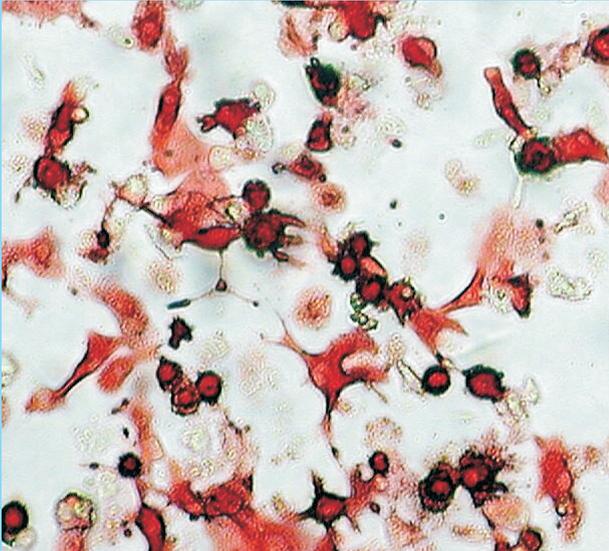


MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN DEM ZELLULÄREN REZEPTOR CD46 UND DEM VIRALEN LIGANDEN VON BVDV



**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

ANKE HIMMELREICH

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2003

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wetttenberg
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE
www.vvb-ips.de

Aus dem Institut der Virologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Till Rümenapf

**Molekulare Charakterisierung der Interaktion zwischen
dem zellulären Rezeptor CD46 und dem viralen Liganden von BVDV**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Eingereicht von
Anke Himmelreich
Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

Gutachter: Prof. Dr. T. Rümenapf
Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der Disputation: 19. November 2003

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Texten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Till Rügenapf im Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt. Die Arbeit wurde als Projekt im Sonderforschungsbereich 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ durch die DFG gefördert.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Till Rügenapf,

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel,

Manuela Heimann und Karin Müller,

Yvonne Hausmann, Thomas Krey, Gleyder Roman-Sosa,

all den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes,

meinen Eltern und Oma Freiburg.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	10
1.1	Invasion von Viren	10
1.2	Virusrezeptoren und ihr Einfluss auf die Pathogenität	10
1.3	BVDV	13
1.4	Zelluläre Rezeptoren von Pestiviren und mögliche virale Liganden	15
1.5	Identifizierung von Domänen im humanen CD46, die für Bindung, Infektion und Anheftung von pathogenen Erregern bedeutsam sind	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	eukaryotische Zelllinien	24
2.1.2	prokaryotische Zellen	24
2.1.3	Virusstämme	24
2.1.4	Antikörper	24
2.1.5	Enzyme	25
2.1.6	Chemikalien	25
2.1.7	radioaktiv markierte Substanz	26
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.9	Geräte (Aufzählung nicht explizit im Kapitel 2.2 Methoden erwähnter Geräte)	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten	27
2.2.1.1	Medien und Puffer	27
2.2.1.2	Allgemeine Zellkulturarbeiten	28
2.2.1.3	Transfektion von zirkulärer Plasmid DNA	28
2.2.1.4	Etablierung induzierbarer SK6 Tet on Zelllinien	29
2.2.1.5	Elektroporation von RNA in SK6-Zellen	30
2.2.1.6	Titration zur Bestimmung des Virustiters	31
2.2.1.7	Indirekter immunhistochemischer Nachweis	31
2.2.1.8	Zytoplasmatische Markierung von Zellen	32
2.2.1.9	Zelladsorptionstest	32
2.2.2.	Bindungsassay mit [³ H] markiertem BVD NADL Virus	33
2.2.2.1	Virusmarkierung mit [³ H]-Uridin	33
2.2.2.2	Bindungsassay	34
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	35
2.2.3.1	Zelllyse	35
2.2.3.2	SDS-PAGE mit Tris-Tricin-Puffer	35
2.2.3.3	Immunoblot-Analyse von Proteinen (western blot)	36
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.4.1	Anzucht von Bakterien	37
2.2.4.2	Plasmidisolierung	38
2.2.4.3	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	39
2.2.4.4	Phenol/Chloroform Extraktion von DNA	40
2.2.4.5	Ethanolpräzipitation von DNA / RNA und Isopropanolpräzipitation von DNA	41
2.2.4.6	Quantifizierung von DNA- / RNA-Proben	41
2.2.4.7	DNA- bzw. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.4.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	42
2.2.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten	43

2.2.4.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.4.11	Klonierung von PCR-Produkten	45
2.2.4.12	Ortsgerichtete Mutagenese mittels „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“	45
2.2.4.13	<i>in vitro</i> Transkription	46
2.2.4.14	Sequenzierung von DNA mittels „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer	47
2.2.4.15	Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	48
2.2.5	Klonierungen	49
2.2.5.1	Synthetische Oligonukleotide	49
2.2.5.2	Klonierung der Deletionsmutanten von CD46 _{bov}	51
2.2.5.3.	Klonierung der Austauschmutanten von CD46 _{bov}	53
2.2.5.4	Klonierung der Austausche in CCP1 von CD46 _{bov}	54
2.2.5.4.1	Klonierung einzelner Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von bovinem CCP1 mittels „Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis“ (2.2.4.12)	55
2.2.5.4.2	Klonierung einzelner Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von porzinem CCP1 mittels „Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis“ (2.2.4.12)	55
2.2.5.5	Klonierung von weiteren CCP-Mutanten	56
2.2.5.6	Etablierung von Glykoprotein E2-Konstrukten im pcDNA3 Plasmid	57
2.2.5.7	Etablierung chimärer Gesamtklone	59
3.	Ergebnisse	64
3.1	Identifikation der für die Interaktion mit BVDV essentiellen Aminosäuren im bovinen CD46	64
3.1.1	Etablierung eines Bindungsassays	64
3.1.2	Empfänglichkeit von CD46 _{bov} für BVDV	69
3.1.3	Funktionelle Untersuchung von CD46 _{bov} durch Deletion einzelner CCP's	70
3.1.3.1	Erzeugung von Zelllinien, die Deletionsmutanten von CD46 _{bov} exprimieren	73
3.1.3.2	Bindung von [³ H] markiertem BVDV an Deletionsmutanten von CD46 _{bov}	74
3.1.3.3	Empfänglichkeit der Deletionsmutanten von CD46 _{bov} für BVDV	76
3.1.4	Funktionelle Untersuchung von CD46 _{bov} durch Austausch einzelner CCP Module	78
3.1.4.1	Western Blot Analyse der Austauschmutanten von CD46 _{bov}	81
3.1.4.2	Bindung von [³ H] markiertem BVDV an Austauschmutanten von CD46 _{bov}	82
3.1.4.3	Empfänglichkeit der Austauschmutanten von CD46 _{bov} für BVDV	85
3.1.5	Funktionelle Untersuchung von CD46 _{bov} durch Austausche in CCP1	87
3.1.5.1	Funktionelle Untersuchung von CD46 _{bov} durch CD46 _{1(p/b)} und CD46 _{1(b/p)}	87
3.1.5.2	Bindung von [³ H] markiertem BVDV an CD46 _{1(p/b)} und CD46 _{1(b/p)}	89
3.1.5.3	Empfänglichkeit von CD46 _{1(p/b)} und CD46 _{1(b/p)} für BVDV	90
3.1.5.4	Funktionelle Untersuchung von CD46 _{bov} durch Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von CCP1	91
3.1.5.5	Bindung von [³ H] markiertem BVDV an CD46 _{bov} , das einzelne Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von CCP1 enthält	92
3.1.5.6	Empfänglichkeit von CD46 _{bov} mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der C-terminalen Hälfte von CCP1 für BVDV	94
3.1.5.7	Funktionelle Untersuchung von CD46 _{p1} und CD46 _{porz} durch Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von CCP1	96
3.1.5.8	Bindung von [³ H] markiertem BVDV an CD46 _{p1(G40QVLAL45)} und porz.CD46 _(G40QVLAL45)	96
3.1.5.9	Empfänglichkeit von CD46 _{p1(G40QVLAL45)} und porz.CD46 _(G40QVLAL45) für BVDV	98
3.1.5.10	Funktionelle Untersuchung von CD46 _{bov} durch CCP1-Positionsmutanten	100
3.1.5.11	Western Blot Analyse der CCP1-Positionsmutanten	101

3.1.5.12	Bindung von [³ H] markiertem BVDV an CCP1-Positionsmutanten_____	103
3.1.5.13	Empfänglichkeit der CCP1-Positionsmutanten für BVDV _____	105
3.2.	Identifizierung und Charakterisierung von BVDV Glykoprotein E2 als Bindungspartner für CD46 _{bov} _____	107
3.2.1	Charakterisierung der Bindungsdomäne im BVDV Glykoprotein E2 _____	110
3.2.1.1	Etablierung von Glykoprotein E2-Chimären _____	110
3.2.1.2	Etablierung von KSPV Gesamtklonen, die Glykoprotein E2 Sequenzabschnitte von BVDV NADL enthalten _____	121
3.2.1.2.1	Einbau der BVDV E2 „Minimalsequenz“ in den KSPV Gesamtklon _____	121
3.2.1.2.2	Etablierung von Glykoprotein E2 Gesamtklonchimären durch Austausch variabler Sequenzbereiche _____	123
4.	Diskussion _____	127
4.1	Charakterisierung der Bindungsdomäne im CD46 _{bov} _____	127
4.2	Charakterisierung der Bindungsdomäne im BVDV Glykoprotein E2 _____	133
4.3	Fazit _____	138
5.	Zusammenfassung _____	140
6.	Summary _____	141
7.	Literaturverzeichnis _____	142

Abkürzungen

aa	„amino acids“-Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	„Border Disease“ Virus
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhöe
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	Alkalische Phosphatase „calf intestine alkaline phosphatase“
cpm	„counts per minute“
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
Defiz.	defizient
Dulbecco´s MEM	„Dulbecco´s modified Eagle´s medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FKS	foetales Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	relative Zentrifugalbeschleunigung
G	Guanin
GAG	Glukosaminoglykane
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IU	„international units“
IRES	interne Ribosomen Eintrittsstelle
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KSPV	Virus der klassischen Schweinepest
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli
mCi	milli Curie
μ	mikro
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
m.o.i.	„multiplicity of infection“
mRNA	„messenger“ RNA
n	nano
NGS	N-Glykosilierungsstelle
nt	Nukleotid

N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS defiz.	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	post infection
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodexylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TBE	Tris Borat EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
T4 PNK	T4-Polynukleotidkinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtprozent
W	Watt
Wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Invasion von Viren

Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und sind für ihre Vermehrung, also die Replikation ihres Genoms und die Synthese ihrer Proteine auf die Stoffwechselwege einer lebenden Zelle angewiesen. Das virale Genom muss nach Infektion der Wirtszelle an den Ort der Replikation (Zytoplasma, Nukleus) gebracht werden. Der Vermehrungszyklus lässt sich in sechs Stadien einteilen: 1. Adsorption, 2. Penetration, 3. Freisetzung des viralen Genoms („uncoating“), 4. Replikation und Biosynthese der viralen Proteine, 5. Morphogenese („assembly“) und 6. Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel (Knipe, 1996). Während der Adsorption kommt es zu spezifischen Interaktionen zwischen viralen und zellulären Strukturen, die die Bindung des Viruspartikels an die Oberfläche der Wirtszelle zur Folge haben. Als Virusrezeptor wird das zelluläre Oberflächenmolekül bezeichnet, an das ein bestimmtes Virus bindet (Marsh & Helenius, 1989; White & Littman, 1989). Virusrezeptoren dienen nicht nur der Virusadsorption, sondern sie initiieren auch den Durchtritt des Virus durch die Zytoplasmamembran (Penetration) (Tardieu et al., 1982). Bei behüllten Viren, bei denen das Nukleokapsid von einer Lipidmembran umgeben ist, ist die Fusion der Virushülle mit der zellulären Membran für die Infektion essentiell. Diese Fusion der Virushülle findet entweder an der Zelloberfläche statt oder erfolgt nach Endozytose äußerlich gebundener Viruspartikel an internen Membranen (z. B. Endosomen) der Wirtszelle.

