVSQLGYTQSDLLDLLSTESIVGTVTAIDMVNYMIQIEMS	282
GonGER-85	223	.....	282
CrotCe-96	223	.....E.	282 *
AtheSq-96	223	.....E.	282 *
CrotX2-96	223	.....E.	282 *
TrimFl-96	223	.....E.	282 *
TrimFl-89	223	.....PC.....V.....	282
PituMe-89	223	.....P.....V.....	282 "
LampMe-89	223	.....P.....V.....	282 "
VipPal-89	223	.....P.....V.....	282 "
AgkiBi-89	223	.....P.....V.....	282 "
ElaSit-92	223	.....P.....V.....	282
BitisN-96	223	.....P.....V.....	282
CeraCe-98	223	.....P.....V.....	282 °
BitisC-98	223	.....P.....V.....	282 °
AtheDe-98	223	.....P.....V.....	282 °
CrotDu-98	223	.....P.....V.....	282 °
CrotDu-99	223	.....P.....V.....	282 °
Sendai	234	GEKSLTL..LSS.YSANITEIMTTIRTGQSNIIYDVIYTEQIKGTVIDV.LER.VTLSVK :..**:* .*. : : : : * : * : * * * : * : * : .	293

FDLV	283	FPQYITIPDTKVLEGHKITFNDKGEWQTQVPSTIAVRDILIAGVDPDGCSITSTSYICK	342
GonGER-85	283	.....	342
CrotCe-96	283	.....	342 *
AtheSq-96	283	.....	342 *
CrotX2-96	283	.....	342 *
TrimFl-96	283	.....	342 *
TrimFl-89	283	.....R.....R.....V.....	342
PituMe-89	283	.....R.....R.....V.....	342 "
LampMe-89	283	.....R.....R.....V.....	342 "
VipPal-89	283	.....R.....R.....V.....	342 "
AgkiBi-89	283	.....R.....R.....V.....	342 "
ElaSit-92	283	.....R.....R.....V.....	342
BitisN-96	283	.....R.....R.....V.....	342
CeraCe-98	283	.....R.....R.....V.....	342 °
BitisN-98	283	.....R.....R.....V.....	342 °
AtheDe-98	283	.....R.....R.....V.....	342 °
CrotDu-98	283	.....R.....R.....V.....	342 °
CrotDu-99	283	.....R.....R.....V.....	342 °
Sendai	294	I . ILSEVPGVLIHKASSISYNIDGE . . YVT . . . H . LS . ASFLG . A . ITD . VESRLT . . . P :* :*. : : : : : * . ** . *** * * * : : . * . * : : * * *	353
FDLV	343	NDPTYAMSEVLTNCFRGNTQECPRAR	368
GonGER-85	343	.....	368
CrotCe-96	343	.....	368 *
AtheSq-96	343	.....	368 *
CrotX2-96	343	.....	368 *
TrimFl-96	343	.....	368 *
TrimFl-89	343	.....	368
PituMe-89	343	.....	368 "
LampMe-89	343	.....	368 "
VipPal-89	343	.....	368 "
AgkiBi-89	343	.....	368 "
ElaSit-92	343	.....	368
BitisN-96	343	.....	368
CeraCe-98	343	.....	368 °
BitisC-98	343	.....	368 °
AtheDe-98	343	.....	368 °
CrotDu-98	343	.....	368 °
CrotDu-99	343	.....	368 °
Sendai	354	R . . AQLIPDSQQKCIL . D . TR . . VTK . ** : : : : : * * . ** :	379

### Abbildung 16: Alignment der partiellen F Protein Sequenzen

Das Alignment zeigt die Protein-Sequenzen der F Gen spezifischen semi-nested PCR der untersuchten RPMV mit Gono-GER85 und FDLV, sowie dem *Sendai Virus* (265 Aminosäuren). Punkte zeigen identische Nukleotide an. Die Anmerkungen \* " ° bezeichnen Isolate des gleichen Ausbruchs (vgl. Tab. 2).

**Tabelle 6: Prozentuale Homologie der L und F Sequenzen der RPMV und Paramyxovirus Typspezies zum FDLV**

Die Berechnung zeigt die prozentualen Identität, bzw. Ähnlichkeit (Sim) der Nukleotide (nt) und Aminosäuren (as). Die Isolate innerhalb eines Kästchens stammen aus einem Infektionsausbruch (vgl. Tab. 2). Für zwei RPMV ist die F Sequenz nicht determiniert (n.d.). Virus (V), *Humanes Respiratorisches Synzytial Virus* (HRSV).

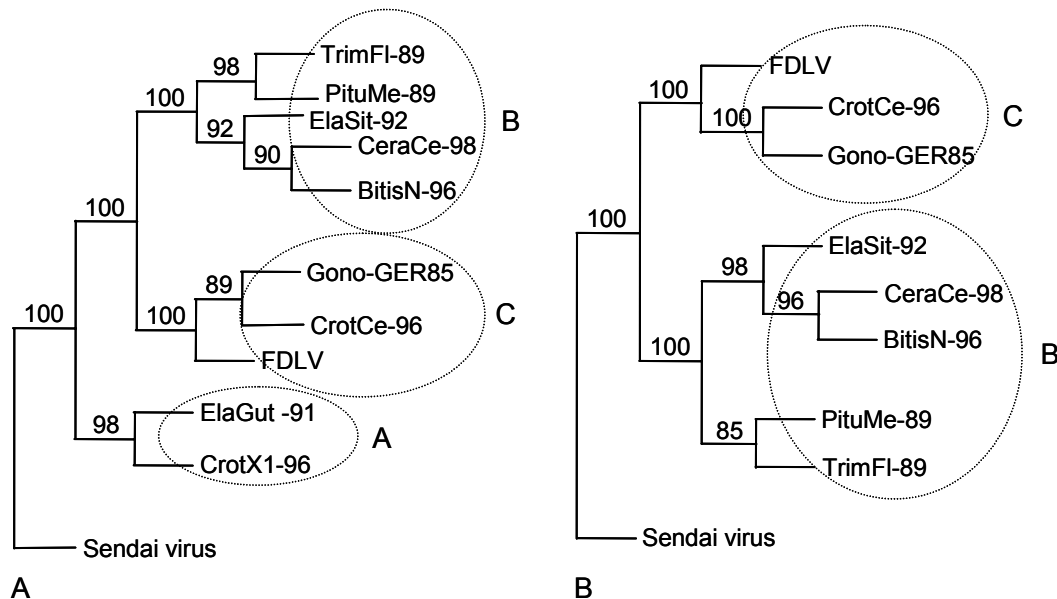
Genus	Virus	L Gen + Protein		F Gen + Protein	
		Sequenzidentität (Sim) in %			
		nt	as	nt	as
RPMV*	FDLV	100	100	100	100
	Gono-GER85	88	97 (100)	88	99 (100)
	CrotCe-96	88	97 (100)	87	99 (100)
	AtheSq-96	88	97 (100)	87	99 (100)
	CrotX2-96	88	97 (100)	87	99 (100)
	CrotEn-96	88	97 (100)	87	99 (100)
	ElaGut-91	87	96 (99)	n.d.	n.d.
	CrotX1-96	86	96 (99)	n.d.	n.d.
	TrimFI-89	81	94 (98)	79	95 (99)
	PituMe-89	81	96 (99)	80	97 (100)
	LampMe-89	81	96 (99)	80	97 (100)
	VipPal-89	81	96 (99)	80	97 (100)
	AgkiBi-89	81	96 (99)	80	97 (100)
	ElaSit-92	80	96 (99)	79	97 (100)
	BitisN-96	80	96 (99)	79	97 (100)
	CeraCe-98	79	95 (99)	79	97 (100)
	BitisC-98	79	95 (99)	79	97 (100)
	AtheDe-98	79	95 (99)	79	97 (100)
	CrotDu-98	79	95 (99)	79	97 (100)
	CrotDu-99	79	95 (99)	79	97 (100)
Respirovirus	Sendai V	56	61 (75)	42	28 (50)
Rubulavirus	Mumps V	53	44 (62)	26	23 (45)
Morbillivirus	Masern V	52	58 (78)	40	27 (49)
Henipavirus	Hendra V	49	48 (79)	39	27 (62)
Pneumovirus	HRSV	32	29 (51)	17	22 (48)



## 2. Phylogenetische Analyse

### Stammbäume der Reptilienviren

Die phylogenetische Analyse wurde anhand von 500 nt des L Gens (Position im Genom nt 9676 bis nt 10176; Ahne et al., 1999b) und anhand von 890 nt des F Gens (F Gen Position nt 228 bis nt 1118) in zwei Berechnungen durchgeführt (Tab. 4; Abb. 17). Es resultierten innerhalb der RPMV Gruppe drei verschiedene Cluster (A, B und C). Das Cluster A fehlt im F Gen Stammbaum, da diese Isolate in der PCR nicht amplifiziert und sequenziert werden konnten (Tab. 6). Im Vergleich der beiden Stammbäume zeigte sich, dass die Cluster B und C jeweils die gleichen Isolate mit identischer Anordnung beinhalteten. Das *Sendai Virus* wurde in beiden Stammbäumen als Fremdreferenz, *Outgroup*, gewählt.



**Abbildung 17: Stammbäume der RPMV**

Die Berechnung basiert auf *100 bootstrap value* und *maximum parsimony*. Die Werte auf den Verzweigungen repräsentieren die Wahrscheinlichkeit der Verzweigung bezogen auf den 100 bootstrap value.

- A) Stammbaum berechnet mit Sequenzen des partiellen L Gens.  
 B) Stammbaum berechnet mit Sequenzen des partiellen F Gens.

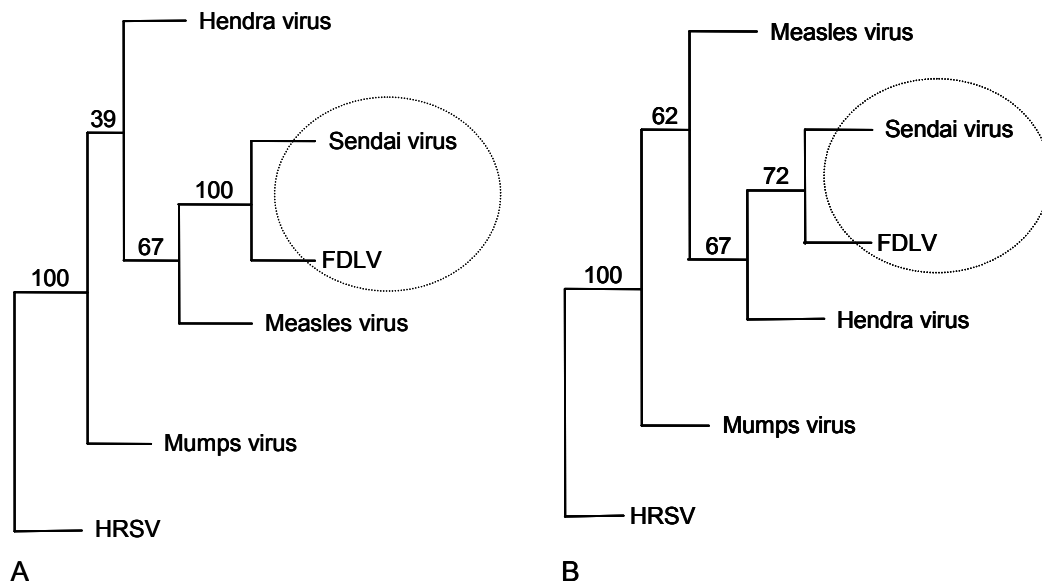
### Stammbäume des FDLV und der Paramyxovirus Typspezies

Um die Position der RPMV innerhalb der Familie *Paramyxoviridae* zu analysieren, wurden die Sequenzen des FDLV und der Typspezies der Paramyxovirus Genera verwendet (Tab. 4).

Die Stammbaum-Berechnung der L Protein Sequenzen wurde mit 700 Aminosäuren, Position 26 bis 725 der FDLV Sequenz und den korrespondierenden Bereichen der Paramyxovirus Typspezies Sequenzen, durchgeführt (Abb. 18). Die Stammbaum-Berechnung der F Protein Sequenzen basierte auf 546 Aminosäuren, der gesamten Proteinsequenz des FDLV und den korrespondierenden Sequenzen der Paramyxovirus Typspezies.

Im Gegensatz zu den RPMV Stammbäumen, wurden die funktionell entscheidenden as-Sequenzen verwendet. Es wurde keine Outgroup hinzugefügt (Abb. 18).

Die Aufzweigung der beiden Stammbäume entsprach, mit Ausnahme des *Hendra Virus*, das erst kürzlich in die Taxonomie integriert wurde, der ICTV-Taxonomie (Lamb et al., 2000). In beiden Berechnungen gruppiert das FDLV mit dem *Sendai Virus*.