1.2 Virusrezeptoren und ihr Einfluss auf die Pathogenität

Mit der Definition von Tardieu et al., (1982) wird die Beteiligung eines Virusrezeptors sowohl an der reinen Bindung von Virus an die Zelloberfläche als auch an der Vermittlung der Infektion, die durch eine biologisch relevante Zellantwort (Oberflächenfusion, rezeptorvermittelte Endozytose) eingeleitet wird, beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass die Interaktion eines Virus mit seinem zellulären Rezeptor eine Abfolge dynamischer Prozesse einleitet, die das Eindringen des Virus in die Zelle ermöglichen. Schon allein die Virus-Rezeptor Interaktion stellt einen komplizierten Vorgang dar, der mehrere Teilschritte umfassen kann (Haywood, 1994; Schneider-Schaulies, 2000). Zusätzlich können gleichzeitig mehrere sogenannte „Attachment-“ Rezeptoren abhängig von der jeweiligen Zellart verwendet, sowie verschiedene Korezeptoren benutzt werden. Die Virus-Rezeptor Interaktion kann eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Wirtsspezifität spielen und stellt eine Barriere

für die Übertragung von Virusinfektionen zwischen verschiedenen Spezies dar. Gleichzeitig kann jedoch für die meisten Viren eine ihren Zell- bzw. Organtropismus weit überschreitende Rezeptorverbreitung im Organismus nachgewiesen werden. Für Poliovirus wurde z. B. CD155 als zellulärer Rezeptor identifiziert. CD155 gehört zur Ig-Superfamilie, enthält drei extrazelluläre Domänen und wird in vier unterschiedlichen Spleiss-Varianten exprimiert (Bernhardt et al., 1994; Koike et al., 1990; Mendelsohn et al., 1989). Im Menschen wird CD155 in vielen Zellen und Geweben, u.a. in Lunge, Leber und Herz exprimiert, die aber nicht als Replikationsorte für das Poliovirus dienen. Das bedeutet, dass CD155 als Rezeptor zwar die Speziespezifität festlegt, jedoch nicht auch den Gewebetropismus von Poliovirus definiert (Übersicht in: Nomoto et al., 1994).

Für die Verteilung des Virus im Organismus auf die unterschiedlichen Zielzellen und -organe könnte die Benutzung mehrerer Rezeptoren von Vorteil sein. Für das humane Immundefizienz Virus (HIV) wurde dieser Mechanismus während einer Infektion beobachtet. Außerdem wurde festgestellt, dass das HIV seine Hüllproteine durch Mutation verändert, um an alternative Korezeptoren binden zu können. Für HIV wurde schon sehr früh das humane CD4 Molekül, ein Vertreter der Immunglobulin Superfamilie, als der primäre Rezeptor identifiziert (Klatzmann et al., 1984). Bis heute konnte eine Reihe von Chemokinrezeptoren, die zu einer Familie von G-Protein gekoppelten Proteinen mit sieben Transmembranregionen gehören, als Korezeptoren für die Infektion mit HIV identifiziert werden. Die Benutzung der verschiedenen Korezeptoren ist abhängig vom Virusstamm und kann sich wie schon erwähnt im Verlauf einer fortschreitenden Infektion ändern (Übersicht in: Berger et al., 1999). Das CD4 Molekül wird auch vom humanen Herpesvirus 7 (HHV 7) für die Infektion benötigt (Lusso et al., 1994) und verdeutlicht dadurch, dass das gleiche zelluläre Molekül von vollkommen unterschiedlichen Viren als Rezeptor genutzt werden kann. Ein weiteres Beispiel für Rezeptoren, die von unterschiedlichen Viren genutzt werden, ist das 46kDa große Transmembranprotein CAR („coxsackie virus-adenovirus receptor“), das auch der Ig-Superfamilie angehört und zwei extrazelluläre Domänen besitzt. In Hamsterzellen transfiziert, vermittelt es sowohl Bindung, als auch Invasion von Coxsackievirus B3 und B4 und Adenovirus 2 und 5 (Bergelson et al., 1997).

Eine besondere Rolle bei der Invasion von Viren in ihre Wirtszellen haben nicht-proteinartige, geladene Zelloberflächenmoleküle. Interaktionen mit Glykosaminoglykanen (GAG, z.B. Heparansulfat, Chondroitinsulfat), die an Zelloberflächen von eukaryotischen Zellen vorhanden sind, wurden für viele Virussysteme beschrieben (Harouse et al., 1991; Compton et al., 1992; Roderiquez et al., 1995; Jackson et al., 1996; Byrnes et al., 1998;

Chung et al., 1998; Iqbal et al., 2000; Akula et al., 2001). Interessanterweise konnten für fast alle diese Viren auch Proteine als Virusrezeptoren identifiziert werden. Glykosaminoglykane werden als sogenannte „attachment“-Rezeptoren bezeichnet. Sie helfen, Viren an Zellen zu binden, bevor der für jedes Virus spezielle „entry“-Rezeptor die Bindung verstärkt und die Invasion des Virus in die Zelle vermittelt. Daten der Flaviviren, speziell von Dengue Virus und des „tick born encephalitis virus“ (TBEV) unterstützen diese Vermutung (Chen et al., 1997; Hung et al., 1999; Putnak et al., 1997). Aufgrund neuer Untersuchungen wird bei einigen Virussystemen vermutet, dass die Bindung an GAG nur nach Passage auf kultivierten Zellen auftritt und keine herausragende Rolle bei der Infektion *in vivo* spielt (Sa-Carvalho et al., 1997; Klimstra et al., 1998; Hulst et al., 2000 und 2001). Auch Sialinsäure, die häufig als terminale Gruppe der Kohlenhydratseitenketten von Zelloberflächenglykoproteinen oder -glykolipiden auftritt, wurde als Rezeptor für Influenza A Viren und für bestimmte Coronaviren (z.B. humanes Coronavirus OC43 und bovines Coronavirus), die ein Hemagglutinin-Esterase (HE) Glykoprotein besitzen, identifiziert (Haywood, 1994). Hierbei binden die Influenzaviren mit dem distalen Bereich des Haemagglutinin (HA) Moleküls an die Sialinsäurereste. Da diese Interaktion des HA Moleküls mit der Sialinsäure eine niedrige Affinität aufweist, wird die hohe Affinität des Virus zu Zelloberflächen wahrscheinlich durch eine Vielzahl dieser Interaktionen mit niedriger Affinität erreicht.

Für das zu der Familie der *Arenaviridae* gehörende, behüllte Lymphozyten Choriomeningitis Virus (LCMV) konnte hingegen ein direkter Zusammenhang zwischen der Assoziation des Virus mit dem zellulären Rezeptor und der Virulenz festgestellt werden. Das Virus gelangt über rezeptorvermittelte Endozytose und pH-Wert abhängiger Fusion in die Nagetierzellen (Borrow & Oldstone, 1994). Als zellulärer Rezeptor wurde α -Dystroglycan bestimmt. Die LCMV-Stämme Armstrong und Clone 13 verursachten nach Infektion einen unterschiedlichen immunsuppressiven Effekt in Mäusen (Borrow et al., 1995). Während Mäuse nach Infektion mit dem Virusstamm Armstrong schnell wieder gesund wurden, war nach Infektion mit dem Virusstamm Clone 13 eine generalisierte Immunsuppression festzustellen. Für den Virusstamm Clone 13 wurde eine höhere Bindungsaffinität an den zellulären Rezeptor ermittelt, die wahrscheinlich die Ursache der starken Virulenz des Virus darstellt. Diese Bindungsaffinität könnte es dem Virusstamm Clone 13 ermöglichen, Zellen zu infizieren, die nur eine limitierte Menge an α -Dystroglycan exprimieren, oder allgemein Zellen effizienter zu infizieren.

Auch für Masernvirus konnten bis jetzt zwei zelluläre Rezeptoren identifiziert werden. Vor einiger Zeit wurde für zwei Laborstämme (Edmonston und Hallé) das humane „membrane

cofactor protein“ (MCP), das auch als CD46 bekannt ist, als Virusrezeptor beschrieben (Naniche et al., 1993; Dörig et al., 1993). Für die überwiegende Zahl klinischer Masernvirusisolate wurde jedoch festgestellt, dass sie nicht auf humanes CD46 als Rezeptor angewiesen sind (Buckland & Wild, 1997; Bartz et al., 1998). Das „signalling lymphocyte-activation molecule“ (SLAM, auch bezeichnet als CDw150) wurde als Rezeptor für alle untersuchten klinischen Isolate des Masernvirus isoliert (Tatsuo et al., 2000; Erlenhöfer et al., 2001). Die Expression von SLAM auf T- und B- Zellen steht sowohl mit dem Zelltropismus als auch der Pathogenese der Masernvirusinfektion (Lymphopenie, Immunsuppression) im Einklang (Yanagi, 2001).

1.3 BVDV

Das Genus Pestivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae* wird aus dem Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) des Rindes, dem Erreger der klassischen Schweinepest (KSPV), der „Border Disease“ (BDV) des Schafes sowie einem Isolat von der Giraffe (giraffe-1) gebildet (Wengler et al., 1995, Heinz et al., 2000, Avalos-Ramirez et al., 2001). Darüber hinaus wurden kürzlich zwei Pestivirusisolate, „Reindeer-1“ und „Bison“, als eine neue Spezies vorgeschlagen (Becher et al., 1999). Die Familie der *Flaviviridae* umfasst außer den Pestiviren die Genera Flavivirus und Hepacivirus. Gemeinsam ist ihnen eine ähnliche Genomorganisation.

Pestiviren sind kleine behüllte RNA Viren mit einer Größe zwischen 40-60nm (Horzinek et al., 1971; Enzmann & Weiland, 1978; Moennig & Plagemann, 1992). Eine Lipidhülle mit eingelagerten Glykoproteinen umgibt das die virale Nukleinsäure enthaltende, vermutlich ikosaedrische Nukleokapsid (Horzinek et al., 1967). Aufgrund ihrer Lipidhülle sind Pestiviren empfindlich gegen Substanzen wie Chloroform, Äther und Detergenzien.

Das pestivirale Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA, die eine Länge von etwa 12,5kb aufweist. Ausnahmen bilden einige BVDV-Isolate bei denen Genome mit einer Größe bis zu 16,5kb beschrieben werden, die auf Duplikationen oder Insertionen zellulärer Sequenzen zurückzuführen sind (Meyers & Thiel, 1996). Die RNA liegt, wie bei allen Vertretern der *Flaviviridae*, in positiver („messenger sense“) Orientierung vor und besitzt einen einzelnen großen Leserahmen. Dieses offene Leseraster kodiert ca. 4000 Aminosäuren und wird am 5′- und 3′-Ende von nicht translatierenden Regionen (NTR) eingerahmt. Die NTR am 5′-Ende weist eine komplexe Sekundärstruktur auf und hat die Funktion einer internen Ribosomenbindungsstelle („internal ribosomal entry site“, IRES), wodurch die Initiation der Translation vermittelt wird (Poole et al., 1995; Rijnbrand et al., 1997). Somit

unterscheiden sich Pestiviren und Hepatitis C Virus bezüglich Initiation der Translation fundamental von den Flaviviren, deren Translation durch die „Cap“-Struktur am 5'-Terminus vermittelt wird (Poole et al., 1995; Tsukijama-Kohara et al., 1992).

Durch ko- und posttranslationale Prozessierung des Polyproteins entstehen die reifen Virusproteine. Unmittelbar am N-Terminus des Polyproteins liegt das Nichtstrukturprotein N^{pro}, das sich autokatalytisch aus dem Polyprotein abspaltet (Stark et al., 1993; Rümenapf et al., 1997). An N^{pro} schließen sich die viralen Strukturproteine an, die im 5'-terminalen Drittel des Genoms kodiert werden. Sie umfassen in dieser Reihenfolge das Nukleokapsidprotein (C) und die Glykoproteine E^{ms}, E1 und E2. Die sich anschließenden C-terminalen zwei Drittel des offenen Leserahmens kodieren ausschließlich für Nichtstrukturproteine. Diese Nichtstrukturproteine enthalten die enzymatischen und strukturellen Komponenten des viralen Replikationskomplexes.

An der Prozessierung des Polyproteins sind sowohl zelluläre als auch viruskodierte Proteasen beteiligt (Collett et al., 1988b, 1988c, 1991; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Die Translokation der Glykoproteine in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) wird durch eine sich an das Kapsidprotein anschließende interne Signalsequenz bewirkt (Rümenapf et al., 1993). Die im ER sofort nach der Translokation stattfindende Spaltung zwischen C und dem Vorläuferprotein, das aus E^{ms}, E1 und E2 besteht, wird durch eine zelluläre Signalpeptidase bewirkt. Weitere Spaltungen der Signalpeptidase zwischen E1 und E2 am C-Terminus schließen sich an (Rümenapf et al., 1993). Alle drei Glykoproteine bilden Dimere, die über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden sind; dabei kommen E^{ms}-Homodimere, E1-E2-Heterodimere und E2-Homodimere vor (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991). Ein dem E^{ms} entsprechendes Genprodukt existiert bei den anderen Genera der Flaviviren nicht (Übersichtsartikel Rice et al., 1996).

Die Bildung neutralisierender Antikörper im Verlauf einer Infektion mit Pestiviren erfolgt vorwiegend gegen E2 und im geringeren Umfang gegen E^{ms}, aber nicht gegen E1 (Weiland et al., 1992). Ebenso konnte im Tierexperiment eine vollständige Immunität nach Gabe aufgereinigter E^{ms}- bzw. E2-Antigene erzeugt werden, während die Gabe von E1-Antigenen unter gleichen Bedingungen zu keiner Immunitätsausbildung führte (König et al., 1995). Außerdem konnte mit in Insektenzellen synthetisierten, gereinigten E2- und E^{ms}-Glykoproteinen von KSPV eine Inhibition der Pestivirusinfektion in Zellkultur festgestellt werden (Hulst et al., 1997). Für E1 wird angenommen, dass es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991).

BVDV Stämme werden aufgrund von Sequenzvergleichen und serologischer Kreuzreaktivität in die beiden Genotypen BVDV I und BVDV II unterteilt (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994). Bei den unter BVDV I zusammengefassten Stämmen handelt es sich um die sogenannten „klassischen“ BVDV Stämme. Sie verursachen bei Rindern im allgemeinen eine milde Diarrhöe und Fertilitätsstörungen. Einige der unter BVDV II eingeteilten (neuen) BVDV Stämme sind dagegen für schwere, durch hohes Fieber und Hämorrhagien gekennzeichnete Krankheitsausbrüche verantwortlich (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994).

Die klassische Schweinepest hat als Tierseuche in vielen Ländern mit intensiver Schweinehaltung eine große wirtschaftliche Bedeutung (Edwards et al., 2000; Saatkamp et al., 2000). KSPV-Infektionen zeigen in ihrer klinischen Ausprägung eine große Variationsbreite von akuter Erkrankung, die mit hoher Letalität einhergeht, über chronische Verläufe bis hin zu subklinischen Krankheitsverläufen mit niedriger Letalität. Als Folge staatlicher Bekämpfungsmaßnahmen hat sich das Krankheitsbild zu einem milderen, häufig unspezifischen Verlauf gewandelt, wobei meist chronische Formen der Erkrankung beobachtet werden (Dunne et al., 1973; Moenning und Plagemann, 1992; Thiel et al., 1996). Die Ausprägung der klinischen Symptome und die Sterblichkeit variiert je nach Virulenz des entsprechenden Virusstamms (Thiel et al., 1996).

Horizontale Infektionen von Schafen und Ziegen mit BDV verlaufen subklinisch oder rufen nur milde Symptome, wie z.B. Diarrhöe und Fertilitätsstörungen hervor (Shaw et al., 1967; Vantsis et al., 1979). Intrauterine Infektionen können hingegen zum Abort des Fötus, zu Missbildungen oder zur Geburt von lebensschwachen, persistent infizierten Lämmern führen (Barlow, 1980).

Das Wirtsspektrum der Pestiviren umfasst ausschließlich Paarhufer. Die Bezeichnung der Virusspezies geht auf die Tierart zurück, aus der sie ursprünglich isoliert wurden und in der sie Krankheitssymptome verursachen. Unter natürlichen Bedingungen konnte die KSPV-Infektion nur in Schweinen nachgewiesen werden. Das Wirtsspektrum von BVDV und BDV ist hingegen weniger eingeschränkt. BVDV konnte auch aus Schafen und Ziegen isoliert werden (z.B. Becher et al., 1997 und 1999).

1.4 Zelluläre Rezeptoren von Pestiviren und mögliche virale Liganden

Die ersten Hinweise, dass es sich bei den Glykoproteinen E2 und E^{tns} um die an der Rezeptorbindung beteiligten viralen Liganden handeln könnte, wurden durch die Anwesenheit neutralisierender Antikörper geliefert (Donis et al., 1988; Weiland et al., 1990; Weiland et al.,

1992). Weiterhin konnte durch die gereinigten Glykoproteine E2 und E^{rns} von KSPV, die in Insektenzellen synthetisiert wurden, die Infektion von porzinen und bovinen Zellen mit den Pestiviren BVDV und KSPV erfolgreich inhibiert werden (Hulst et al., 1997). Hierbei war eine deutlich höhere Konzentration des Glykoproteins E^{rns} (100 µg/ml) gegenüber dem E2 (10 µg/ml) erforderlich, um eine vollständige Inhibition der KSPV-Infektion zu erzielen. Dieser für die vollständige Inhibition ermittelte, deutliche Konzentrationsunterschied der beiden Glykoproteine konnte als Hinweis gelten, dass diese beiden viralen Hüllproteine mit unterschiedlichen Zelloberflächenmolekülen interagieren.

Weiterhin wurden für Pestiviren Interaktionen mit geladenen Zelloberflächenproteinen beschrieben. KSPV konnte *in vitro* durch Heparin und Dextransulfat sowie durch Behandlung der Kulturzellen mit Heparinase gehemmt werden, wobei das Glykoprotein E^{rns} an der Wechselwirkung beteiligt war. Allerdings wurde dies nur für Laborstämme festgestellt, die für eine lange Passagedauer in Kulturzellen gehalten wurden. Anschließende Sequenzanalysen führten zur Identifikation eines einzigen Aminosäureaustausches im Glykoprotein E^{rns}, der zu diesem veränderten Phänotyp führte (Hulst et al., 2000). Für den BVDV Stamm PE515 konnte *in vitro* sowohl eine Interaktion des Glykoproteins E^{rns} mit verschiedenen Glukosaminoglykanen (Heparin, Fucoidan, Dermatansulfat) als auch eine Hemmung der Virusinfektion durch Präinkubation der Zellen mit diesen Substanzen festgestellt werden (Iqbal et al., 2000).

Mit Hilfe von anti-idiotypischen Antikörpern, die gegen einen anti-E2 Antikörper gerichtet sind, gelang die Identifizierung eines Zelloberflächenproteins von 50kDa, für das eine Rezeptoreigenschaft für BVDV postuliert wurde (Xue et al., 1991). Hierbei wurde vorausgesetzt, dass das virale Strukturprotein E2 den rezeptorbindenden Liganden darstellt (Xue & Minocha et al., 1993). Durch die anti-idiotypischen Antikörper konnte die Infektion boviner Zellen nur mit bestimmten BVDV Stämmen gehemmt werden. Hierbei konnte eine maximale Inhibition von 60% erzielt werden. Für den BVDV Stamm NADL wurde eine Inhibition von 30% erreicht, während bei einigen BVDV Stämmen keinerlei Hemmung festzustellen war. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass auf den untersuchten Zellen mehrere Rezeptoren für BVDV vorhanden sind, deren Bedeutung bei der Infektion mit unterschiedlichen BVDV Stämmen variiert. Das 50kDa Zelloberflächenprotein konnte jedoch auch auf nicht infizierbaren Zellen (z.B. von Affen) nachgewiesen werden (Zhang et al., 1998).