**Abbildung 18: Stammbäume von Paramyxovirus Typspezies und FDLV**

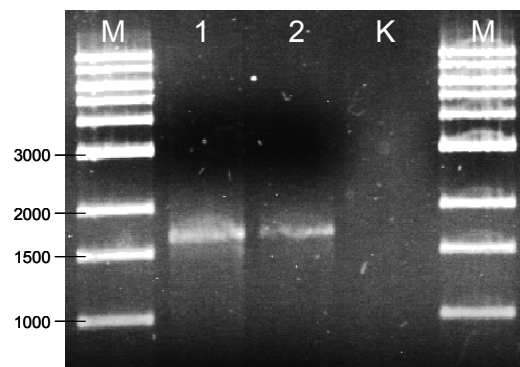
Die Berechnung basiert auf *100 bootstrap value* und *maximum parsimony*. Die Werte auf den Verzweigungen repräsentieren die Wahrscheinlichkeit der Verzweigung bezogen auf den *100 bootstrap value*. HRSV, *Humanes Respiratorisches Syncytialvirus*. Das FDLV gruppiert mit dem *Sendai Virus*.

- A) Stammbaum berechnet mit 700 Aminosäuren des L Proteins.  
 B) Stammbaum berechnet mit 546 Aminosäuren des F Proteins.

### 3. Fusionsgen Analyse

#### F Gen spezifische RT-PCR

Die RT-PCR, spezifisch für das gesamte F Gen des RPMV Gono-GER85, resultierte in einem zwischen 1500 und 2000 bp großen DNA Amplifikat (Abb. 19). Die Sequenzierung des Amplifikates ergab einen 1638 bp großen Leserahmen für das F Gen. Nach dem Alignment mit den F Sequenzen der Paramyxovirus Typspezies konnte eine Homologie von mindestens 42 % auf nt-Ebene und von 28 % auf aa-Ebene zum *Sendai Virus* berechnet werden. Dies deckt sich mit den Werten, die für das FDLV errechnet wurden (Tab. 6, 7).



#### **Abbildung 19: F Gen spezifische RT-PCR**

Agarosegel, 1,3 %. Amplifikat der F Gen spezifischen RT-PCR des RPMV Gono-GER85 (1, 2). Negativ-Kontrolle (K); Marker, 1 kb Leiter (M).

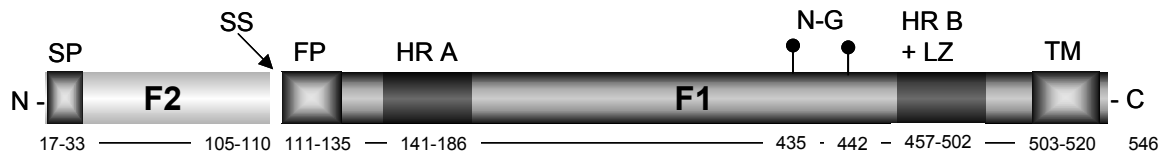
**Tabelle 7: Vergleich von F Gen und Protein des RPMV Gono-GER85 und Paramyxovirus Typspezies**

HRSV (*Humanes Respiratorisches Syncytial Virus*), nt (Nukleotide), as (Aminosäuren), Sim (Ähnlichkeit der Aminosäuren)

Genus	Virus	F Sequenz		Homologie	
		nt	as	nt	as
	Gono-GER85	1638	546	100	100
Respirovirus	Sendai Virus	1725	575	42	28 (50)
<i>Morbillivirus</i>	<i>Masern Virus</i>	1650	550	40	27 (49)
<i>Henipavirus</i>	<i>Hendra Virus</i>	1638	546	39	27 (62)
<i>Rubulavirus</i>	<i>Mumps Virus</i>	1614	538	26	23 (45)
<i>Pneumovirus</i>	HRSV	1722	574	17	22 (48)

#### RPMV Gono-GER85 F Protein Modell

Eine Analyse der F Proteinsequenz mit den in Kapitel III.3. angegebenen Programmen, ermöglichte die Erstellung eines Modells für das F Protein. Es beinhaltet beginnend am C-Terminus ein Signalpeptid, ein Schnittprozessierungsmotiv, das Fusionspeptid, zwei Heptad Repeats, von dem eines den Kriterien eines Leuzin Zippers entspricht und am N-Terminus des Proteins einen Transmembrananker (Abb. 20).

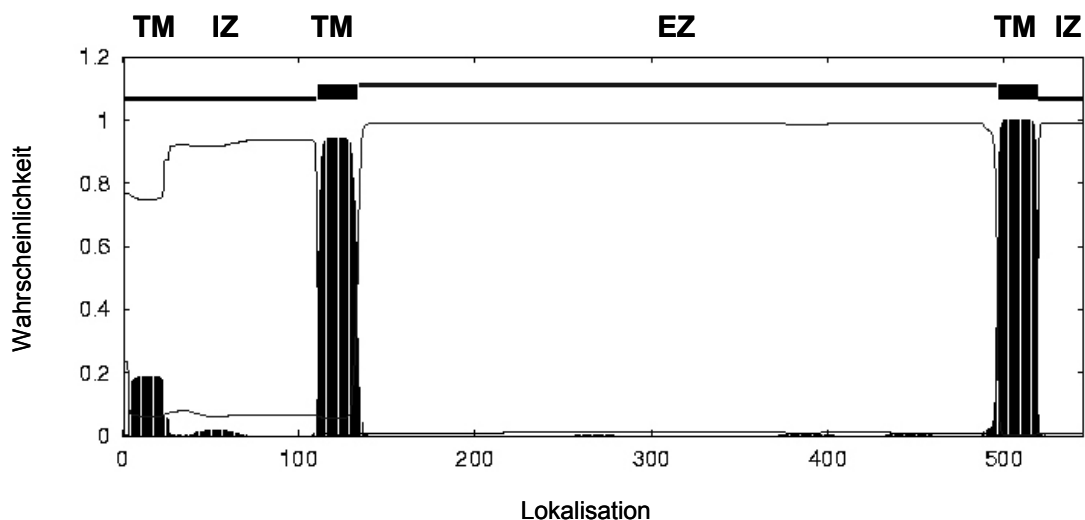


### Abbildung 20: Modell des RPMV F Proteins

Das RPMV Gono-GER85 F Protein enthält eine F1- und die F2-Untereinheit und zeigt von links am N-Terminus das Signalpeptid (SP), die Schnittstelle (SS), das Fusionspeptid (FP), das Heptad Repeat A (HR A), das Heptad Repeat B mit dem Leuzin Zipper (HR B + LZ) und den Transmembrananker (TM). Zwei N-Glykosylierungen (N-G) konnten ermittelt werden. Die Aminosäuren der einzelnen Motive sind unter dem Modell angegeben.

### Transmembranregionen, Signalpeptid (SP)

Für das RPMV F Protein konnten mittels Computerprogramm (*TMHMM1.0*, Center for Biological Sequence Analysis) drei transmembran gelegene Domänen lokalisiert werden (Abb. 21). Die C-terminal gelegene transmembran-Region stimmt mit dem Resultat aus der Signalpeptid Analyse (*SignalP V2.0, Vers. B2*, Center for Biological Sequence Analysis), Aminosäuren 17 bis 33, überein.



### Abbildung 21: Transmembranregionen des RPMV F Proteins

Das Programm berechnet die Wahrscheinlichkeit (y-Achse) mit der die Aminosäurenreste (x-Achse) intrazellulär (IZ), extrazellulär (EZ) oder transmembran (TM) liegen. Für das virale F Protein wurden drei Transmembranregionen vorhergesagt.

### Transmembranregionen, Fusionspeptid (FP)

Die mittlere transmembran-Domäne (Abb. 21) schließt direkt an die Schnittstelle des F Prä-Proteins an und wurde nach dem Vergleich mit den Typspezies der *Paramyxovirinae* als Fusionspeptid identifiziert (Aminosäuren 111 bis 135; Lamb & Kolakovsky, 2001). Dieses hochkonservierte Motiv besteht ausschließlich aus den hydrophoben Aminosäureresten F, V, I, L, A und den polaren Aminosäureresten T, Q, G, S (Abb. 22). Die Gesamtladung dieses Peptides ist neutral. Seine Position zum davon C-terminal gelegenen HR A ist fünf Aminosäuren entfernt.

Gon-GER85	FVGIAIAVGAVALATSAQITAGI-
<i>Sendai Virus</i> (M30202)	FFGAVIGTIALGVATSAQITAGI-
<i>Masern Virus</i> (E04903)	FAGVVLAGAALGVATAAQITAGI-
<i>Mumps Virus</i> (AF143383)	FAGIAIGIAALGVATAAQVTAAV-
<i>Hendra Virus</i> (AF017149)	LAGVVMAGIAIGIATAAQITAGV-
	: * .:. *:.:***:***:***:.

### **Abbildung 22: F Protein Fusionspeptide**

Alignment der Fusionspeptide des RPMV Gono-GER85 und der Typspezies der Subfamilie *Paramyxovirinae*. Der fusionierende N-Terminus liegt links und wird nach Schnittprozessierung frei (Abb. 3). Die Peptide besitzen einen hohen Anteil an identischen (\*), funktionell und biochemisch ähnlichen (:.) und funktionell ähnlichen (.) Aminosäuren.

### Transmembranregionen, Transmembrananker (TM)

Die als dritte transmembran-Domäne berechnete N-terminal gelegene Region (Abb. 21), repräsentiert ihrer Lokalisation zufolge den Transmembrananker (Aminosäuren 503 bis 520). Er setzt sich ausschließlich aus den hydrophoben Aminosäuren V, I, L, M, W und den polaren Aminosäuren S und T zusammen und ist wiederum komplett neutral. Dieser TM ist im direkten Anschluss an das Heptad Repeat B lokalisiert.

### Schnittstelle

Die Schnittstelle (SS) der RPMV F Protein Sequenz, die eine Prozessierung des F Prä-Proteins ermöglicht, reicht von Aminosäure 105 bis 110. Ihr Sequenzmotiv lautet „R E K R“ und kann theoretisch von der Endopeptidase *Furin* erkannt werden, die nach dem Motiv „R X R/K R“ schneidet. Diese Protease wird von vielen Paramyxoviren zur posttranslationalen F Protein Prozessierung verwendet (Tab. 8).

**Tabelle 8: F Protein *Furin* Schnittmotive (Lamb & Kolakovsky, 2001)**

Furin Motiv: X (jede Aminosäure), R/K (R oder K). *Humanes Respiratorisches Synzytialvirus* (HRSV). Die RPMV sind in die derzeitige Taxonomie nicht integriert (\*).

<b>Virus/ Protease</b>	<b>Genus</b>	<b>Schnittmotiv</b>
Furin		R X R/K R
Gono-GER85	RPMV *	R E K R
<i>Masern Virus</i>	Morbillivirus	R H K R
<i>Mumps Virus</i>	<i>Rubulavirus</i>	R H R R
HRSV	<i>Pneumovirus</i>	R K R R

### Heptad Repeats (HR) und Leuzin Zipper (LZ)

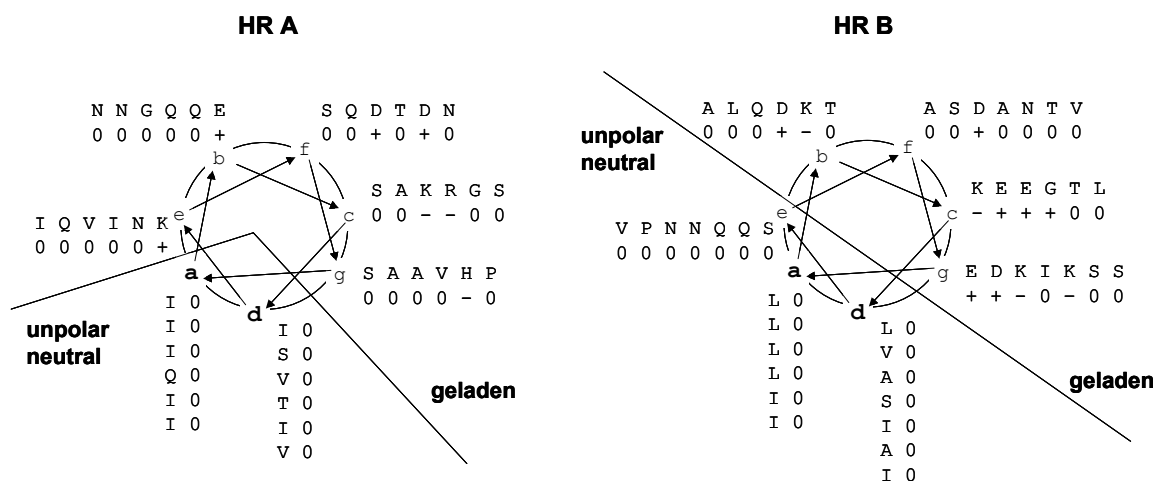
In der F Protein Sequenz des RPMV Gono-GER85 konnten zwei Heptad Repeat Motive (HR) ermittelt werden (*Mac Vector*, International Biotechnologies, New Haven, USA). Das HR A besteht aus sechs Heptads (Aminosäuren 141 bis 186), das HR B aus sechseinhalb Heptads (Aminosäuren 457 bis 502). Sie besitzen in Position a und d (Abb. 4) entweder einen hydrophoben Aminosäurenrest A, I, L, V oder einen polaren Rest S, T, Q (Stryer et al., 1995). Variable Reste sind in den Positionen b, c, e, f, and g lokalisiert.

Das HR B entspricht zusätzlich den Kriterien des Leuzin Zipper Motives (LZ). An Position a des Heptads ist entweder die Aminosäure Leuzin oder Isoleuzin positioniert (Bornberg-Bauer et al., 1998).



Im Modell des helikalen Rades (Joshi et al., 1998) wurden beide HR Motive des RPMV F Proteins dargestellt. Das HR A nimmt, bei a angefangen, sechs Windungen ein, die zentrifugal fortlaufen. Das HR B beginnt bei d und nimmt sechseinhalb Windungen ein (Abb. 23). Da ein Heptad im natürlichen Protein 1,9 Windungen der alpha-Helix repräsentiert (Stryer et a., 1995), ergibt das HR A theoretisch 11,4 Windungen und das HR B 12,4 Windungen im natürlichen Protein.

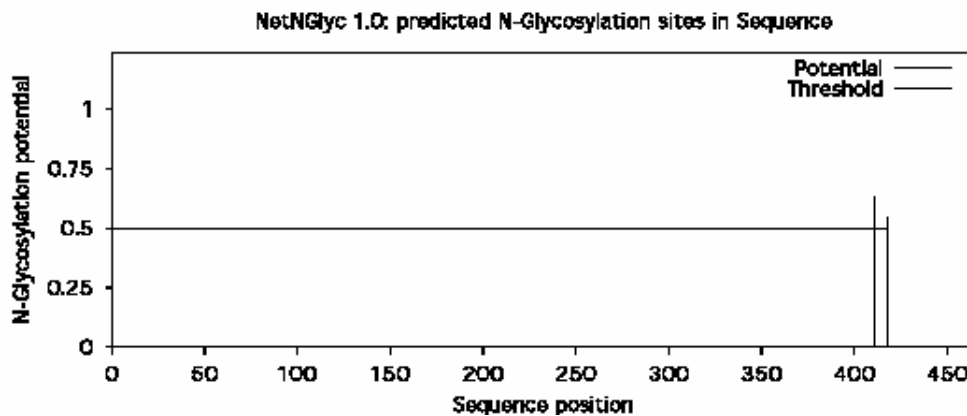
Berücksichtigt man die Ladungen der Aminosäurenreste, dann lassen sich am Protein zwei Seiten, eine geladene und eine polar/ neutrale, unterscheiden (Abb. 23).



**Abbildung 23: Heptad Repeat A und B mit Leuzin Zipper des RPMV F Proteins**  
Das Modell des helikalen Rades (Joshi et al., 1998) repräsentiert einen Querschnitt durch die alpha-Helix der Heptad Repeats. Es ist das HR A, Aminosäuren 145 bis 186 und das HR B, Aminosäuren 457 bis 502 des RPMV Gono-GER85 F Proteins dargestellt. Weiterhin sind geladene und unpolar/ neutrale Bereiche der Domäne dargestellt. Die Ladungen der einzelnen Reste sind mit 0 (neutral), - (negativ) und + (positiv) bezeichnet.

### Glykosylierung

Eine Berechnung des RPMV F Proteins ergab zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen, Asp 435 und Asp 442, die mit mehr als 50 %iger Wahrscheinlichkeit vorkommen (Abb. 24).



#### Abbildung 24: N-Glykosylierungen des RPMV F Proteins

Das Programm (NetNGlyc1.0) berechnet die Wahrscheinlichkeit (y-Achse) mit der ein Aminosäurenrest (x-Achse) glykosyliert wird. Für das RPMV F Protein wurden zwei N-Glykosylierungen, Asp 435 und Asp 442, berechnet, die über der Grenze von 50 % Wahrscheinlichkeit lagen.

### 4. Vorarbeiten zur prokaryotischen Expression

#### 4.1. Expressionssystem

##### Kodon Zusammensetzung

Der Vergleich der Kodon Zusammensetzung (KZ) des RPMV F Gens und des *E. coli* Genomes zeigte erhebliche Differenzen. Im gesamten viralen F Gen kommen 12 Kodons um 50 % häufiger vor als im Prokaryonten *E. coli* (Tab. 9). Der *E. coli* Stamm *Rosetta(DE3)* (Novagen, Madison, USA) kann den t-RNA Defizit an vier dieser Kodons aufgrund seines zusätzlichen Plasmids kompensieren (Kap. III.4.1.).

**Tabelle 9: Kodon Zusammensetzung, *E. coli* Genom und RPMV F Gen**

Die KZ von *E. coli* (3662594 Kodons) und dem RPMV Gono-GER85 F Gen (546 Kodons) ist jeweils hochgerechnet pro Tausend angegeben. Die im viralen Protein um 50 % häufiger vorkommenden Kodons sind fett gedruckt. Unterstrichen sind die Kodons, die im *E. coli* Stamm *Rosetta(DE3)* (Novagen) zusätzlich gebildet werden.

<b>X--</b>	<b>-X-</b>								<b>--X</b>
	<b>-U-</b>		<b>-C-</b>		<b>-A-</b>		<b>-G-</b>		
	<i>E. coli</i>	F Gen	<i>E. coli</i>	F Gen	<i>E. coli</i>	F Gen	<i>E. coli</i>	F Gen	
<b>U--</b>	22	17	10	<b>22</b>	17	9	5	<b>15</b>	<b>--U</b>
	16	7	9	11	12	6	6	6	<b>--C</b>
	14	20	9	17	2	1	1	0	<b>--A</b>
	13	17	9	9	1	0	14	6	<b>--G</b>
<b>C--</b>	12	9	08	<b>18</b>	13	0	20	0	<b>--U</b>
	10	13	<u>05</u>	4	9	4	20	0	<b>--C</b>
	<u>04</u>	<b>18</b>	<u>09</u>	7	15	26	4	0	<b>--A</b>
	48	15	21	11	28	22	<u>6</u>	2	<b>--G</b>
<b>A--</b>	30	28	10	<b>40</b>	21	31	10	7	<b>--U</b>
	24	33	22	22	21	22	15	15	<b>--C</b>
	<u>07</u>	<b>40</b>	09	<b>24</b>	35	22	<u>04</u>	<b>18</b>	<b>--A</b>
	26	22	14	13	12	<b>31</b>	<u>02</u>	<b>7</b>	<b>--G</b>
<b>G--</b>	20	22	17	17	33	29	26	11	<b>--U</b>
	14	<b>29</b>	24	24	19	18	27	9	<b>--C</b>
	12	20	21	29	39	15	<u>10</u>	<b>17</b>	<b>--A</b>
	24	22	30	11	19	22	11	20	<b>--G</b>

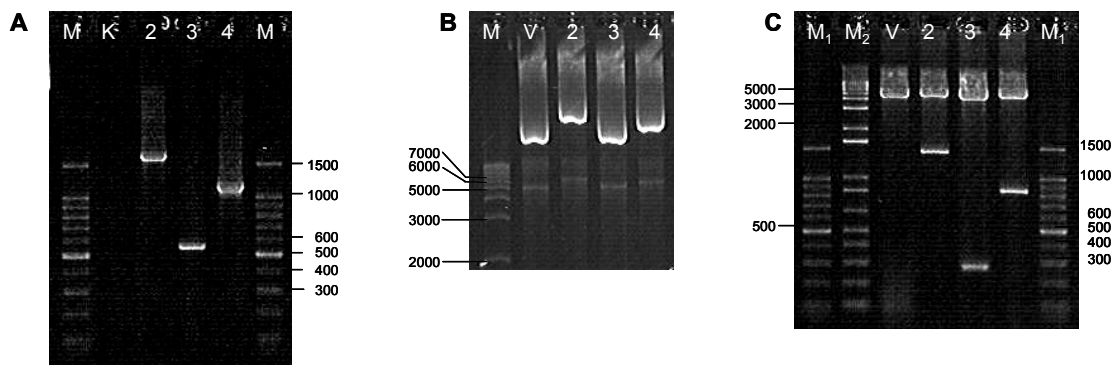
## 4.2. Konstruktion der Plasmide

### Insert-Vektor Präparation

Die Insert-DNA konnte aus der viralen RNA des RPMV Gono-GER85 mittels RT-PCR amplifiziert werden. Die Amplifikate entsprachen den erwarteten Größen, für das erste Insert 1638 bp, für das zweite Insert 1395 bp, für das dritte Insert 255 bp und für das vierte Inserts 1050 bp. Die Insert- und Vektor-DNA konnte mit den Restriktionsenzymen (*Bgl II* und *Xho I*) geschnitten werden. Es folgte die Ligation zu den entsprechenden vier Plasmiden. Die vektorspezifische PCR ergab für jedes Plasmid die erwartete

Amplifikatgröße mit 1971 bp für das erste Plasmid, 1728 bp für das zweite Plasmid, 588 bp für das dritte Plasmid 3 und 1383 bp für das vierte Plasmid (Abb. 25 A). Durch die Sequenzanalyse konnte die Einhaltung des Leserahmens und die Vollständigkeit des Inserts bestätigt werden.

Nach der Plasmid-Transformation, Vektorvermehrung und Plasmid-Aufreinigung, konnten die Inserts mit den Restriktionsenzymen (*Bgl II* und *Xho I*) aus dem Originalvektor (pET30a(+), Novagen, Madison, USA) herausgeschnitten und im Agarosegel visualisiert werden (Abb. 25 B,C). Die vier verschiedenen, kontrollierten Plasmide konnten in den *E. coli* Expressionsstamm *Rosetta(DE3)* (Novagen, Madison, USA) transformiert werden.



#### Abbildung 25: Plasmid-DNA 2, 3 und 4

Das erste Plasmidkonstrukt war separat konstruiert worden und ist daher in den Abbildungen nicht enthalten.

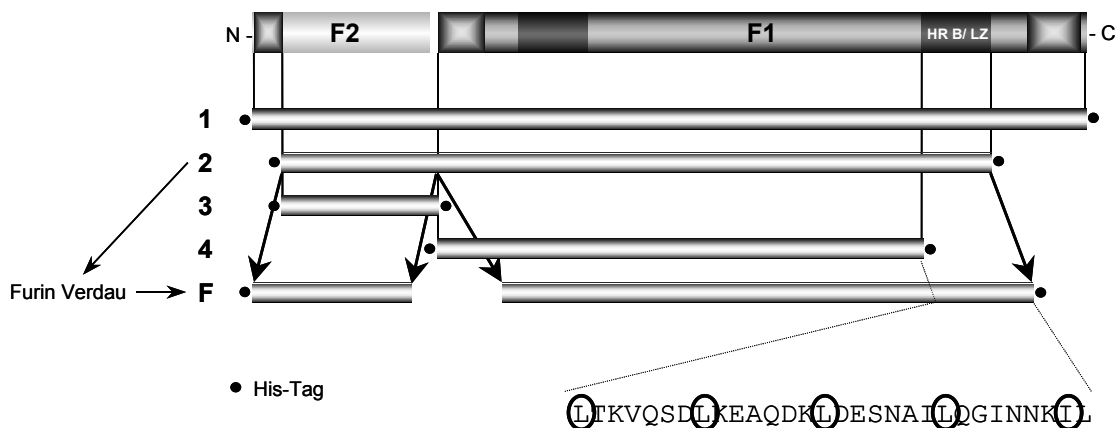
Agarosegele (1,3 %), Marker (M), Plasmidkonstrukte 2, 3 und 4.

- A) Die vektorspezifische PCR (Abb. 8: T7P – T7T) amplifiziert das Insert und zusätzlich 333 nt des Vektors: PCR-Kontrolle (K), 1728 nt (2), 588 nt (3), 1383 nt (4).
- B) Plasmide ungeschnitten, in *supercoiled* Form, setzen sich aus Insert-DNA und Vektor-DNA zusammen: 5422 nt pET30a(+)-Vektor (V), 6740 nt (2), 5600 nt (3), 6395 nt (4).
- C) Die Plasmide sind mit Restriktionsenzymen (*Bgl II* und *Xho I*) geschnitten. Banden zeigen Vektor-DNA und Insert. 5400 nt pET30a(+)-Vektor (V), 1395 nt (2), 255 nt (3), 1050 nt (4).

### 4.3. Modell und Berechnung erwarteter Proteine

Im Modell wurden die Anteile der jeweiligen erwarteten rekombinanten Proteine 1 bis 4, sowie der Fragmente nach dem Furin Protease-Verdau veranschaulicht. Die zur Detektion und Aufreinigung dienenden His-Tags sind sowohl am C-, als auch am N-Terminus der rekombinanten Proteine, sowie an je einem Ende der Proteinfragmente des Furin-verdauten Proteins 2 zu erwarten (Abb. 26).

Besonders hervorgehoben ist der Unterschied zwischen dem rekombinanten Protein 4 und dem F1-Anteil des rekombinanten Protein 2 nach dem Furin Protease-Verdau. Dieser besteht ausschließlich aus 30 Aminosäuren, die das Heptad Repeat B und zugleich das Leuzin Zipper Motiv beinhalten (Abb. 26).



#### Abbildung 26: Modell der verschiedenen Proteine des RPMV F Proteins

RPMV F Protein: N- bzw. C-Terminus, Untereinheiten F2 und F1, Heptad Repeat B mit Leuzin Zipper (HR B/ LZ). Rekombinante Proteine 1-4, Furin Protease-Verdau (F).