Der Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose verschiedener Flaviviren stand im Fokus von Untersuchungen über das mit Pestiviren verwandte Hepatitis C Virus. In diesem

Zusammenhang wurden auch Experimente mit BVDV durchgeführt, die auf eine Beteiligung des „low density lipoprotein receptor“ (LDLR) bei der BVDV Infektion hinwiesen (Agnello et al., 1999). Hierfür sprachen sowohl die infektionshemmende Wirkung eines mAk gegen LDLR als auch die Abwesenheit von LDLR auf der Oberfläche von sogenannten „cells resistant to BVDV infection“ (CRIB Zellen), die mit Pestiviren nicht infizierbar sind (Flores & Donis, 1995).

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung des zellulären Rezeptors von BVDV basiert auf der Isolierung der drei monoklonalen Antikörper (mAk) BVD/CA 17, 26 und 27, die gegen die Oberfläche von bovinen Zellen gerichtet sind (Schelp et al., 1995). Diese mAk wurden im Verlauf einer Immunisierung von Mäusen mit angereicherten BVD Virionen erhalten und bei der Charakterisierung BVDV-neutralisierender Antikörper identifiziert. Mit BVD/CA 17, 26 und 27 konnte die Infektion boviner Zellen mit verschiedenen BVDV Stämmen spezifisch und konzentrationsabhängig gehemmt werden. Die von den mAk erkannten Proteine hatten ein apparentes Molekulargewicht von 60kDa und 93kDa und konnten nur auf bovinen Zellen nachgewiesen werden.

Aufbauend auf dieser Arbeit gelang durch Immunaффinitätschromatographie mit dem mAk BVD/CA 17 die Darstellung des 60kDa Proteins aus Kalbsthymus (Maurer, Diss. 2002). Mittels N-terminaler Sequenzierung des gereinigten Proteins gelang die Identifizierung von bovinem CD46 (CD46_{bov}). Hierauf aufbauend erfolgte die cDNA-Klonierung und Expression des CD46_{bov}. Während die Expression von CD46_{bov} in nicht infizierbaren Zellen für die Infektion mit BVDV nicht ausreichte, konnte jedoch für die porcine Zelllinie PK15, die permissiv für BVDV ist, durch Expression des CD46_{bov} die Infektionseffizienz deutlich gesteigert werden. Durch Vorinkubation mit anti-CD46 Antikörpern wurde diese Steigerung der Infektionseffizienz verhindert.

1.5 Identifizierung von Domänen im humanen CD46, die für Bindung, Infektion und Anheftung von pathogenen Erregern bedeutsam sind

Das Glykoprotein CD46, das auch als „membrane cofactor protein“ (MCP) bezeichnet wird, konnte bisher auf allen untersuchten kernhaltigen Zellen nachgewiesen werden. Als Angehöriger der Familie der Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) schützt es körpereigene Gewebe durch Bindung der aktivierten Komplementkomponenten C3b und C4b vor der unspezifischen Selbstzerstörung (Liszewski & Atkinson, 1992).

Die N-terminale, extrazelluläre Domäne enthält vier für RCA Proteine typische Sequenzen („complement control protein“, CCP). Es handelt sich hierbei um 60-70 Aminosäuren lange

Abschnitte (Reid et al., 1986), die jeweils vier hoch konservierte Cysteine und ein ebenso konserviertes Tryptophan enthalten (Hourcade et al., 1989). In CCP1, CCP2 und CCP4 ist jeweils eine potentielle N-Glykosylierungsstelle vorhanden. An die CCP-Domänen schließt sich eine Region, die überdurchschnittlich viele Serine, Threonine und Proline enthält (STP-Region) und eine 12 Aminosäuren lange Sequenz unbekannter Funktion an. CD46 ist ein Typ 1 Transmembranprotein, dessen Verankerung in der Plasmamembran durch eine hydrophobe Transmembranregion bewirkt wird. Auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich eine kurze C-terminale Domäne (Abb.1). Im menschlichen Körper wurden hauptsächlich vier Spleissvarianten von CD46 festgestellt (Post et al., 1991; Purcell et al., 1991). Diese durch alternatives Spleissen vorkommenden unterschiedlich großen Isoformen unterscheiden sich durch die variable Transkription verschiedener Exons in der STP Region und durch die Wahl zwischen zwei verschiedenen zytoplasmatischen Domänen (Cyt1 und Cyt2) (Abb.1). Die gleichzeitige Expression dieser vier Spleissvarianten in den meisten Zelltypen führt zu einem heterogenen Erscheinungsbild nach elektrophoretischer Auftrennung, wobei zwei Isoformen der größeren Bande (59-68kDa) und zwei Isoformen der kleineren Bande (50-58kDa) zugeordnet wurden (Post et al., 1991). Der apparente Größenunterschied beider Banden erklärt sich durch extensive O-Glykosylierung im Bereich der STP Region (Liszewski & Atkinson, 1992).

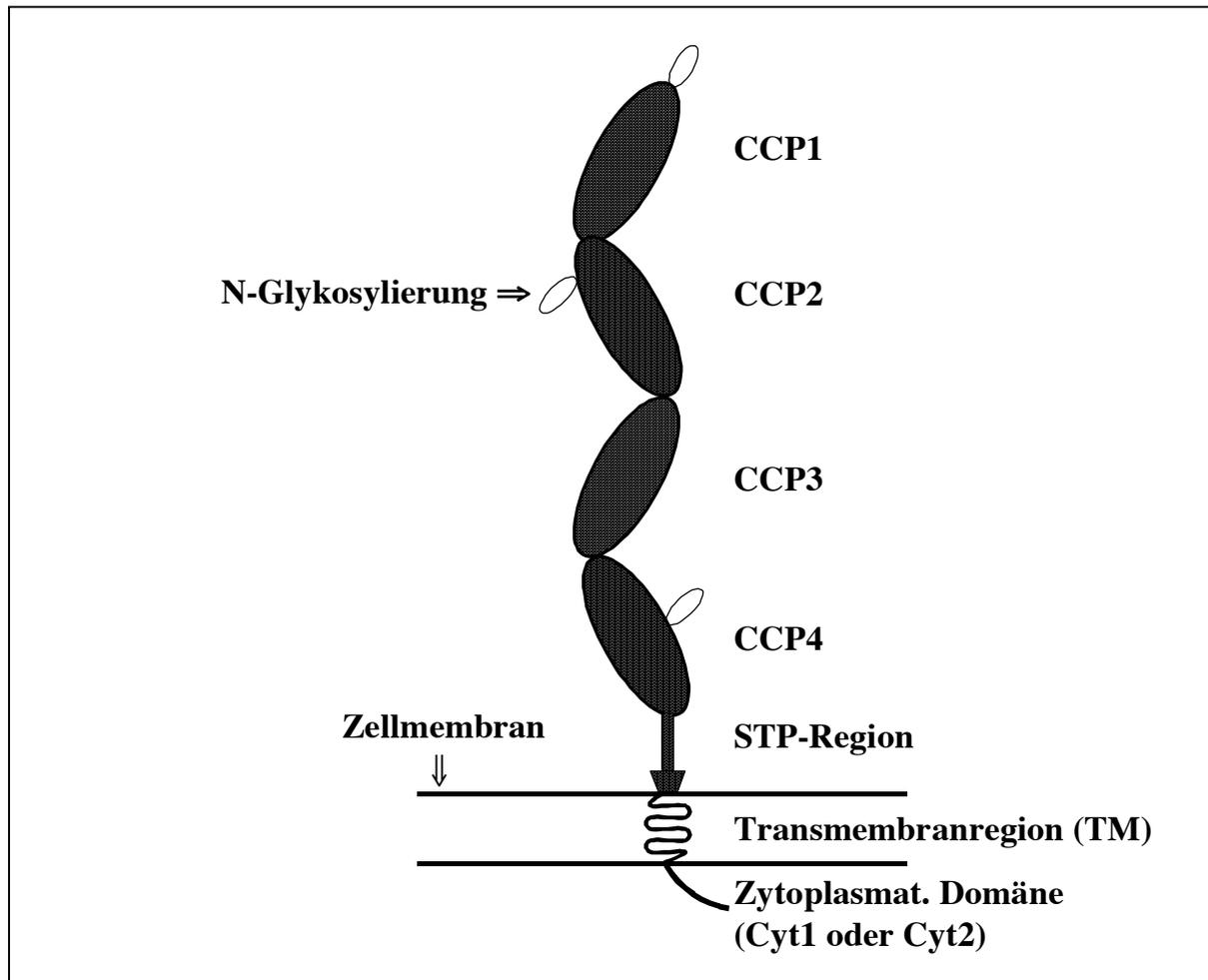


Abb.1: Schematischer Aufbau des humanen CD46

Der extrazelluläre Anteil des Proteins enthält vier CCP-Domänen („complement control protein“), an denen sich drei potentielle N-Glykosylierungsstellen befinden und die STP-Region (Serin/Threonin/Prolin-reiche Region). Der intrazelluläre Anteil des CD46 wird durch eine der beiden zytoplasmatischen Domänen Cyt1 oder Cyt2 gebildet.

Humanes CD46 wurde als zellulärer Rezeptor für zwei Masernvirus Laborstämme (Edmonston und Hallé) und für Zellkultur-adaptierte Stämme (Dörig et al., 1993; Nanche et al., 1995), für humanes Herpesvirus 6 (HHV 6) (Santoro et al., 1999), für das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* (Okada et al., 1995), für *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* (Källström et al., 1997) identifiziert.

Bereits 1993 wurde CD46 von Nanche et al. mit Hilfe von infektionshemmenden monoklonalen Antikörpern als Rezeptor für das Masernvirus identifiziert. Nicht infizierbare Nagetierzellen erlangten durch konstitutive Expression von humanem CD46 die Fähigkeit,

Virionen zu binden und Masernvirusproteine zu produzieren (Dörig et al., 1993). Zudem war zu beobachten, dass CD46 nach der Infektion mit Masernviren spezifisch herunterreguliert wird (Naniche et al., 1993; Krantic et al., 1995). Für die beiden Masernvirus Laborstämme Edmonston und Hallé konnte die Interaktion des viralen Haemagglutinin mit den Domänen CCP1 und CCP2 detailliert beschrieben werden (Manchester et al., 1995; Iwata et al., 1995; Übersicht Manchester et al., 2000). Um die Relevanz der drei im humanen CD46 vorkommenden N-Glykosylierungsstellen nachzuweisen, wurden CHO- („chinese hamster ovary“) Zelllinien etabliert, die humane CD46-Mutanten stabil exprimieren (Maisner et al., 1996). Diesen Mutanten wurden die N-Glykosylierungsdomänen in unterschiedlicher Anzahl entfernt. In verschiedenen Versuchsansätzen wurde die Bindung des Masernvirus Hemagglutinin an die CD46-Mutanten, die Bindung von Masernvirus an die CD46-Konstrukte und schließlich noch die Empfänglichkeit von CHO-Zellen, die die CD46-Mutanten transient exprimieren, für Masernvirus getestet. Anhand dieser Experimente konnte festgestellt werden, dass die N-Glykosylierungsstelle der CCP2-Domäne von humanem CD46 für Bindung und Empfänglichkeit der Masernvirus Laborstämme essentiell ist.