Zur Interpretation der Protein Analyse (Abb. 27, 28) wurden die berechneten Größen und Molekulargewichte der rekombinanten Proteine, sowie der Fragmente des Furin Protease-Verdau in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Größe und Molekulargewicht der verschiedenen Proteine**

Rekombinantes Protein (RP), Positiv-Kontrolle (K), Furin Proteaseverdau (F); Monomer (\*).

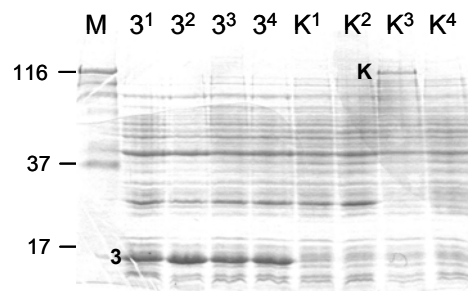
<b>Protein</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>MW (kD)</b>
F Protein	546	58,3
RP 1	546	62,1
RP 2	465	54,6
RP 3	85	14,4
RP 4	350	42,0
RP 2 Furin 1	85	13,3
RP 2 Furin 2	380	41,3
$\beta$ -Galaktosidase	1170*	120,0

## **5. Proteinanalyse**

### **5.1. Gesamtprotein der induzierten Expressionsansätze und Kontrollen**

Die Expression des gesamten F Gens war nicht erfolgreich. Es konnte kein Protein der erwarteten Größe von 62 kD (Tab. 10) oder einer anderen Größe mittels SDS PAGE oder Anti-His spezifischem WB nachgewiesen werden (Abb. nicht dargestellt).

Die Expression des Konstruktes 3 resultierte im erwarteten, zusätzlichen 14 kD großen Protein in der SDS PAGE (Tab. 10). Das Protein konnte im gesamten Induktionszeitraum von ein bis vier Stunden detektiert werden (Abb. 27).



### Abbildung 27: SDS PAGE, rekombinantes Protein 3

Bakterielles Gesamtprotein des Induktionsansatz von Plasmid 3 im Verlauf von 1 h bis 4 h nach IPTG Zugabe ( $3^{1-4}$ ). Kontrollen: nicht induzierter Klon 3 ( $K^1$ ), induzierte Negativ-Kontrolle ( $K^2$ ), induzierte Positiv-Kontrolle ( $K^3$ ). Nicht-induzierte Positiv-Kontrolle ( $K^4$ ), Marker (M). Die erwarteten Größen des rekombinanten Proteins (3) ist 14 kD, der Positiv-Kontrolle (K) ist 120 kD (Tab. 10).

Die Expression der Plasmidkonstrukte 2 und 4 konnten im SDS PAGE nicht erkannt werden (Abb. 28 IA).

Im Anti-His spezifischen WB konnten die Expressionsprodukte der Plasmide 2, 3 und 4 mittels des monoklonalen Antikörpers (mAK) detektiert werden (Abb. 28 IB). Das rekombinante Protein lag im Bereich von 55 kD, das rekombinante Protein 3 im Bereich von 14 kD und das rekombinante Protein 4 im Bereich von 42 kD (Tab. 10).

Im Anti-RPMV spezifischen WB konnte keines der exprimierten Proteine mittels des polyklonalen Antiserums (pAK) detektiert werden. Für alle Proben der bakteriellen Protein zeigten sich identische, unspezifische (*background*)-Banden verschiedener Größen (Abb. 28 IC).

Zur Kontrolle diente ein ebenfalls induzierter Klon mit Vektor ohne Insert (Abb. 28 I:  $K^-$ ) und ein nicht-induzierter Klon der Positiv-Kontrolle (Abb. 28 I:  $K^N$ ; vgl. Kap. III.5.1.). Diese reagierten nicht spezifisch mit dem Anti-His mAK oder dem Anti-RPMV pAK (Abb. 28 IB, C:  $K^-$ ,  $K^N$ ). Die Positiv-Kontrolle reagierte mit dem Anti-His mAK, es konnte die 120 kD  $\beta$ -Galaktosidase, entsprechend der erwarteten Größe detektiert werden (Abb. 28 IB:  $K^1$ ). Die Positiv-Kontrolle des Anti-RPMV pAK, die Virusproteine des RPMV Gono-

GER85 reagierten im WB als stark positiv. Es konnte kein spezifisches Virusprotein zugeordnet werden (Abb. 28 IC: V). Die Negativ-Kontrolle der Virusproteine, die IgH<sub>2</sub>-Zellen (Kap. III.5.4.), reagierten nicht mit dem pAK (Abb. 28 IC: Z). Dies zeigt, dass der pAK ausschließlich virale Proteine detektiert.

## **5.2. Aufgereinigte rekombinante Proteine**

Nach der Protein-Aufreinigung mittels NiNTA-Säulen (Novagen) konnte wiederum kein Expressionsprodukt für das Plasmid 1, mit dem Insert des gesamten F Gens, detektiert werden (Abb. nicht dargestellt). Für die rekombinanten Proteine 2, 3 und 4 konnte nach der Aufreinigung Protein entsprechend des erwarteten Molekulargewichtes (Tab. 10) im SDS PAGE visualisiert werden (Abb. 28 IIA).

Die Detektion mittels Anti-His spezifischem mAK resultierte in den gleichen rekombinanten Proteinen der erwarteten Größen (Tab. 10; Abb. 27 IIB).

Die Detektion mittels des Anti-RPMV pAK resultierte in einer Bande für das rekombinante Protein 2 in der erwarteten Größe von 55 kD (Abb. 28 IIC).

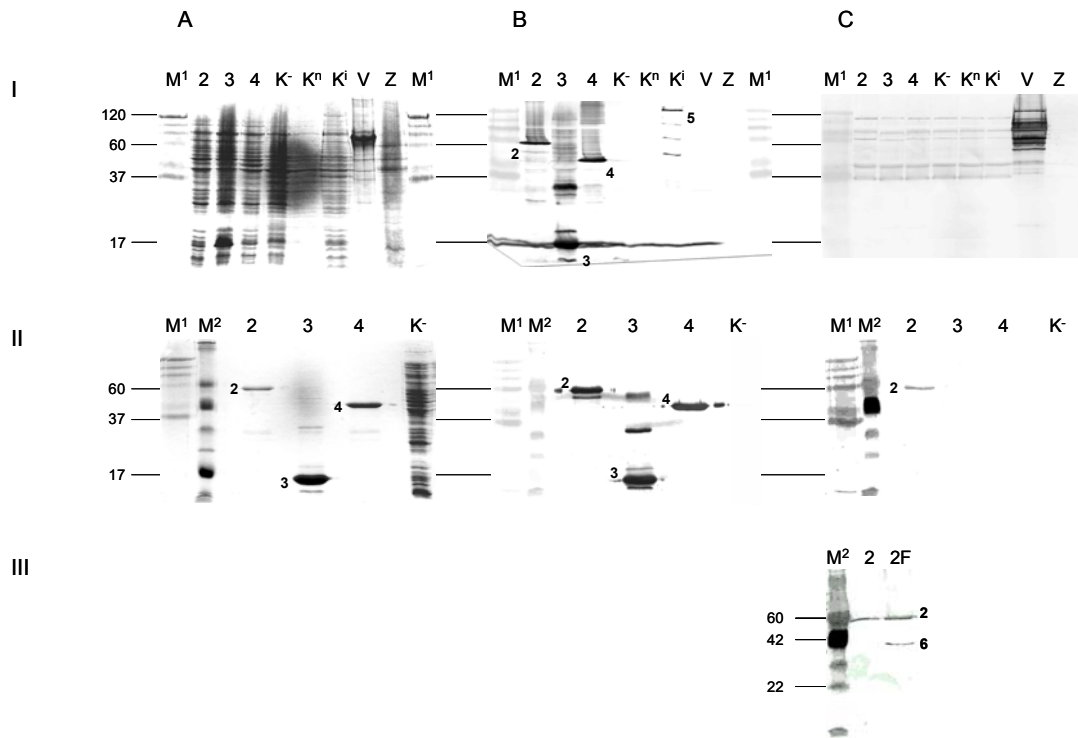
## **5.3. Furin Protease-Verdau**

Durch Proteindialyse konnte das rekombinante Protein 2 im Furin Puffer bei pH 7,5 gelöst werden. Nach dem Furin Protease-Verdau wurde im SDS PAGE sowohl das unprozessierte rekombinante Protein 2, als auch das Furin Protease-verdaute Protein visualisiert (Abb. nicht dargestellt).

Der Anti-RPMV pAK detektierte zusätzlich zum rekombinanten Protein 2 das 41 kD große Fragment der F1-Untereinheit (Tab. 10; Abb. 28 IIIC).

Dieses Resultat zeigt, dass das Heptad Repeat B, zugleich das Leuzin Zipper Motiv, ein lineares Epitop darstellt, das antigenetisch reaktiv ist.





### Abbildung 28: SDS PAGE und WB rekombinanter F Proteinfragmente

SDS PAGE (A) und Westernblots (WB) mit Anti-His mAK (B) und Anti-RPMV pAK (C). Marker (M<sup>1</sup>, M<sup>2</sup>), Kontrolle: Vektor ohne Insert (K<sup>-</sup>), Positiv-Kontrolle nicht-induziert (K<sup>N</sup>), Positiv-Kontrolle induziert (K<sup>I</sup>), gereinigte RPMV Proteine (V), IgH<sub>2</sub>-Zellen (Z). rekombinante Proteine 2, 3 und 4, Furin verdautes Protein 2 (2F).

Rekombinantes Protein 2: 55 kD, Protein 3: 14 kD, Protein 4 42 kD.

I: Gesamtprotein *E. coli* Expressionsstamm.

II: Ni-NTA aufgereinigte Proteine.

III: Furin-Protease Verdauung.

Beschreibung im Text.

## **V. Diskussion**

### **1. Identifizierung**

Der für Paramyxoviren typische cpE, die Bildung von Syncytien und intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen (Clark et al., 1979; Ahne & Neubert 1989; Modrow et al., 2003), konnte in dieser Arbeit auch für die RPMV festgestellt werden (Kap. IV.1.; Abb. 12).

Die Identifizierung der RPMV durch Elektronenmikroskopie resultierte in den für Paramyxoviren typischen pleomorphen Virionen mit einer durchschnittlichen Größe von 190 bis 480 nm (Lamb et al., 2000). Wie aus der Literatur bekannt, zeigten sich die Partikel behüllt und ihr charakteristisches Nukleokapsid (Kap. IV.1.; Abb. 13; Clark et al., 1979).

In der L Gen spezifischen PCR konnte die RNA aller untersuchter RPMV amplifiziert und auch sequenziert werden (Kap. IV.1.; Abb. 14, 15). In der F Gen spezifischen RT-PCR waren die RNA zweier Isolate hingegen nicht zu amplifizieren (Kap. IV.1.; Abb. 14, 16). Einem negativen PCR-Ergebnis können viele Ursachen zugrunde liegen (O'Connell, 2002):

Von Einzelstrang-Viren, wie beispielsweise Paramyxoviren, wird zunächst, nach Binden des Startprimers, ein cDNA Strang amplifiziert. Erst jetzt passt der Stopprimer an diese komplementäre DNA. Ein positives PCR Resultat bei Paramyxoviren ist folglich, neben anderem, abhängig von der Bindung des Startprimers. Weitere Ereignisse für eine negativ ausfallende PCR können in der Probenqualität, Enzymqualität, im Lösungsmilieu begründet sein (O'Connell, 2002).

Für beide Isolate sind diese Gründe unwahrscheinlich, da ihre Amplifizierung in der L Gen spezifischen PCR möglich war und alle anderen Isolate mittels F Gen spezifischer PCR amplifiziert werden konnten (Abb. 14). In den angeführten Untersuchungen ergab das L Gen Sequenz-Alignment für diese beiden Isolate eine von allen anderen Isolaten unterschiedliche Sequenz (Abb. 15), in der phylogenetischen Untersuchung bilden sie ein

eigenes Cluster (Abb. 17A). Somit ist anzunehmen, dass ihre Sequenz im F Gen-Bereich in einem Masse abweicht, das ein Binden der F Gen spezifischen Primer nicht erlaubt. Dies müsste noch in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Es ist weiterhin bemerkenswert, dass die Isolate mit identischer Sequenz (Abb. 15, 16; Tab. 6) aus dem gleichen Jahr und dem gleichen Bestand stammten, aber teilweise von verschiedenen Schlangenspezies isoliert wurden (Tab. 2). Es existieren demnach in bestimmten Beständen genomisch einheitliche RPMV, die aber offensichtlich keine strenge Wirtsspezifität besitzen. Diese Erkenntnisse decken sich mit den von Ahne et al. (1999b) publizierten Ergebnissen.

## **2. Taxonomie**

### **Klassifizierung**

Die Klassifizierung von Viren basierte bis vor einigen Jahren ausschließlich auf den klassischen Methoden wie Morphologie, cpE, physikalisch-chemischen Eigenschaften, antigenetischen Untersuchungen oder die Untersuchung von Virusproteinen (Brenner & Horne, 1959; Mayr et al., 1974). Diese klassischen Methoden der Virologie wurden in letzter Zeit von moderneren Methoden, wie Genomanalysen nach PCR und datenreichen Genomvergleichen durch Computerprogramme, ergänzt (ICTV, 2003). Auf ihnen basiert die Berechnung der phylogenetischen Verwandtschaft (Felsenstein, 1993; Westover & Hughes, 2001).

Die hier untersuchten RPMV konnten einerseits mittels klassischer Methoden identifiziert werden (Kap. IV.1.). Weiterhin zeigte die Sequenzanalyse der RPMV untereinander, dass nicht alle Isolate identisch waren. Es konnten Divergenzen von maximal 21 % auf nt-Ebene und 6 % auf as-Ebene festgestellt werden (Tab. 6). Die RPMV sind durch das FDLV in der existierenden Taxonomie anerkannt, aber in die Systematik bisher noch nicht eingeordnet (Lamb et al., 2000; ICTV, 2003).

Durch ein Sequenz-Alignment und die phylogenetische Analyse konnte die nächste Verwandtschaft der RPMV zum *Sendai Virus* gezeigt werden (Abb. 18, Tab. 6). Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Ahne et al. (1999b) überein. Dennoch unterscheidet sich die Gruppe der RPMV durch eine Divergenz von mindestens 44 % auf nt-Ebene und 39 % auf as-Ebene. Nach Yu et al. (1998) unterscheiden sich die Gensequenzen von Viren innerhalb eines Genus um maximal 40 % auf nt-Sequenzebene.

Im Folgenden werden zusätzliche Argumente aufgelistet, die die Gruppe der RPMV von den klassifizierten Paramyxoviren unterscheidet:

#### Wirtsklasse und Temperatur

Wie in Kapitel II.4. dargestellt, gehören die Wirte der RPMV der Klasse *Reptilia* an, die sich von den homoiothermen Lebewesen durch die wechselwarme Körpertemperatur unterscheidet (Grzimek et al., 2000). Die Körpertemperatur der Wirte entspricht einer optimalen Vermehrungstemperatur, die von mehreren Autoren für die RPMV mit 30°C beschrieben wurde (Lunger & Clark, 1979a, b; Ahne et al., 1999a). In der vorliegenden Arbeit konnten die RPMV bei 28°C *in vitro* optimal repliziert werden.

#### Antigenetische Eigenschaft

Wie in Kapitel II.4. dargestellt, wurde bisher keine Kreuzreaktion zwischen RPMV und den Typspezies der *Paramyxoviridae* gefunden (Clark et al., 1979; Ahne & Neubert, 1989). Lediglich in Untersuchungen durch Blahak (1995) mittels Hämagglutinations-Hemmungstest ergaben sich positive Kreuzreaktionen zwischen RPMV und aviären Paramyxoviren. Die Gruppe der aviären Paramyxoviren wurde kürzlich als Genus *Avulavirus* reklassifiziert (De Leeuw & Peeters, 1999; Seal et al., 2000; ICTV, 2003). Vergleichende Untersuchungen zwischen dieser Virengruppe und den RPMV müssten noch intensiviert werden.

In der vorliegenden und auch in früheren Arbeiten wurde die nächste Verwandtschaft zum *Sendai Virus* (Genus *Respirovirus*) dargestellt (Ahne et al., 1999b). Zu diesem Virus konnten von mehreren Autoren keine Kreuzreaktionen zu den RPMV festgestellt werden (Clark et al., 1979; Ahne & Neubert, 1989; Richter et al., 1996). Auch wird das F Prä-Protein durch unterschiedliche Wirtszellproteasen gespalten (vgl. Kap. V.3.).

### Vorschlag eines neuen Genus für RPMV

Zusammengefasst existieren zwischen den taxonomisch erfassten Paramyxoviren und den RPMV erhebliche Sequenzunterschiede; insbesondere Unterschiede in den phylogenetischen Untersuchungen der partiellen L und F Gene und dem durch Ahne et al. (1999b) untersuchten HN Gen. Die Reptilienviren sind an ihre poikilothermen Wirte gebunden und replizieren bei Temperaturen unter 30°C. Ihre F Protein Schnittprozessierung variiert von der des nächstverwandten *Sendai Virus* und es existieren unterschiedliche antigenetische Eigenschaften. Diese Gründe sollten es nahe legen, ein neues Genus für die RPMV zu etablieren. Als Typspezies für das neue Genus könnte das genomisch sequenzierte FDLV anerkannt werden (Kurath et al., 2003).

### **3. Fusionsprotein**

Paramyxovirale F Gene kodieren für ein Signalpeptid und eine Protease-Sequenz, die eine F1- von einer F2-Untereinheit unterteilt. Sie enthalten weiterhin ein Fusionspeptid, zwei Heptad Repeat Strukturen mit einem Leuzin Zipper und einen Transmembrananker (Lamb & Kolakovsky, 2001). Für das Reptilienvirus Gono-GER-85 konnten alle diese Motive im Modell gezeigt werden (Kap. IV.3.).

### Schnittmodifizierung

Das PMV F Protein ist ein Typ I Transmembranprotein und wird durch Schnittprozessierung seiner Prä-Protein Form in die biologisch aktiven F1 und F2 Untereinheiten übergeführt (Klenk et al., 1975).

In der RPMV F Protein Sequenz wurde das *Furin* Schnittmotiv ermittelt (Kap. IV.3.) und konnte durch den Verdau mittels der Endopeptidase Furin *in vitro* verifiziert werden (Kap. IV.5.3.). Das Schnittmuster der Endopeptidase Furin besteht aus vier Aminosäuren, drei davon sind definiert (multibasisches Schnittmuster; Klenk & Garten, 1994; Patterson et al., 2000). Furin ist ubiquitär im Golgi-Apparat der Zellen vieler Körpergewebe vorhanden (van den Ouweland et al., 1990; Hosaka et al., 1991). Die RPMV sind diesbezüglich auch in verschiedenen Zellkulturen anzüchtbar (Lunger & Clark, 1979a). In dieser Arbeit wurden RPMV sowohl in Reptilien-Herz- (IgH<sub>2</sub>), als auch in Säugetier-Nierenzellen (Vero) vermehrt (Kap. IV.1.).

Das *Sendai Virus* hingegen, obwohl es den RPMV am ähnlichsten zu sein scheint (Kap. IV.2.), nutzt für seine Prä-Protein Schnittprozessierung die Trypsin-ähnliche *Tryptase Clara* (Tashiro et al., 1992). Das Schnittmuster besteht nur aus der Aminosäure Arginin, diese Schnittstelle ist *monobasisch* (Klenk & Garten, 1994). Die Tryptase Clara kommt ausschließlich bei bestimmten Epithelzellen der Lunge und des Darmes vor (Tashiro et al., 1992). Die Vermehrung des *Sendai Virus* ist folglich ausschließlich dort gewährleistet und auch nicht in jeder Zellkultur möglich (Gotoh et al., 1990).

Für das *Newcastle Disease Virus* (NDV) wurde gezeigt, dass die Schnittprozessierung des F Proteins einen bedeutenden Virulenzfaktor darstellt: Der lentogene Stamm *LaSota*, der normalerweise die monobasische Schnittstelle (G R Q S R / F) besitzt, wurde als rekombinantes Virus mit dem Furin Schnittmotiv (G R Q R R / F) versehen. Dadurch wurde das Virus velogen (Peeters et al., 1999).

Ein nicht-pathogener NDV Wildtyp Stamm wurde durch Passagieren in Hühnern ebenfalls zu einem pathogenen, velogenen Virus. Die Sequenzanalyse der Schnittstelle ergab die Konversion vom E R Q E R / L-Motiv zum *Furin* Schnittmotiv K R Q K R / F (Shengqing et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde das multibasische Motiv des RPMV Gono-GER85 dargestellt. Dieses besitzen auch weitere RPMV Isolate (Franke et al., 2001). Für die Entwicklung eines lentogenen *RPMV-Impf-Virus* könnte man ein rekombinantes Virus mit monobasischer Schnittstelle in Aussicht stellen.

### Fusionspeptid und Transmembrananker

Fusionspeptide und Transmembrananker sind funktionell identische, stark hydrophobe Domänen (Horvarth & Lamb, 1992) und meist direkt neben einem Heptad Repeat (HR) lokalisiert (Peisajovich & Shai, 2002). Beide Domänen wurden auch im RPMV F Protein in direkter Nachbarschaft zu einem HR ermittelt (Kap. IV.3.).

Das paramyxovirale Fusionspeptid induziert die Fusion von Virus und Wirtszelle (Lamb & Kolakovsky, 2001). Im Sendai-Virus-Modell von Peisajovich & Shai (2002) und nach Strukturanalyse des *Newcastle Disease Virus* durch Chen et al. (2001) wurden an den Fusionsprozess folgende Bedingungen geknüpft:

Er kann nur direkt nach einer Konformationsänderung, induziert durch vorangehende Adsorption des Virus an die Zelle, erfolgen. Es müssen mehrere F Protein Moleküle oligomerisieren. Dem Fusionspeptid muss ein HR direkt folgen, und zusammen mit einem zweiten HR die *Helix-Loop-Helix* Struktur für ein Protein ausbilden können.

Im folgenden Abschnitt wird erläutert, welche dieser Bedingungen für die RPMV zutreffen:

### Heptad Repeats und Leuzin Zipper

Die RPMV besitzen das Adsorptionsprotein *HN* (Ahne et al., 1999b). Die Sequenzfolge, HR A im fünf Aminosäuren Abstand zum Fusionspeptid, linearer Bereich und HR B mit direkt anschließenden Transmembrananker (Kap. IV.3.), entspricht der Sequenz-Grundlage für die Formation der *Helix-*

*Loop-Helix* Struktur (Joshi et al., 1998; Peisajovich & Shai, 2002). Hinsichtlich der Oligomerisierung seines F Proteins wurde in dieser Arbeit für die HRs A und B das Modell des helikalen Rades erstellt (Kap. IV.3.; Abb. 23). Diese Sequenzen veranlassen das Protein zur Selbstfaltung in eine alpha-helikale Sekundärstruktur (Chambers et al., 1990; Young et al., 1998).

Die Proteindomänen besitzen weiterhin eine geladene und eine unpolare, neutrale Seite, die zusätzlich ein Leuzin Zipper Motiv beinhaltet (Abb. 23). Dies ist eine Voraussetzung zur Oligomer-Bildung, die auf wechselseitige Anziehung zwischen zwei ungeladenen Bereichen beruht (Stryer, 1995).

Die Fusionsfähigkeit der RPMV wurde aufgrund der Bildung von Syncytien beschrieben (Clark et al., 1979; Ahne et al., 1999b; Mayr et al., 2000). Die Notwendigkeit der HR und Leuzin Zipper Motive im Fusionsprozess wurde durch F Protein HR-Mutanten des *Newcastle Disease Virus* nachgewiesen (Sergel-Germano et al., 1994; Sergel et al., 2001). Die Expression dieser veränderten Proteine und auch die Oligomerisierung, sowie der intrazelluläre Transport blieben unbeeinflusst. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis befand Young et al. (1998) den Defizit der Oligomerisierung nach Ersetzen der Leuzin- bzw. Isoleuzinreste durch ebenfalls unpolare Alaninreste.

Diese Ergebnisse ordnen das HR Motiv in die Reihe der Virulenzfaktoren ein (Buckland et al., 1992; Reitter et al., 1995; Joshi et al., 1998; Young et al., 1998).

Im Falle des Reptilienvirus wurde das HR B mit dem Leuzin Zipper des F Proteins als lineares, antigenetisch reaktives Epitop detektiert (Kapitel IV.5.). Dieser Bereich sollte konserviert sein, da er für die Fusionsaktivität und Virusvermehrung offensichtlich essentiell ist und müsste folglich als antigenetische Zieldomäne hinsichtlich eines *RPMV-Impf-Virus* gut geeignet sein.



## 4. Expression

Für die Proteinexpression wurde der prokaryotische Wirt *E. coli* verwendet. In diesem System kann weder die posttranslationelle Schnittprozessierung, noch die Glykosylierung oder eine Proteinfaltung erfolgen (Robertson et al., 1997). Dies war jedoch für die geplanten Versuche sogar günstig. Die Schnittprozessierung sollte in einem eigenen Versuch *in vitro* analysiert werden (Kap. III.5.3.). Für die Proteinanalysen wurde die SDS PAGE Methode angewendet. Die Proteinsekundärstruktur ist hier nicht mehr existent. Für die Detektion in der WB Methode bedeutet dies jedoch eine Reduktion auf lineare Epitope (Bollag & Edelstein, 1991).

### Prokaryotische Expression

Die Detektion des rekombinanten Proteins 1 war nicht erfolgreich (Kap. IV.5.). Dies deckt sich mit Erfahrungen von Martin-Gallardo et al. (1991) im Versuch der prokaryotischen F Genexpression des *Humanen Respiratorischen Syncytialvirus* F Gens.