Anhand einer Kombination aus Peptid-Inhibition und Mutagenesestudien konnte jeweils in CCP1 und in CCP2 eine für die Bindung von Masernvirus relevante Domäne identifiziert werden (Manchester et al., 1997). Für diese Peptid-Inhibition wurden Oligopeptide aus dem Sequenzbereich von CCP1 und CCP2, die aus 20 Aminosäuren (aa) bestehen, hergestellt. Lösliches CD46 und die beiden Peptide, die die aa37-56 von CCP1 und die aa85-104 enthielten, führten zu einer Inhibition der Infektion. Die Kristallstruktur der CCP1 und CCP2-Domänen des humanen CD46 wurde im Hinblick auf die Virus-Bindungseigenschaft dieser Region bestimmt (Casasnovas et al., 1999).

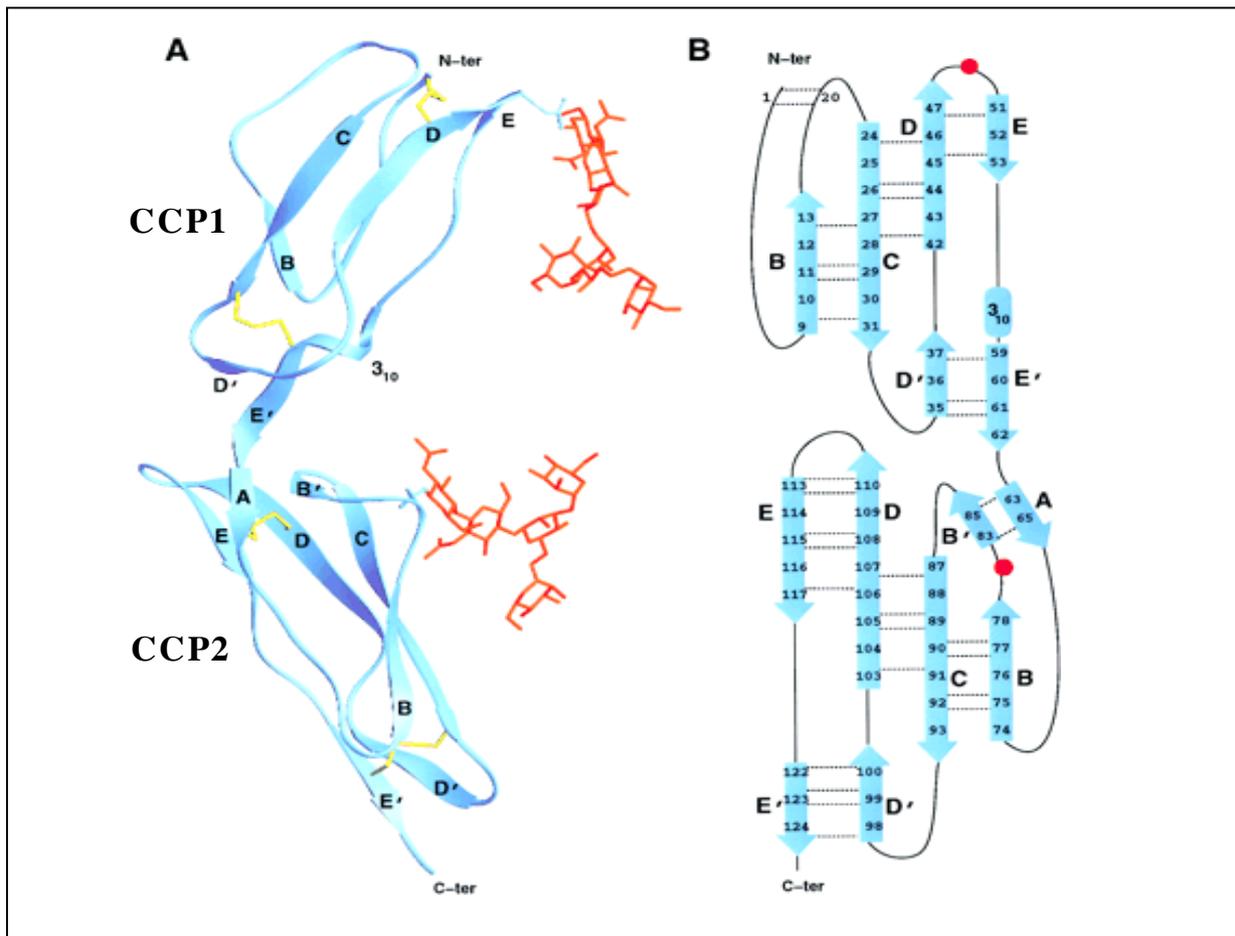


Abb.2: Struktur der N-terminalen CCP-Domänen (CCP1 und CCP2) von humanem CD46 (aus Casanovas et al., 1999)

- (A) Die Disulfidbrücken sind in gelb und die Kohlehydratreste in rot dargestellt.
 (B) Darstellung der β -Faltblattstruktur. Mit roten Punkten sind die N-Glykosylierungsstellen markiert.

Die Etablierung sogenannter „Hybrid-Rezeptoren“, die aus einer unterschiedlichen Anzahl und Kombinationen der CCP-Domänen von humanem CD46 und der immunglobulin-ähnlichen Domänen des Zelloberflächenproteins CD4 bestanden, führten zu der Feststellung, dass neben der Anwesenheit von CCP1 und CCP2 die Länge des humanen CD46 eine wichtige Rolle für Virusbindung und Infektion spielt (Buchholz et al., 1996). Für humanes CD46 wurde eine Länge von 100Å bestimmt (Barlow et al., 1993), eine Verlängerung des Proteins auf 120Å führte zwar zu einer stärkeren Virusbindung, die Fusionseffizienz wurde jedoch deutlich vermindert.

Auch die natürlichen Liganden des CD46, C3b und C4b, binden an Strukturen innerhalb der vier CCP-Domänen (Liszewski et al., 2000). 80-90% der extrazellulären Domäne werden im CD46 von den CCP-Domänen gebildet. Die CCP-Domäne ist ein gemeinsames Strukturmotiv der Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA), der neben dem Membranprotein CD46 (vier CCP), den Komplementrezeptoren CR1 und CR2 (30 bzw. 16 CCP) sowie „decay accelerating factor“ (DAF/CD55, vier CCP), die sezernierten Proteine Faktor H (20 CCP) und C4bp (7 Untereinheiten à 8 CCP) angehören (Hourcade et al., 1989).

Humanes CD46 und CD55 besitzen für CCP1 und CCP2 eine Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz von 40%. Die für die Bindung und Infektion für Masernvirus essentiellen Bereiche wurden von CD55 in humanes CD46 eingeführt (Manchester et al., 1997). Es wurde ein Bindungsverlust festgestellt und somit die Daten der o.g. konstruierten Proteine bestätigt.

Auch für das humane Herpesvirus 6 (HHV 6) wurde CD46 als zellulärer Rezeptor beschrieben (Santoro et al., 1999). Zunächst wurde hier eine Herunterregulierung des CD46 Moleküls während der Infektion beobachtet. Sowohl mit anti-CD46 monoklonalen Antikörpern als auch mit löslichem CD46 konnte die Infektion spezifisch gehemmt werden. Die Expression von rekombinantem CD46 vermittelte den Eintritt von HHV 6 Virionen in nicht infizierbare Mäusezellen.

Bakterielle Krankheitserreger benutzen CD46 ebenfalls als Eintrittspforte in ihre Wirtszellen, wobei sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien beschrieben wurden. Das M Protein des Scharlacherregers *Streptococcus pyogenes* bindet im Verlauf der Zellerkennung an CD46 von Keratinozyten (Okada et al., 1995). Pathogene Neisserien, zu denen der Erreger der Gonorrhöe (*Neisseria gonorrhoeae*) und der Meningitis (*Neisseria meningitidis*) zählen, dringen in die Wirtszellen ein, nachdem sie mit ihren Pili Kontakt zu CD46 aufgenommen haben (Källström et al., 1997). Deletionskonstrukte des humanen CD46 zeigten für *Neisseria gonorrhoeae* eine Abhängigkeit von der STP-Region, CCP3 und der zytoplasmatischen Domäne (Cyt1) für die Anheftung von pilus-bildenden *N.gonorrhoeae* Bakterien an die Wirtszellen auf (Källström et al., 2001).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

CD46_{bov} wurde als ein potentieller zellulärer Rezeptor von BVDV vorgeschlagen (Maurer, Diss. 2002). Grundlage dieser Annahme war, dass CD46_{bov} die Epitope für infektionsinhibierende mAk trägt. Zusätzlich konnte für porcine Zellen (PK15) durch CD46_{bov} Expression eine Vermittlung der Empfänglichkeit für BVDV nachgewiesen werden (Maurer, Diss. 2002). Humanes CD46 ist bereits als Rezeptor für mehrere Viren bekannt. Die Hypothese, dass CD46_{bov} als Rezeptor für BVDV dient, sollte weiter untersucht und die Rezeptorfunktion gegebenenfalls bestätigt werden. Insbesondere war hierbei die Virusbindung von Interesse. Falls sich diese Hypothese bestätigen ließe, waren als weitere Analysen die molekulare Charakterisierung der Interaktion zwischen dem zellulären Rezeptor CD46_{bov} und BVDV geplant.

Im Einzelnen handelte es sich um folgende Ziele:

- Quantitativer Nachweis der Bindung zwischen BVDV und CD46_{bov} und damit Bestätigung der Rezeptorfunktion von CD46_{bov}.
- Nach erfolgreicher Feststellung der Bindung sollte die Bindungsstelle im CD46_{bov} näher charakterisiert werden.
- Identifizierung des viralen Glykoproteins, das bei der Interaktion zwischen dem zellulären Rezeptor CD46_{bov} und BVDV als Ligand dient.
- Im Anschluss an die Identifikation des Glykoproteins sollte eine nähere Charakterisierung der Bindungsstelle erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 eukaryotische Zelllinien

SK6-Zellen („swine kidney“-Zelllinie):	Institut für Virologie, Gießen
SK6 Tet on: („swine kidney“-Zelllinie mit BD Tet-On™ System)	Institut für Virologie, Gießen
BHK 21-Zellen („baby hamster kidney“-Zelllinie):	ATCC Nummer: CCL-33
MDBK-Zellen („marbin darby bovine kidney“):	ATCC Nummer: CCL-22
38A ₁ D-Zellen (Schweine-Lymphom):	Strandström et al., 1974

2.1.2 prokaryotische Zellen

E.coli K12-Stamm HB 101

2.1.3 Virusstämme

NADL (BVDV I):	beschrieben in: Collett et al., 1988a
Vacciniavirus MVAT7:	GSF, Neuherberg

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper:

mAk A18:	gegen das virale Strukturprotein E2 von KSPV gerichteter monoklonaler Antikörper (Weiland et al., 1990)
mAk D5:	gegen das virale Strukturprotein E2 von BVDV gerichteter monoklonaler Antikörper (Weiland et al., 1990)
mAk BVD/CA 17, 26, 27:	gegen bovines CD46 gerichtete monoklonale Antikörper (Schelp et al., 1995)
mAk Code 4:	gerichtet gegen das pestivirale Nichtstrukturprotein NS3, Institut für Virologie, Gießen
mAk WB214:	gegen das Glykoprotein E2 von BVDV gerichteter monoklonaler Antikörper (Fa. Veterinary Laboratories Agency Weybridge, U.K.)
anti-CD46-Serum:	polyklonales Kaninchenserum gegen bovines CD46, Institut für Virologie, Gießen

K76 anti-E2-Serum: polyklonales Kaninchenserum gegen KSPV Glykoprotein E2,
Institut für Virologie, Gießen

Sekundärantikörper:

Ziege anti-Maus IgG, Meerettich-Peroxidase-konjugiert Fa. Dianova
Ziege anti-Kaninchen IgG, Meerettich-Peroxidase-konjugiert Fa. Dianova

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fa. Boehringer Mannheim
<i>DpNI</i>	Fa. Stratagene
human placenta ribonuclease inhibitor (HPRI)	Fa. Takara
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fa. Stratagene
RNase A	Fa. Alexis
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England BioLabs
	Fa. Takara
Sp6 RNA-Polymerase	Fa. Takara
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fa. New England BioLabs
T4-DNA-Ligase	Fa. MBI-Fermentas
T4-DNA-Polymerase	Fa. Takara
T4-Polynukleotidkinase	Fa. New England BioLabs
Trypsin	Fa. Sigma

2.1.6 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Aceton	Fa. Roth
Acrylamid (reinst, 2x krist.)	Fa. Serva
Agar-Agar	Fa. DIFCO
Agarose	Fa. GIBCO (Invitrogen Corporation)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fa. Aldrich
Ampicillin	Fa. Fluka
β -Mercaptoethanol	Fa. Fluka
Bromphenolblau	Fa. Sigma
BSA	Fa. Serva
Calciumchlorid	Fa. Merck
Chloroform	Fa. Fluka
Desoxy(ribo)nukleotide	Fa. Boehringer Mannheim
Doxycyclin	Fa. ICN
Ethanol	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer Mannheim
G418 Sulfat	Fa. Calbiochem
Harnstoff	Fa. United States Biochemical
Isopropanol	Fa. Fluka
Methanol	Fa. Fluka
Natriumacetat	Fa. Merck
Natriumhydroxid	Fa. Fluka
Octylglucosid	Fa. Calbiochem
Optiprep Density Gradient Medium	Fa. Sigma-Aldrich

Penicillin	Fa. Sigma
Phenol	Fa. Appligene
Protein A-Sepharose	Fa. Pharmacia
Puromycin dihydrochlorid	Fa. Alexis Biochemicals
Roti-block	Fa. Roth
Rotiszint eco plus	Fa. Roth
Rubidiumchlorid	Fa. Fluka
Schwefelsäure	Fa. Fluka
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. ICN
Streptomycin	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Fluka
Triton X-100	Fa. Fluka
TWEEN 20	Fa. Fluka
Wasser, RNase frei	Fa. Roth

Weitere hier nicht im einzelnen aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen GIBCO, Fluka, Serva, Sigma und Roth mit dem Reinheitsgrad p. A. bezogen.

2.1.7 radioaktiv markierte Substanz

[5,6- ³ H]-Uridin	Fa. Amersham-Pharmacia (Best.-Nr. TRK410, 38,8Ci/mmol, 1,0mCi/ml)
------------------------------	--

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Fa. Braun
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Nitrocellulosemembran	Fa. Pall
Nukleobond AX 100-Säulen	Fa. Macherey & Nagel
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Röntgenfilm Biomax	Fa. Kodak
Ultrafiltrator	Fa. Amicon

2.1.9 Geräte (Aufzählung nicht explizit im Kapitel 2.2 Methoden erwähnter Geräte)

Glaswaren	Fa. Schott
Kühlwasserbad RM6	Fa. LAUDA
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA-Works, INC
Mikroskop Eclipse TS 100	Fa. Nikon
Pipetten	Fa. Eppendorf; Fa. Gilson
Reinstwasseranlage	Fa. Purolab
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Fa. AGFA
Spannungsgeräte	Fa. Biorad; Fa. Stratagene
Vortex	Fa. IKA; Fa. Works
Waagen	Fa. Mettler
Wasserbad	Fa. Braun

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten

2.2.1.1 Medien und Puffer

Dulbecco´s MEM
mit Zusätzen (10l):

Dulbecco´s MEM Pulvermedium; GIBCO (Invitrogen Corporation)

0,0178g/l	L-Alanin
0,07g/l	Glycin
0,075g/l	L-Glutaminsäure
0,025g/l	L-Prolin
0,1mg/l	Biotin
0,025g/l	Hypoxantin
3,7g/l	NaHCO ₃

Vor Gebrauch wurden 10%iges fötales Kälberserum (FKS), 100 000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin zugegeben.

Trypsinlösung:

8,0g/l	NaCl
0,2g/l	KCl
1,44g/l	Na ₂ PO ₄
0,2g/l	KH ₂ PO ₄
2,5g/l	Trypsin (1:250)
1,23g/l	Versen (EDTA)
0,016g/l	Phenolrot
mit 1 N HCL auf pH 7,4 einstellen	

PBS defiz.:

0,25g/l	KCl
1,8g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,25g/l	KH ₂ PO ₄
10g/l	NaCl

PBS:

PBS defiz.	
0,1g/l	CaCl ₂
0,1g/l	MgCl ₂ x 6H ₂ O

2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Geräte: Brutschränke mit CO₂ Begasung, Fa. Forma Scientific; Fa. Memmert
Sterilbänke: LaminAir, Fa. Heraeus
Zellen: 38A₁D, SK6, SK6 Tet on, MDBK, BHK 21
Medien: Dulbecco´s MEM, Trypsinlösung

Alle Zellen wurden in Brutschränken bei 5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken durchgeführt.

Nach Wachstum der Zellen zu einem konfluenten Zellrasen erfolgte die Passage der Zellen. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen anschließend mit 5ml Trypsin-Lösung inkubiert. Bevor sich die Zellen von der Platte ablösten, wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen noch zwei bis drei Minuten in den Brutschrank gestellt. Hiernach erfolgte die Aufnahme der Zellen in Medium und in geeigneten Verdünnungen die Verteilung auf frische Gewebekulturschalen. Um 38A₁D-Zellen zu passagieren, konnte auf eine Trypsinbehandlung vor dem Abspülen der Zellen vom Boden der Gewebekulturschale verzichtet werden, da diese Zellen nicht fest am Boden der Kulturschale haften.

2.2.1.3 Transfektion von zirkulärer Plasmid DNA

Zellen: BHK 21, SK6 Tet on
Substanzen: Superfect Reagent, Fa. QIAGEN
MetafecteneTM, Fa. Biontex
Medien: Dulbecco´s MEM ohne FKS und Antibiotika; Dulbecco´s MEM mit FKS und Antibiotika, Dulbecco´s MEM FKS-haltiges Kulturmedium mit 100µg/ml G418
Virus: Vaccinia MVAT7

Für das Einbringen der Plasmid DNA in BHK 21-Zellen erwies sich die kationische Trägersubstanz Superfect als optimal. Für die Transfektion wurden 2,5µg DNA mit 10µl Reagent gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 500µl Dulbecco´s MEM ohne FKS- und Antibiotikazusatz wurde, nachdem der Zellkulturüberstand abgesaugt worden war, ein Ansatz auf die Zellen eines „wells“ (Ø35mm) einer 6-well-Gewebekulturschale (1x 10⁵ Zellen) gegeben. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollte der Grad der Konfluenz ca. 80% betragen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3h im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel mit Dulbecco´s MEM inklusive FKS und Antibiotikazusatz.

Zur Steigerung der Expression von pcDNA3 Plasmiden wurden BHK 21-Zellen zuerst 1h bei 37°C mit Vaccinia Virus (MVAT7) infiziert. Das pcDNA3 Plasmid enthält unter anderem

einen T7-RNA-Polymerase Promotor. Dies ermöglicht die Expression in eukaryotischen Zellen mit Hilfe des rekombinanten MVAT7. MVAT7, das eine T7-RNA-Polymerase exprimiert, führt hierbei zu einer deutlichen Steigerung der Expression, da die Transkription der Plasmide im Zytoplasma erfolgt.

Für das Einbringen von linearisierter DNA in SK6 Tet on Zellen wurde die kationische Trägersubstanz MetafecteneTM verwendet. Für die Transfektion wurden 2µg DNA mit 100µl Dulbecco's MEM ohne Antibiotika- und FKS-Zusatz gemischt, parallel wurden 10µl der Trägersubstanz in 100µl Kulturmedium ohne Antibiotika- und FKS-Zusatz gegeben. Beide Ansätze wurden anschließend miteinander vermischt und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300µl Dulbecco's MEM ohne Antibiotika- und FKS-Zusatz wurde, nachdem der Zellkulturüberstand abgesaugt worden war, der Ansatz auf ca. 1×10^5 SK6 Tet on Zellen in ein „well“ einer 6-well-Gewebekulturschale gegeben. Nach 4h wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen mit FKS-haltigem Kulturmedium mit 100µg/ml G418 kultiviert.

2.2.1.4 Etablierung induzierbarer SK6 Tet on Zelllinien

Zellen: SK6 Tet on

Grundlage der verwendeten Zelllinien waren SK6 Tet on Zellen, die stabil mit dem sogenannten pTet on Regulatorplasmid transfiziert worden waren und dadurch eine G418 Resistenz trugen.