Der Grund für geringe oder fehlende Expression eines Gens kann, neben anderem, an der unterschiedlichen Kodonzusammensetzung liegen. Das Protein wird dann nicht, nicht-vollständig oder nicht in großer Menge gebildet (Brinkmann et al., 1989). In der vorliegenden Arbeit konnte ein erhebliches Missverhältnis in der Kodonzusammensetzung von *E. coli* und dem RPMV F Gen ermittelt werden (Tab. 9). Untersuchungen von Park et al. (2002) zeigen, dass der Austausch eines einzigen Kodons im nicht exprimierbaren Gen die Expression ermöglichte.

In dieser Arbeit konnte der *E. coli* Stamm *Rosetta(DE3)* (Novagen) ausschließlich vier von zwölf Kodons kompensieren, die im RPMV F Gen häufiger vorkommen. Dieses Defizit an acht verschiedenen t-RNA Molekülen könnte folglich ausschlaggebend für die fehlende Exprimierbarkeit des Konstruktes 1 gewesen sein.

Die Verkürzung eines zu exprimierenden Gens resultiert im höheren Ertrag an rekombinantem Protein (Martin-Gallardo et al., 1991). Analog war

für Teile des RPMV F Gens die prokaryotische Expression möglich (Abb. 28). Vergleicht man den Ertrag am rekombinanten Protein 2, 3 und 4, so ergab sich eine höhere Ausbeute, je kürzer das rekombinante Protein war (Kap. IV.5.1., 5.2.).

Der Umfang der exprimierten F Protein Fragmente reichte für den Zweck der Detektion antigenetisch reagierender Domänen aus. Das Signalpeptid existiert im funktionellen viralen F Protein nach der posttranslationalen Modifizierung nicht mehr (Lamb, 1993; Lamb & Kolakovsky, 2001; Modrow et al., 2003). Der Transmembrananker befestigt das Protein in der viralen Hülle und nimmt an einer antigenetischen Reaktion nicht teil.

### Proteindetektion

Die Detektion von rekombinantem exprimiertem Protein mittels *Coomassie* Färbung war im bakteriellen Gesamtprotein nur für das Protein 3 erfolgreich (Kap. IV.5.). Oft liegt die untere Grenze der Proteindetektion nach dieser Proteinfärbung im SDS Gel bei 25 ng Protein, die im Western Blot bei 10 pg Protein (Bollag & Edelstein, 1991). Letzterer ist folglich 1000 x sensitiver. Mittels WB und Anti-His mAK konnten rekombinanten Proteine 2, 3 und 4 detektiert werden (Abb. 28 IB). Nach der Aufreinigung, die ebenfalls einer Konzentrierung entspricht, war es möglich, diese Proteine im *Coomassie* gefärbten Proteingel zu sehen (Abb. 28 IIA).

Neben den erwarteten Proteinen, wurden Proteine anderer Größen mittels Anti-His mAK detektiert (Abb. 28 IB, IIB). Diese unspezifischen Reaktionen können existieren, wenn in Proteinen mehrere Histidin-Reste hintereinander vorkommen, die ebenfalls mit dem mAK reagieren (Bollag & Edelstein, 1991). Von Dutch et al. (2000) wurden F Protein Oligomere im SDS PAGE und WB gezeigt, deren Molekulargewicht entsprechend größer waren als das des erwarteten monomeren Proteins. Die Resultate in dieser Arbeit können diesbezüglich nicht interpretiert werden.

Die Positiv-Kontrolle der Expression, eine *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidase, erschien im WB zersetzt. Anstatt nur einer erwarteten 120 kD großen Bande, wurden zusätzlich drei leichtere Banden detektiert (Abb. 28 IB, K<sup>l</sup>). Eine Erklärung könnte in Untersuchungen von Marinkovic et al. (1975) gefunden werden. Durch Hitze wurde die *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidase fragmentiert und zeigte im SDS PAGE vier Fragmente mit Größen zwischen 29 kD und 72 kD.

#### Detektion spezifischer Domänen des RPMV F Proteins

Die Detektionskapazität des Kaninchen-Gono-GER85-Antiserums umfasste, gemessen am viralen Gesamtprotein, einen Bereich zwischen 120 kD und 40 kD (Abb. 28 IC, V). Das RPMV F Protein liegt mit 58,3 kD in diesem Bereich (Tab. 10), konnte allerdings nicht zugeordnet werden. Die Annahme, dass es unter den detektierten Proteinen vorhanden sein müsste, könnte folgend Erklärung finden:

Das RPMV besitzt als Oberflächenproteine HN und F (Ahne et al., 1999b; Franke et al., 2001; Kurath et al., 2003). Das HN Protein der Paramyxoviren ist mit einer Länge von 550 bis 600 Aminosäuren im gleichen Größenbereich wie das F Protein, mit 538 bis 575 Aminosäuren (Lamb & Kolakowsky, 2001). Untersuchungen zeigen, dass die Proteinbereiche, die über die Virusoberfläche hinausragen als Antigen wirken (Wang & Iorio, 1999). Diese Eigenschaft gilt für das RPMV F Protein. Es ist ein, für die Vakzine Entwicklung häufig verwendetes Ziel-Protein (Steward, 2001). Es kann eine Immunantwort im Wirt sowohl auf zellulärer Ebene (Chang et al., 2001; Fogg et al., 2001), als auch auf humoraler Ebene auslösen (Schrijver et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reaktion des Anti-RPMV Serums gegen das prokaryotisch exprimierte partielle F Protein gezeigt werden (Abb. 28 IIC, IIIC). Die Detektion umfasst lineare Epitope der Protein-Primärstruktur, da die Proteinauftrennung mittels SDS PAGE, einem denaturierenden Verfahren vorgenommen wurde (Bollag & Edelstein, 1991).

Aus Abbildung 28 IC (2-4, K<sup>N,I</sup>) ist ersichtlich, dass das Anti-RPMV Kaninchenserum unspezifisch mit *E. coli* Proteinen reagierte. Nach der Aufreinigung allerdings, waren unspezifischen Banden nicht mehr zu sehen (Abb. 28 IIC). Da es sich um polyklonales Kaninchenserum handelt, ist es möglich, dass auch Virus-unspezifische Antikörper präsent sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Serum nicht mit IgH<sub>2</sub>-Zellen reagierte, auf denen das Virus angezüchtet worden war (Abb. 28 IC, Z).

Der Verdau durch die Endopeptidase *Furin* verlief nicht vollständig (Abb. 28 IIIC). Nach Angaben des Herstellers wurden 100 ng Protein mit 2 Units Furin inkubiert (Biolabs, Beverly, USA). Der Protease-Verdau müsste in weiteren Versuchen optimiert werden. Jedoch entsprach das erhaltene Protein RP 2F2 dem erwarteten Molekulargewicht (Abb. 28 IIIC; Tab. 10).

Die Lokalisation des as-Sequenzabschnittes, der durch den Anti-RPMV pAK detektiert worden war, erfolgte durch die Betrachtung zweier in Frage kommender Bereiche:

Das nicht detektierte rekombinante Protein 4 (RP 4) trägt, im Gegensatz zur Furin-gespaltene F1-Untereinheit des rekombinanten Protein 2 (RP 2F2), ein His-Tag am N-Terminus (Abb. 26). Dieser Terminus entspricht zwar dem *in vivo* freiliegenden Fusionspeptid, eine Reaktion kann aber ausgeschlossen werden, mit dem RP 2 ebenfalls eine Detektion erfolgt war (Abb. 28 IIIC) und diese Domäne hier ebenfalls nicht frei liegt (Abb. 26).

Folglich konnte gezeigt werden, dass der Anti-RPMV pAK das HR B/LZ Motiv als eine lineare antigenetisch reaktive Domäne detektierte.

Es kann aber nicht ausgesagt werden, dass nicht noch weitere Domänen im Bereich der Sekundär- oder Tertiärstruktur liegen.

### Ausblick

Das RPMV F Protein besitzt im Modell die Eigenschaften der paramyxoviralen F Proteine. Ein darüber hinaus reichender Zusammenhang zwischen F Protein-Sekundär- und Tertiär-Strukturen und Fusions-eigenschaft, sowie Erregervirulenz bleibt in dieser Arbeit unbeantwortet.

## VI. Zusammenfassung

Die untersuchten 18 Virusisolate stammten aus Schlangen der Familien *Colubridae*, *Viperidae* und *Crotalidae*, die an Lungensymptomatik und zentralnervösen Störungen erkrankt und teilweise verendet waren. Die Erreger wurden anhand ihres cytopathogenen Effektes, mittels Elektronenmikroskopie und RNA-PCR zweier verschiedener partieller Gene als Paramyxoviren identifiziert.

Die Sequenzanalyse der RNA-PCR Amplifikate bewies anhand identischer Isolate aus gleichen Infektionsherden, aber verschiedenen Schlangenspezies, dass die hier untersuchten Reptilien Paramyxoviren (RPMV) nicht streng wirtsspezifisch waren.

Sequenzvergleiche partieller L und F Gene zeigten für die RPMV untereinander eine Homologie von mindestens 79 % auf nt-Ebene und 94 % auf as-Ebene auf. Das Ermitteln prozentualer Sequenzunterschiede des *Fer-de-Lance Virus* (FDLV) und der etablierten Paramyxovirus Typspezies resultierte in einer maximalen Homologie von 56 % auf nt-Ebene und von 61 % auf as-Ebene mit dem *Sendai Virus*, bezogen auf das partielle L Gen. In phylogenetischen Analysen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die RPMV bildeten drei Gruppen für die L Gen Sequenzen und entsprechende Gruppen für die F Gen Sequenzen und grenzten sich deutlich vom *Sendai Virus* ab.

Das Fusions (F) Gen, 1638 Nukleotide (nt), eines der RPMV Isolate wurde sequenziert und in das 546 Aminosäuren (as) F Protein übersetzt. Wie von den etablierten Paramyxovirus Typspezies bekannt, konnte das Protein in die F1 und die F2 Untereinheit gegliedert werden und folgende Protein-Motive als Modell dargestellt werden: das Signalpeptid (SP), ein Furin Schnittmotiv, das hydrophobe Fusionspeptid, zwei Heptad Repeat Motive (HR A und B), ein Leuzin Zipper Motiv und ein Transmembrananker (TM). Zwei N-glycosylierte Reste wurden ermittelt.

---

Das F Gen wurde prokaryotisch exprimiert. Hierfür wurden vier verschiedene Plasmide konstruiert: eines beinhaltet das gesamte F Gen, das zweite das gesamte Gen ohne das SP und ohne den TM. Ein drittes beinhaltet die F2 Untereinheit ohne das SP und ein viertes die F2 Untereinheit ohne das HR B und den TM.

Die prokaryotische Expression des gesamten RPMV F Gens war nicht erfolgreich. Es konnten aber rekombinante Proteine der vorherbestimmten Molekulargewichte für alle anderen Plasmidkonstruktionen erhalten werden. Mittels eines Anti-RPMV Kaninchenserums konnte ausschließlich das zweite rekombinante Protein im WB detektiert werden, das auch das *Furin* Schnittmotiv enthielt. Nach Verdau dieses Proteins mit der Endopeptidase Furin detektierte das Antiserum noch ein Protein, das mit dem vierten rekombinanten Protein bis auf das HR B identisch ist. Das HR B ist eine 30 as lange Domäne, die zugleich das Leuzin Zipper Motiv darstellt und den Untersuchungen zufolge ein lineares antigenetisches Epitop beinhaltet.

## VII. Summary

### **Characterization of reptilian paramyxoviruses and analysis of the procaryotic expressed partial fusion gene**

Viral agents isolated from 18 snakes (families *Colubridae*, *Viperidae*, and *Crotalidae*) showing respiratory symptoms and neuronal diseases were investigated. Identifying the isolates as paramyxoviruses showing characteristic cytopathic effect, was carried out by electronmicroscopy and RNA-PCR of two partial genes (L and F). After sequencing RNA-PCR amplicons, identical sequences were found for the reptilian paramyxoviruses (RPMV) isolated in the same outbreak from different snake species, suggesting they are not host-specific.

Sequence alignment of partial L and F genes within the RPMV group revealed sequence homology of at least 79 % for nucleotides (nt), and 94 % for amino acids (aa). Further sequence alignment included the *Fer-de-Lance virus* (FDLV) as a RPMV representative, the established type species of the paramyxovirus family. The greatest similarity was found to the partial L gene of *Sendai virus*, with 56 % nt and 61% aa identity. Consequently, the RPMV form a closely related, if somewhat diverse, group, belonging to the family *Paramyxoviridae*.

This result was confirmed by phylogenetic analysis. The RPMV group formed three clusters for the L gene sequence and corresponding clusters for the F gene sequence, leaving the *Sendai virus* as an outgroup, which was included as a representative of the paramyxovirus family. Another phylogenetic analysis based on partial L and F protein sequences included the FDLV and the established paramyxovirus type species. In this case, the FDLV showed the closest relationship to the *Sendai virus*.

---

The fusion (F) gene and protein of the reptilian paramyxovirus isolated from the snake *Gonosoma oxycephala* were also investigated. The sequences of the 1638 nt F gene and its 546 aa F protein were obtained and these sequences were compared to the F protein of the established paramyxovirus type species. The F protein, like its counterparts, was predicted to be glycosylated and to contain a furin cleavage site in the F1 and F2 subunit. Domains were predicted to be the signal-peptide (SP), a hydrophobic fusion peptide, two heptad repeats (HR A and HR B), a leucine zipper motif, and a transmembrane anchor (TM).