Das pTet on Regulatorplasmid enthält das Gen des Regulatorproteins „reverse tetracycline-controlled transactivator“ (rtTA), das eine durch Zugabe von dem Tetracyclinderivat Doxycyclin induzierbare Transkription erlaubt. Um mit den SK6 Tet on Zellen ein bestimmtes Protein exprimieren zu können, muss die Nukleotidsequenz in das „Tetrazykline Response Element“-Plasmid (pTRE) kloniert werden. Die CD46 Austauschmutanten wurden über Restriktionsspaltungen mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamH I* und *Bgl II* in das mit dem Restriktionsenzym *BamH I* verdaute pTRE-Plasmid kloniert. Das pTRE-Plasmid wurde über eine stabile Transfektion in die SK6 Tet on Zellen eingebaut. Hierfür wurde das pTRE-Plasmid durch *Fsp I* linearisiert. Zur Selektion wurde ein sogenanntes „Selektionsplasmid“ das pEF-PAC Plasmid in einem Verhältnis von 1:20 kotransfiziert, da pTRE keine Resistenz kodiert. Hierfür wurde das pEF-PAC Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Hind III* linearisiert. Das pEF-PAC Plasmid kodiert eine Puromycinresistenz und ermöglicht somit

durch Zugabe von 5µg/ml Puromycin zum Kulturmedium die Selektion von Zellklonen, die dieses Plasmid enthalten.

SK6 Tet on Zellen wurden 24h vor Transfektion in 6-well-Gewebekulturschalen ausgesät, so dass sich ein konfluenter Zellrasen bildete. Die SK6 Tet on Zellen wurden mit Metafectene™ (Fa. Biontex) mit den linearisierten pTRE- und pEF-PAC Plasmiden stabil transfiziert (siehe 2.2.1.3). 4h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und in FKS-haltigem Kulturmedium mit 100µg/ml G418 und 2mg/ml Puromycin aufgenommen. Von den Zellen einer transfizierten 6-well-Gewebekulturschale wurden Verdünnungsstufen von 1:2, 1:5, 1:10 und 1:100 in Ø10cm Gewebekulturschalen ausgesät. Nach einer Woche bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für eine weitere Woche kultiviert. Nach ca. 2 Wochen waren resistente Einzelzellklone gewachsen, die mit Hilfe von mit Trypsinlösung getränkten Filterpapierstückchen isoliert und auf 24-well-Gewebekulturschalen separat kultiviert werden konnten. Nach 24h wurden die Filterpapierstückchen entfernt und die Zellklone wurde solange kultiviert, bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte.

2.2.1.5 Elektroporation von RNA in SK6-Zellen

Zellen: SK6-Zellen
 Geräte: Elektroporationsapparatur (0,18kV, 950µF, ∞ Ohm), Fa. BioRad
 Elektroporationsküvetten (Ø2mm), Fa. BioRad
 Kühlzentrifuge Laborfuge 400R, Fa. Heraeus
 Lösungen: Trypsinlösung, PBS defiz.
 Medien: Dulbecco´s MEM mit FKS und Antibiotika

Die Transfektion von RNA in SK6-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierbei wird mittels eines kurzen elektrischen Impulses die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert, und die RNA kann auf diese Weise in das Zellinnere gelangen. Für die Transfektion wurden etwa 5×10^6 SK6-Zellen verwendet, die am Vortag in einer Verdünnung von 1:5 ausgesät worden waren. Für die Transfektion wurden die Zellen abgelöst und mit FKS-haltigem Zellkulturmedium gewaschen (zentrifugieren bei 194xg für 5min), bevor sie nach erneuter Pelletierung mit PBS defiz. gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen in PBS defiz. aufgenommen (pro Elektroporationsansatz 300µl PBS defiz.) und auf die Elektroporationsküvetten (Ø2mm) verteilt. Sofort nach Zugabe der RNA (1µg RNA/Elektroporationsansatz) erfolgte die Elektroporation bei 0,18kV, 950µF, ∞ Ohm.

Tween verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT und zweifachem Waschen für jeweils 5min mit PBS + 0,01% Tween erfolgte die Detektion der Antikörperbindung durch Inkubation mit dem Substrat, das durch die Peroxidase in einen wasserunlöslichen roten Niederschlag umgesetzt wurde.

2.2.1.8 Zytoplasmatische Markierung von Zellen

Reagenz: Vybrant™ Cell Adhesion Assay Kit (V-13181), Fa. Molecular Probes
Zellen: 38A₁D, 38A₁D CD46
Medium: Dulbecco´s MEM ohne FKS und Antibiotika
Geräte: Kühlzentrifuge Laborfuge 400R

Die Markierung von Zellen mit dem Vybrant™ Cell Adhesion Assay Kit basiert auf der Methode von Akeson und Woods (Akeson & Woods, 1993). Nach Aufnahme in Zellen wird das Reagenz Calcein AM von Esterasen gespalten und in stark fluoreszierendes Calcein umgewandelt. Calcein ist ein pH-Wert unabhängiger, zytoplasmatischer Zellfarbstoff. 2×10^7 38A₁D und 38A₁D CD46 Zellen wurden von der Ø10cm Gewebekulturschale abgelöst und 2min bei 328xg pelletiert. Die Zellen wurden in 10ml Medium ohne Antibiotika und FKS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 600µl serum- und antibiotikafreiem Medium resuspendiert und mit 6µl Calcein AM (10µM) 30min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch dreimalige Zentrifugation und Resuspension gewaschen und überflüssiger Farbstoff entfernt. Pro Zelladsorptionstest wurden ca. 1×10^6 dieser markierten Zellen eingesetzt.

2.2.1.9 Zelladsorptionstest

Zellen: BHK 21, markierte 38A₁D und 38A₁D CD46
Lösungen: PBS
Geräte: Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35, Fa. Zeiss

Für den Zelladsorptionstest wurden BHK 21-Zellen mit den zu testenden Konstrukten im pcDNA3 Plasmid transfiziert (siehe 2.2.1.3). 24h nach erfolgter Transfektion wurden die nach 2.2.1.7 mit Calcein markierten Zellen zu den BHK 21-Zellen gegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschritte mit PBS bevor die BHK 21-Zellen im Fluoreszenzmikroskop auf Adsorption von markierten Zellen untersucht wurden.

2.2.2. Bindungsassay mit [³H] markiertem BVD NADL Virus

2.2.2.1 Virusmarkierung mit [³H]-Uridin

Virus: BVDV NADL

Zellen: MDBK

Substanz: [5,6-³H]-Uridin, Fa. Amersham-Pharmacia
Optiprep Density Gradient Medium 60%, Fa. Sigma-Aldrich
Szintillationscocktail rotiszint eco plus, Fa. Roth

Geräte: Kühlzentrifuge Laborfuge 400R, Fa. Heraeus
Ultrazentrifuge L8-70, Fa. Beckman
Liquid scintillation counter (LSC) 1209 Rackbeta, Fa. Wallac

Medium: Dulbecco's MEM mit Antibiotika- und FKS-Zusatz

1x10⁷ MDBK-Zellen wurden auf zwei (Maxi-) Ø15cm Gewebekulturschalen verteilt, so dass sich nach 24h bei 37°C im Brutschrank ein zu 80% dichter Zellrasen ausgebildet hatte. Nach 24h wurde das Medium der Ø15cm Gewebekulturschale entfernt und die Zellen mit BVDV NADL mit einer m.o.i. von 0,1 in 6ml Dulbecco's MEM mit Antibiotika- und FKS-Zusatz 1h bei 37°C infiziert. Das Medium wurde anschließend auf 20ml aufgefüllt. Nach 26h (beginnender zytopathischer Effekt) wurde das Kulturmedium durch 12ml frisches Medium ersetzt, das 500µl [5,6-³H]-Uridin (Fa. Amersham-Pharmacia) enthielt. Nach weiteren 48h wurden die Kulturüberstände abgenommen und durch Zentrifugation für 30min bei 4°C und 3939xg von Zellpartikeln o.ä. Bestandteilen grob gereinigt. Um das markierte Virus aus dem Kulturüberstand zu isolieren, wurde der Überstand über Nacht bei 4°C mit 38581xg ultrazentrifugiert (Ultrazentrifuge L8-70 Fa. Beckman; Rotor: SW41). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgossen und das zurückbleibende Viruspellet wurde nach Zugabe von 300µl kaltem PBS über Nacht bei 4°C resuspendiert.

Die weitere Reinigung des nun in ca. 300µl gelösten, markierten Virus von nichtgebundener Restradioaktivität erfolgte über Flotation in einem Optiprep-Gradienten durch Ultrazentrifugation bei 4°C für 6h und mit 165051xg (Ultrazentrifuge:L8-70 Fa. Beckman; Rotor: SW60). 600µl Virus in 30% Optiprep/PBS wurden mit 600µl 25% und jeweils 500µl von 20%, 15%, 10%, 5% Optiprep-Fraktionen überschichtet.

Nach der Zentrifugation war ein deutliches Bandenmuster zu erkennen. Es wurden 20 Fraktionen à 200µl mit der Pipette von oben abgenommen. Von diesen 20 Fraktionen wurden jeweils 5µl mit 5ml des gebrauchsfertigen Szintillationscocktails gut gemischt und im LSC-Gerät wurden die cpm-Werte für jede Fraktion gemessen. Anhand der Messergebnisse

wurden die Fraktionen mit den höchsten cpm-Werten (Fraktionen 13 und 14) gepoolt und im Bindungsassay eingesetzt.