To further characterize the F protein and identify antigenic determinants, an *E. coli* expression system and four plasmids containing four various constructs of the F gene were used: the first contained an insert with the entire gene; the second, an insert with the F gene minus the SP and TM; a third construct was inserted with the F2 subunit minus the SP; and the fourth contained an insert with the F1 subunit minus HR B and TM. To monitor expression, an anti-His tag monoclonal antibody in a Western blot (WB) was used. Antigenic epitopes were identified in WB by the use of polyclonal rabbit antiserum, raised against our isolate.

No expression was detected for the first construct containing the entire F gene, but all other constructs produced proteins of the predicted molecular weights. The anti-viral rabbit serum detected only the protein encoded by the second construct, that included the predicted furin cleavage site. After treatment of this recombinant protein with *furin*, the antiserum reacted with only one of the fragments. The reactive fragment was identical to the fourth recombinant protein except for the inclusion of an additional 30 amino acids that contained HR B. The results indicate that HR B of the reptilian paramyxovirus F protein contains a linear antigenic epitope.



**VIII. Abkürzungsverzeichnis**

Abb. Abbildung

AK Antikörper

Aminosäuren (IUPAC, 1968):

hydrophob neutral	polar neutral	basisch – geladen	sauer + geladen
A Alanin	G Glycin	H Histidin	D Asparagin
V Valin	S Serin	K Lysin	E Glutamin
I Isoleucin	T Threonin	R Arginin	
L Leucin	Y Tyrosin		
P Prolin	C Cystein		
F Phenylalanin	N Asparagin		
M Methionin	Q Glutamin		
W Tryptophan			

AP alkalische Phosphatase

as Aminosäure(n)

ATCC American Type Culture Collection

*Bgl* *Bacillus globigii*

bp Basenpaare

C *cellular*, Gen bzw. Protein

C- Carboxy-

cpE cytopathischer Effekt

d day

DNA desoxyribo-nucleic acid

E. coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraacetat

F Gen Fusionsgen

F Protein Fusionsprotein

Fa. Familie

FDLV *Fer-de-Lance Virus*

FKS fötales Kälberserum

FP Fusionspeptid

G *glyco*, Gen bzw. Protein

h Stunde(n)

---

H	Hämagglutinin
HAH	Hämagglutinations-Hemmungstest
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	<i>humanes Immundefizienzvirus</i>
HN	Hämagglutinin Neuraminidase
HPIV	<i>humanes Parainfluenzavirus</i>
HR	Heptad Repeat
HRSV	<i>humanes Respiratorisches Synzytialvirus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgH <sub>2</sub>	Iguana Herz-Zelllinie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
ISID	<i>International Society of Infectious Diseases</i>
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Kap.	Kapitel
kD	kilo Dalton
Kl.	Klasse
KZ	Kodon Zusammensetzung
L	<i>large</i> , Gen bzw. Protein
lacR	Lac-Repressor Gen
LB	Luria Bertani
LBS	Luria Bertani mit Selektivmarker
LZ	Leuzin Zipper
M	Matrix
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute(n)
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	molecular weight
N	<i>nucleo</i> , Gen bzw. Protein

---

N-	Amino-
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
ng	Nanogramm, $10^{-9}$ g
NK	Nukleokapsid
NP	<i>nucleo-phospho</i> , Gen bzw. Protein
nt	Nukleotid(e)
Oh	overhang
ORF	open reading frame
Ori	origin of replication
P	<i>phospho</i> , Gen bzw. Protein
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS-Tween
PCR	polymerase chain reaction
pg	Picogramm, $10^{-12}$ g
p.i.	<i>post infectionem</i>
PHYLIP	phylogenetic interference package
RE	Restriktionsenzym
RNA	ribo-nucleic acid
RP	rekombinantes Protein
rpm	rounds per minute
RPMV	reptilienpathogene/s Paramyxovirus/en
RSV	<i>Respiratorisches Syncytialvirus</i>
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain-reaction
SDS PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
Sim.	similarity
SP	Signalpeptid
SS	Schnittstelle
ss	single stranded
SV5	<i>Simian Virus 5</i>
Tab.	Tabelle
T7P	T7 Promotor

---

T7T	T7 Terminator
TCID	tissue culture infectious dose
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TfB	Transformations Puffer
TM	Transmembrananker
t-RNA	transfer RNA
U	<i>unknown</i> , Gen bzw. Protein
V	Volt
VH	Virushülle
WB	Western Blot
<i>Xho</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>
μmol	Micromol, 10 <sup>-6</sup> mol

## IX. Abbildungsverzeichnis

### Literaturübersicht

Abb. 1: Modell eines Paramyxovirus (nach Modrow et al., 2003)	5
Abb. 2: Virale Fusionsproteine (nach Baker et al., 1999)	8
Abb. 3: Schnittprozessierung des F Proteins von Paramyxoviren	10
Abb. 4: Modell des Heptad Repeats im Helikalen Rad (Joshi et al., 1998)	12
Abb. 5: Reptilien als Wirte für Paramyxoviren (RPMV)	16

### Material und Methoden

Abb. 6: Überblick der F Gen spezifischen semi-nested RT-PCR	21
Abb. 7: Design eines F Gen spezifischen Primers	21
Abb. 8: Schema, Expressionsvektor und Induktion	29
Abb. 9: Modell: F Protein und rekombinante Proteine	31
Abb. 10: Modell eines Insert-flankierenden Primerpaares	33
Abb. 11: Übersicht des Protein Nachweisverfahrens	39

### Ergebnisse

Abb. 12: Cytopathischer Effekt der RPMV	43
Abb. 13: Elektronenoptische Aufnahmen der RPMV	44
Abb. 14: Amplifikate aus den partiellen L und F Gen spezifischen PCR der RPMV	45
Abb. 15: Alignment der partiellen L Gen Sequenzen	47
Abb. 16: Alignment der partiellen F Protein Sequenzen	49
Abb. 17: Stammbäume der RPMV	51
Abb. 18: Stammbäume von Paramyxovirus Typspezies und FDLV	53
Abb. 19: F Gen spezifische RT-PCR	54
Abb. 20: Modell des RPMV F Proteins	56
Abb. 21: Transmembranregionen des RPMV F Proteins	56
Abb. 22: F Protein Fusionspeptide	57

---

Abb. 23: Heptad Repeat A und B mit Leuzin Zipper des RPMV F Proteins	59
Abb. 24: N-Glykosylierungen des RPMV F Proteins	60
Abb. 25: Plasmid-DNA 2, 3 und 4	62
Abb. 26: Modell der verschiedenen Proteine des RPMV F Proteins	63
Abb. 27: SDS PAGE, rekombinantes Protein 3	65
Abb. 28: SDS PAGE und WB rekombinanter F Proteinfragmente	67

## **X. Tabellenverzeichnis**

### Literaturübersicht

Tab. 1: Taxonomie der <i>Paramyxoviridae</i>	4
--	---

### Methoden

Tab. 2: Untersuchte Reptilien Paramyxoviren	19
Tab. 3: RT-PCR Temperaturprogramm	22
Tab. 4: Repräsentanten der vier phylogenetischen Analysen	25
Tab. 5: Lokalisation Insert-spezifischer Primer	32

### Ergebnisse

Tab. 6: Prozentuale Homologie der L und F Sequenzen der RPMV und Paramyxovirus Typspezies zum FDLV	50
Tab. 7: Vergleich von F Gen und Protein des RPMV Gono-GER85 und Paramyxovirus Typspezies	55
Tab. 8: F Protein <i>Furin</i> Schnittmotive (Lamb & Kolakovsky, 2001)	58
Tab. 9: Kodon Zusammensetzung, <i>E. coli</i> Genom und RPMV F Gen	61
Tab. 10: Größe und Molekulargewicht der verschiedenen Proteine	64

## XI. Literaturverzeichnis

Ahne W, Adrian J, Mayr A, 1999a. Replication of reptilian paramyxovirus in avian host systems. *J Vet Med B* 46, 57-62.

Ahne W, Batts WN, Kurath G, Winton JR, 1999b. Comparative sequence analyses of sixteen reptilian paramyxoviruses. *Virus Res.* 63, 65-74.

Ahne W, Neubert WJ, 1991. Isolation of paramyxovirus-like agents from Teju (*Callisotus maculatus*) and Python (*Python regius*). Proceedings of the 2nd International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, 29-31 July, Oregon State University, Corvallis, USA, 203-210.

Ahne W, Neubert WJ, 1989. Antigenic Relationship between three Members of Paramyxoviridae Isolated from Different Snakes. In: *Viruses of lower vertebrates* (Ahne W, Kurstak E, eds.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, 105-113.

Ahne W, Neubert WJ, Thomsen I, 1987. Reptilian viruses: Isolation of Myxovirus-like Particles from the Snake *Elaphe oxycephala*. *J Vet Med B* 34, 607-612.

Baker KA, Dutch RE, Lamb RA, Jardetzky TS, 1999. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* 3(3), 309-319.

Biolabs, 2002. Catalog & Technical Resources. Beverly, MA, USA.

Blahak S, 1995. Isolation and characterization of paramyxoviruses from snakes and their relationship to avian paramyxoviruses. *J Vet Med* 42, 216-224.

Bollag DM, Edelstein SJ, 1991. *Protein Methods*. 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY, USA.

Bornberg-Bauer E, Rivals E, Vingron M, 1998. Computational Approaches to Identify Leucine Zippers. *Nucleic Acids Res.*, 26(11), 2740-2746.

Brenner S, Horne RW, 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta* 34, 103-110.

Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P, 1989. High-level Expression of Recombinant Genes in *Escherichia coli* is dependent on the Availability of the DNA Y Gene Product. *Gene* 85(1), 109-114.

Buckland R, Malvoisin E, Beauverger P, Wild F, 1992. A leucine zipper structure present in the measles virus fusion protein is not required for its tetramerization but is essential for fusion. *J Gen Virol* 73 (Pt 7), 1703-1707.



Chambers P, Pringle CR, Easton AJ, 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 71 (Pt 12), 3075-3080.

Chang J, Srikiatkachorn A, Braciale TJ, 2001. Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8(+) T cells during experimental virus infection. *J Immunol* 167(8), 4254-4260.

Chen L, Gorman JJ, McKimm-Breschkin J, Lawrence LJ, Tulloch PA, Smith BJ, Colman PM, Lawrence MC, 2001. The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Structure (Camb)* 9(3), 255-66.

Clark HF, Lief FS, Lunger PD, Waters D, Leloup P, Foelsch DW, Wyler RW, 1979. Fer de Lance virus (FDLV): a probable paramyxovirus isolated from a reptile. *J Gen Virol* 44, 405-418.

De Leeuw OS, Hartog L, Koch G, Peeters BPH, 2003. Effect of fusion cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *J Gen Virol* 84, 475-484.

De Leeuw OS, Peeters B, 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* 80 ( Pt 1), 131-136.

Dutch RE, Hagglund RN, Nagel MA, Paterson RG, Lamb RA, 2001. Paramyxovirus fusion (F) protein: a conformational change on cleavage activation. *Virology* 281(1), 138-150.

Essbauer S, Ahne W, 2001. Review Paper, Viruses of lower vertebrates. *J Vet Med B* 48, 403-475.

Felsenstein J, 1993. PHYLIP, Phylogeny Interference Package, version 3.5c. updated from version 3.2., *Cladistics* 5, 164-166.

Fogg MH, Parsons KR, Thomas LH, Taylor G, 2001. Identification of CD4+ T cell epitopes on the fusion (F) and attachment (G) proteins of bovine respiratory syncytial virus (BRSV). *Vaccine* 19(23-24), 3226-3240.

Fölsch DW, Leloup P, 1976. Fatale endemische Infektion in einem Serpentarium. *Tierärztl. Praxis*, 4, 572- 536.

Franke J, Essbauer S, Ahne W, Blahak S, 2001. Identification and molecular characterization of 18 paramyxoviruses isolated from snakes. *Virus Res* 80, 67-74.

Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio NM, Hamaguchi M, Nagai Y, 1990. An Endoprotease Homologous to the Blood Clotting Factor X as a Determinant of Viral Tropism in Chick Embryo. *EMBO J.* 9, 4189-4195.

Grzimek B, Hediger H, Klemmer K, Kuhn O, Wermuth H, 2000. Grzimeks Tierleben, Bd. 6, Kriechtiere, Enzyklopädie des Tierreichs in 13 Bänden. Weltbild Verlag, Augsburg.

Gupta R, Jung E, Brunak S, 2002. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation, 2002.

Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S, 1995. NetOglyc: Prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconjugate Journal*, 15, 115-130.

Hatsuzawa K, Murakami K, Nakayama K, 1992. Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo)* 111(3), 296-301.

Higgins DG, 1994. Clustal V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Mol Biol* 25, 307-318.

Homer BL, Sundberg JP, Gaskin JM, Schumacher J, Jacobson ER, 1995. Immunoperoxidase detection of ophidian paramyxovirus in snake lung using a polyclonal antibody. *J Vet Diagn Invest* 7, 72-77.

Horvath CM, Lamb RA, 1992. Studies on the fusion peptide of paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol*, 66, 2443-2455.

Hosaka M, Nagahama M, Kim W-S, 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 266, 12127-12130.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2003. Structural, Genomic, Physicochemical and Replicative Properties of Viruses Used in Taxonomy.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/intro\\_to\\_universal/intro\\_to\\_universal.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/intro_to_universal/intro_to_universal.html).

IUPAC-IUB, International Union of Pure and Applied Chemistry- International Union of Biochemistry, Commission on Biological Nomenclature, 1968. A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. *J Biol Chem* 243, 3557-3559.

Jackson F, Needham JR, 1983. Rhinitis and virus antibody titres in chelonians. *J small Anim Pract* 24, 31-36.

Jacobson ER, Gaskin JM, Page D, Iverson WO, Johnson JW, 1981. Illness associated with Paramyxo-like virusinfections in a zoologic collection of snakes. *J Am Vet Med Assoc* 189(9), 1020-1023.

Jacobson ER, Gaskin JM, Simpson CF, Terrell TG, 1980. Paramyxo-like infection in a rock rattlesnake. *J Am Med Assoc* 177(9), 796-799.

Joshi SB, Dutch RE, Lamb RA, 1998. A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1gp41. *Virology* 248, 20-24.

Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N, 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells: a possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* 267, 13573-13579.

Klenk H-D, Garten W, 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2, 39-42.

Klenk H-D, Rott R, Orlich M, Blodorn J, 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68, 426-439.

Kurath G, Batts WN, Ahne W, Winton JR, 2003. Complete Genome Sequence of Fer-de-Lance Virus Reveals a Novel Gene in Reptilian Paramyxoviruses. *J. Virology*, eingereicht.

Kyte J, Doolittle RF, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.

Lamb RA, 1993. Review, Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197(1), 1-11.

Lamb RA, Collins PL, Kolakovsky D, Melero JA, Nagai Y, Oldstone MBA, Pringle CR, Rima BK, 2000: Paramyxoviruses. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, RB Wickner, 2000. *Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, 549-561.

Lamb RA, Kolakofsky D, 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (editors), 2001. *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 4th Ed, 577-604.

Le Mercier P, Jacob Y, Tordo N, 1997. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 78 (Pt 7), 1571-1576.

Lunger PD, Clark HF, 1979a. Morphogenesis of Fer-de-Lance virus (FDLV) cultured at optimal (30°C) cell growth temperature. *J Comp Path* Vol 89, 265-279.

Lunger PD, Clark HF, 1979b. Morphogenesis of Fer-de-Lance virus (FDLV) cultured at sub- (23°C) and supra- (36°C) optimal cell growth temperatures. *J Comp Path* Vol 89, 281-291.

Maramorosch K, Koprowski H, 1967. *Methods of Virology*, Vol. II, Academic Press Inc, 93-118.

Martin-Gallardo A, Fien KA, Hu BT, Farley JF, Seid R, Collins PL, Hildreth SW, Paradiso PR, 1991. Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in *Escherichia coli*: mapping of a fusion inhibiting epitope. *Virology* 184(1), 428-432.

Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G, 1974. *Virologische Arbeitsmethoden*. Bd. I, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Mayr A, Franke J, Ahne W, 2000. Adaptation of reptilian paramyxovirus to mammalian cells (vero cells). *J Vet Med B* 47, 95-98.

Modrow S, Falke D, Truyen U, 2003. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 265-299.

Moller S, Croning MDR, Apweiler R, 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 17(7), 646-653.

Neumann W, Wilke I, Friedrich D, Boehme, R, 1986. Electron microscopy for detection of paramyxovirus-like particles in coarse fish. *Mh Vet Med* 41, 164-166.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G, 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Sys* 8, 581-599.

Novagen, 2002. pET System Manual. 10<sup>th</sup> Ed, [www.novagen.com](http://www.novagen.com).

O'Connell J, 2002. *RT-PCR Protocols*. Humana Press; 1st Ed. National Univ of Ireland, Cork.

Olmsted RA, Elango N, Prince GA, Murphy BR, Johnson PR, Moss B, Chanock RM, Collins PL, 1986. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(19), 7462-7466.

Ouweland van den AM, van Duijnhoven HL, Keizer GD, Dorssers LC, Van de Ven WJ, 1990. Structural homology between the human fur gene product and

the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res* 18(5), 1332.

Park SJ, Lee SK, Lee BJ, 2002. Effect of Tandem Rare Codon Usage Substitution and Vector-Host Combinations on the Expression of the EBV gp110 C-Terminal Domain in *Escherichia Coli*. *Protein Expr Purif* 24(3), 470-480.

Patterson JB, Thomas D, Lewicki H, Billeter MA, Oldstone BA, 2000. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology*, 267, 80-89.

Peeters BPH, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens LJ, 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA. Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 73, 5001-5009.

Peisajovich SG, Shai Y, 2002. New insights into the mechanism of virus-induced membrane fusion. *Trends Biochem Sci* 27(4), 183-90.

Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, Kaaden OR, 1997. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 57(6), 709-718.

Randhawa JS, Wilson SD, Tolley KP, Cavanagh D, Pringle CR, Easton AJ, 1996. Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* 77 (Pt 12), 3047-3051.

Reitter JN, Sergel T, Morrison TG, 1995. Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein. *J Virol* 69(10), 5995-6004.

Richter GA, Homer BL, Moyer SA, Williams DS, Scherba G, Tucker SJ, Hall BJ, Pedersen JC, Jacobson ER, 1996. Characterization of paramyxoviruses isolated from three snakes. *Virus Res* 43, 77-83.

Robertson D, Shore S, Miller DM, 1997. Manipulation and Expression of Recombinant DNA. A Laboratory Manual. Academic Press, San Diego.

Rovozzo GC, Burke CN, 1973. A manual of basic virological Techniques. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scheid A, Choppin PW, 1974. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57, 475-490.

Schrijver RS, Hensen EJ, Langedijk JP, Daus F, Middel WG, Kramps JA, van Oirschot JT, 1997. Antibody responses against epitopes on the F protein of bovine respiratory syncytial virus differ in infected or vaccinated cattle. *Arch Virol* 142(11), 2195-2210.

Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ, 2000. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Res* 66(1), 1-11.

Sechoy O, Philippot JR, Bienvenue A, 1987. F protein-F protein interaction within the Sendai virus identified by native bonding or chemical cross-linking. *J Biol Chem* 262 (24), 11519-11523.

Sergel-Germano T, McQuain C, Morrison T, 1994. Mutations in the fusion peptide and heptad repeat region of the Newcastle disease virus fusion protein block fusion. *J Virol*, 68, 7654-7658.

Sergel TA, McGinnes LW, Morrison TG, 2001. Mutations in the fusion peptide and adjacent heptad repeat inhibit folding or activity of the Newcastle disease virus fusion protein. *J Virol* 75(17), 7934-7943.

Shengqing Y, Kishida N, Ito H, Kida H, Otsuki K, Kawaoka Y, Ito T, 2002. Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. *Virology* 301, 206-211.

Stratagene, 2002. Stratagene Catalog, Tools and Technology for Life Science, La Jolla, CA, USA.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, 1995. *Biochemistry*. W H Freeman.

Steward MW, 2001. The development of a mimotope-based synthetic peptide vaccine against respiratory syncytial virus. *Biologicals* 29(3-4), 215-219.

Tashiro M, Yokogoshi Y, Tobita K, Seto JT, Rott R, Kido H, 1992. Tryptase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol* 66(12), 7211-7216.

Tashiro M, McQueen NL, Seto JT, 1999. Determinants of organ tropism of Sendai Virus. *Frontiers in Bioscience* 4, 642-645.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 11; 22(22), 4673-4680.

Towbin H, Staehlin T, Gordon J, 1976. Electrophoretic transfer of Proteins from Polyacrylamid Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4350-4354.

Trudel M, Nadon F, Seguin C, Payment P, Talbot PJ, 1987. Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: further characterization of a major epitope involved in virus neutralization. *Can J Microbiol* 33(10), 933-938.

Walsh EE, Brandriss MW, Schlesinger JJ, 1985. Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J Gen Virol* 66 (Pt 3), 409-415.

Walsh EE, Schlesinger JJ, Brandriss MW, 1984. Protection from respiratory syncytial virus infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal antibodies. *Infect Immun* 43(2), 756-758.

Walsh EE, Hruska J, 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol* 47(1), 171-177.

Wang Z, Iorio RM, 1999. Amino acid substitutions in a conserved region in the stalk of the Newcastle disease virus HN glycoprotein spike impair its neuraminidase activity in the globular domain. *J Gen Virol* 80 (Pt 3), 749-753.

Westover KM, Hughes AL, 2001. Molecular evolution of viral fusion and matrix protein genes and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Mol Phyl Evol* 21(1), 128-134.

Winton JR, Lannan CN, Ranson DP, Freyer JL, 1985. Isolation of a new virus from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Oregon USA. *Fish Pathol* 20, 373-380.

Young JK, Hicks RP, Wright GE, Morrison TG, 1998. The role of leucine residues in the structure and function of a leucine zipper peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion. *Virology* 243(1), 21-31.

Yu M, Hansson E, Langedijk JP, Eaton BT, Wang LF, 1998. The attachment protein of Hendra virus has high structural similarity but limited primary sequence homology compared with viruses in the genus Paramyxovirus. *J Virol* 251 (2), 227-233.

Zangger N, Mueller M, Pagan O, 1991. Viral dermatitis in the spur-tailed (*Testudo graeca*) and the spur-thighed tortoise (*Testudo hermanni*) in Switzerland. 4th International Colloquium on Pathology and Medicine of Reptiles and Amphibians, 27-29 September, German Veterinary Association, Giessen, Germany, 17-24.

Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, Kim PS, 2000. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci* 97(26), 14172-14177.

## XII. Anhang

### 1. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Winfried Ahne für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die Bereitstellung der Laborräume und Materialien und seine stets gewährte Unterstützung. Prof. Dr. Ahne hatte mich bereits während meines Studiums in die Virologie wechselwarmer Wirbeltiere eingeführt und mich außerordentlich gefördert. Er ermöglichte mir auch die Kontakte zum Western Fisheries Research Center in Seattle, USA, an dem mein Gastaufenthalt als „visiting scientist“ erfolgte.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden für die Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft, die Bereitstellung der Laborräume und Materialien und seine stets gewährleistete Unterstützung.

Herrn Dr. James Winton danke ich für die Aufnahme als „visiting scientist“ am Western Fisheries Research Center in Seattle, USA. Dort konnte ein wichtiger Teil meiner Dissertationsarbeit durchgeführt werden. Dr. Wintons außerordentliche Betreuung reichte von labortechnischen Fragen bis hin zu organisatorischen Belangen, die im Ausland unvermeidlich sind. Frau Dr. Gael Kurath gilt besonderer Dank für die Bereitstellung der *Fer-de-Lance Virus* nt-Sequenz. Dem Staff des Western Fisheries Research Centers, Seattle, besonders Frau Dr. Alison Colwell, möchte ich für stets gewährte Unterstützung danken.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Sandra Essbauer für wissenschaftliche Ratschläge und viele hilfreiche Anregungen. Insbesondere verdanke ich ihr den bewilligten Antrag für mein DAAD Stipendium in den USA.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Frank Just für die Unterstützung bei der Arbeit am Elektronenmikroskop und für die kritischen Diskussionen.



---

Herrn Dr. Martin Pfeffer danke ich herzlich für sehr gute Ratschläge hinsichtlich der RNA-PCR Methode und für labortechnische Anregungen.

Mein Dank gilt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für ein Auslandsstipendium. Es ermöglichte meinen sechsmonatigen Aufenthalt am Western Fisheries Research Center in Seattle, USA.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) danke ich für die partielle finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch den Forschungsauftrag AH18/16-1.

Frau Dr. Silvia Blahak danke ich für die Zurverfügungstellung der Paramyxovirus Isolate.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die mich in allen Ideen und Vorhaben unterstützen und sowohl mein Studium als auch meine Doktorandenzeit finanzierten. Nicht minder möchte ich mich bei meinen Freunden für meinen seelischen Ausgleich bedanken! Thomas, herzlichen Dank für Deine Formatierungskünste.

## **2. Lebenslauf**

Name	Julia Margareta Franke
Geburtstag	28. November 1975
Geburtsort	Fürth, Bayern
1982 - 1986	Friedrich-Ebert Grundschule, Fürth
1986 - 1991	Heinrich-Schliemann Gymnasium, Fürth
1991 - 1995	Marie-Therese Gymnasium, Erlangen
1995	Abitur, Erlangen
	1996 – 2001 Studium der Veterinärmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München
2002	Approbation als Tierärztin
2002 - 2003	Doktorandin mit Wirkungskreis am <ul style="list-style-type: none"><li>- Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten, Tierärztliche Fakultät der LMU München</li><li>- Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Tierärztliche Fakultät der LMU München</li><li>- Western Fisheries Research Center, United States Geological Survey, Seattle, Washington, USA (DAAD Stipendium)</li></ul>