2.2.2.2 Bindungsassay

Zellen: SK6 Tet on
Antikörper: anti-CD46-Serum (1:300)
Lösungen: Präimmunserum (1:300), PBS defiz., Pferdeserum, PBS
Substanz: Doxycyclin, Fa. ICN
Rotiszint eco plus, Fa. Roth
Gerät: Liquid scintillation counter (LSC) 1209 Rackbeta, Fa. Wallac

Für den Bindungsassay wurden die zu testenden SK6 Tet on Zelllinien auf 24 well-Gewebekulturschalen so ausgesät (1:7), dass sich nach 24h bei 37°C ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte. Jede Zelllinie wurde nicht induziert, induziert und induziert mit Präinkubation von anti-CD46-Serum (1:300) und Präimmunserum (Normalserum 1:300) im Dreifachansatz getestet. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin zum Medium der Zellen für mindestens 18h. Präinkubiert wurden die Zelllinien nach Absaugen des Mediums für 1h bei 4°C. Nach erfolgter Präinkubation wurden pro „well“ einer 24 well-Gewebekulturschale 6000cpm der virushaltigen Optiprep-Fraktionen für die Feststellung der Bindung eingesetzt. Die virushaltigen Optiprep-Fraktionen wurden mit PBS defiz. (mit Zugabe von 2% Pferdeserum) auf 200µl/well der Gewebekulturschale verdünnt und für 1h bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Virus von jedem „well“ einzeln abgenommen und in separaten Messröhrchen (Fa. Roth) gesammelt. Die folgenden zwei Waschschriffe mit 200µl/well kaltem PBS wurden in denselben Röhrchen gesammelt. Im nächsten Schritt folgte die Zellyse (siehe 2.2.3.1). Das Zellysat und ein sich anschließender Waschschriff mit 200µl/well kaltem PBS wurden in neuen Messröhrchen gesammelt. Vor der Messung der cpm-Werte im LSC-Gerät wurden 5ml pro Röhrchen gebrauchsfertiger Szintillationscocktail (rotiszint eco plus, Fa. Roth) hinzugegeben und die Röhrchen gut geschüttelt. Anschließend wurde für jedes einzelne „well“ der Gewebekulturschale der gebundene Anteil in Prozent ausgerechnet. Hierfür wurden die gemessenen cpm-Werte der beiden Röhrchen addiert und anschließend der prozentuale Anteil des Röhrchens mit dem Zellysat von der Gesamtradioaktivität ermittelt. Als letztes wurde der Mittelwert aus den drei Ergebnissen jeder Zelllinie errechnet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Zellyse

Lysepuffer: 1% Triton X-100 (w/v) in 50mM Tris/HCL pH 8,0
 Geräte: Tischzentrifuge: 5415C, Fa. Eppendorf
 Lösungen: PBS

Alle Schritte der Zellyse fanden bei 0°C statt. Die Zellen wurden mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysepuffer für 10min inkubiert. Während die Zellwände aufgebrochen werden, bleiben die Zellkerne intakt und haften am Boden der Kulturschale, so dass das Lysat nicht durch Nukleinsäuren kontaminiert wird. Vor der weiteren Verwendung der Lysate wurden diese durch Zentrifugation (10000xg, 5min) geklärt.

2.2.3.2 SDS-PAGE mit Tris-Tricin-Puffer

Lösungen für das Gelsystem:

Probenpuffer:	6M	Harnstoff
	62,5mM	Tris-HCL pH 6,8
	2%	SDS
	10%	Glycerol (v/v)
	5%	β-Mercaptoethanol (v/v), nur für reduzierende Bedingungen
	0,025%	Bromphenolblau (w/v)
	0,025%	Phenolrot (w/v)

Molekulargewichtsstandard: prestained marker protein, Fa. GIBCO

Acrylamidlösung (30:1): 40% Acrylamid (w/v)

Glycerin: 87% (v/v) (Stammlösung)

TEMED: >99% (v/v) (Stammlösung)

3x Gelpuffer: 0,3M Tris-HCl pH 8,45
0,3% SDS

10x Anodenpuffer: 0,2M Tris-HCl pH 8,9

10x Kathodenpuffer: 0,1M Tris-HCl pH 8,25
0,1M Tricin
1% SDS (w/v)

Ammoniumpersulfat: 10mg/ml in H₂O bidest. (Stammlösung), jeweils frisch angesetzt

Geräte: Proteingelektrophoresekammern:
Miniprotean II, Fa. Biorad; Eigenbau JLU Gießen

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in der Regel im Western Blot Processor nach folgendem Programm inkubiert:

- | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|
| 1. | = Blockierung: 60min | |
| 2. | 10,0min | } Waschen |
| 3. | 6,5min | |
| 4. | 5,0min | |
| 5. | = 1. Antikörper: 60min | |
| 6. | 10,0min | } Waschen |
| 7. | 5,0min | |
| 8. | 5,0min | |
| 9. | = 2. Antikörper: 60min | |
| 10. | 7,0min | } Waschen |
| 11. | 5,0min | |
| 12. | 5,0min | |

Die ca. 6x8cm große Membran wurde anschließend mit 0,5ml Oxidizing Reagent und 0,5ml Enhanced luminol Reagent des Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NENTM) für ca. 1min inkubiert. Schließlich erfolgte eine Autoluminographie für ca. 10s, 60s und 5min.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium: 10g/l Trypton
 5g/l Hefeextrakt
 10g/l NaCl
 mit 1N NaOH auf pH 7,5 einstellen

Substanzen: Agar-Agar, Fa. DIFCO; Ampicillin, Fa. Fluka
 Geräte: Schüttler (185rpm / 37°C), Fa. Infors

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5%iger Agar zugesetzt. Alle Medien wurden autoklaviert. Durch den Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum Medium konnte eine Selektion von plasmidhaltigen Bakterien mit entsprechenden AB-Resistenzgenen erreicht werden. Die Bakterien wurden über Nacht auf einem Schüttler bei 185rpm/37°C in LB-Medium kultiviert. Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte der Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum Kulturmedium.

2.2.4.2 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden je nach Verwendungszweck Mini- (bis 10 μ g DNA) oder Midipräparationen (bis 100 μ g DNA) durchgeführt.

Minipräparation (Macherey & Nagel)

Lösung P1: 50mM Tris-HCL, pH 8,0
 10mM EDTA

Lösung P1/RNase: Lösung P1
 0,1mg/ml RNase A

Lösung P2: 0,2M NaOH
 1% SDS

Lösung P3: 2,55M Kalium-Acetat, pH 5,5

Geräte: Tischzentrifuge: 5415C, Fa.Eppendorf

Die Präparation kleinerer DNA-Mengen (bis 10 μ g) wurde durch Alkalische Lyse (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Eine 5ml Bakterienkultur wurde über Nacht inkubiert. 1,5ml der Kultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit ca. 10000xg 5min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Sediment in 250 μ l der Lösung P1/RNase resuspendiert. Dann wurden 250 μ l der Lösung P2 hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 250 μ l der Lösung P3 zugegeben, die Suspension wurde gemischt und nach 10min Zentrifugation bei 10000xg wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit 400 μ l Isopropanol-präzipitiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde in 40 μ l H₂O bidest. resuspendiert.

Midipräparation (Macherey & Nagel)

Lösungen P1-P3 wie für Minipräparation beschrieben

Puffer N2: 100mM Tris
 900mM KCl
 15% Ethanol
 mit H₃PO₄ auf pH 6,3 einstellen

Puffer N3: 100mM Tris
 1150mM KCl
 15% Ethanol
 mit H₃PO₄ auf pH 6,3 einstellen

Puffer N5: 100mM Tris
 1000mM KCl
 15% Ethanol
 mit H₃PO₄ auf pH 8,5 einstellen

Säulen: Nukleobond AX 100, Fa. Macherey & Nagel
 Geräte: Kühlzentrifuge Laborfuge 400R, Fa. Heraeus

Zur Präparation größerer DNA-Mengen (bis 100 μ g) aus 50ml Übernachtskulturen wurden Nukleobond AX 100-Säulen verwendet. Die Bakterien wurden für 10min bei 3939xg pelletiert und anschließend in 4ml der Lösung P1/RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 4ml der Lösung P2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 4ml der Lösung P3 hinzugegeben und der Ansatz erneut vorsichtig durch Invertieren gemischt. Während der folgenden 15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kam es zur Präzipitation der bakteriellen Proteine sowie der chromosomalen DNA. In der Zwischenzeit wurde eine Nukleobond AX 100-Säule mit 3ml der Lösung N2 äquilibriert. Das präzipitierte Material wurde durch Filtration entfernt und die klare, plasmidhaltige Phase auf die äquilibrierte Säule gegeben. Hiernach wurde die Säule zweimal mit jeweils 10ml der Lösung N3 gewaschen und die an die Säule gebundene Plasmid-DNA durch Zugabe von 3ml der Lösung N5 eluiert. Jeweils 1ml Eluat wurden mit 700 μ l Isopropanol-präzipitiert und die pelletierte DNA anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde in 100 μ l H₂O bidest. resuspendiert.

2.2.4.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Bakterien: *E.coli* K12-Stamm HB101

Medien:

TFB I: 30mM KOAc
 100mM RbCl
 10mM CaCl₂
 50mM MnCl₂
 15% Glycerol
 mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und steril filtrieren

TFB II: 10mM MOPS
 75mM CaCl₂
 10mM RbCl
 15% Glycerol
 mit KOH auf pH 6,5 einstellen und steril filtrieren

LB-Medium

Geräte: Kühlzentrifuge Laborfuge 400R, Fa. Heraeus
 Schüttler (185rpm / 37°C), Fa. Infors
 Photometer MP-plus 25, Fa. MAGV GmbH
 Heizblock, Fa. Eppendorf

Um *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA effektiv zu transformieren, müssen sie zuerst kompetent gemacht werden. Dazu wurden 250ml LB-Medium mit 1:100 einer Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 185rpm/37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht war. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (5min bei 3939xg, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 100ml eisgekühltem TFB I-Medium aufgenommen, resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (5min bei 3939xg, 4°C), das Pellet in 10ml eiskaltem TFB II resuspendiert, für 1h auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und bei -70°C eingefroren und gelagert.

Zur Transformation wurden pro Ansatz 50µl der kompetenten Bakterien mit etwa 50ng Plasmid-DNA oder 10-15µl Ligationsansatz für 1h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1min bei 37°C wurden die Transformationsansätze mit LB-Medium auf 0,5ml aufgefüllt, 30min unter Schütteln bei 37°C inkubiert und schließlich auf LB-Agarplatten (LB/Amp) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für 12h bis 18h inkubiert; einzelne Kolonien wurden zum Animpfen von Kulturen für Mini- oder Midipräparationen (siehe 2.2.4.2) verwendet.

2.2.4.4 Phenol/Chloroform Extraktion von DNA

Lösung: Phenol/Chloroform (1:1), Fa. Appligene/Fa. Fluka
Geräte: Tischzentrifuge Biofuge Pico, Fa. Heraeus

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion dient zur weitgehenden Entfernung von kontaminierenden Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Phenol/Chloroform-Lösung wurde im Volumenverhältnis von 1:1 zur Nukleinsäurelösung gegeben, der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend zur Verbesserung der Phasentrennung für ca. 5min in einer Zentrifuge bei 10000xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die Nukleinsäuren und konnte vorsichtig in ein zweites Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend wurde sie mit Ethanol/Na-Acetat präzipitiert (Ethanolpräzipitation 2.2.4.5).

2.2.4.7 DNA- bzw. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

6x DNA bzw. RNA-Auftragspuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau
30,00% (v/v) Glycerin

50x TAE-Puffer: 242g Tris
57,1ml Eisessig
100,0ml 1,5M EDTA (pH 8,0)
mit H₂O bidest. auf 1l auffüllen

Ethidiumbromid-Lösung: 10mg/ml

DNA-Längenstandard: 1kb-Leiter, Fa. GIBCO

Geräte: Gelelektrophoresekammern, Eigenbau, JLU Gießen
UV-Transilluminator, Fa. Bachofer

Die Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten für analytische und präparative Zwecke erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in 0,8-2%igen Agarosegelen (w/v) bei konstanter Spannung (Feldstärke 4-8V/cm). Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer, der mit 250µg/l Ethidiumbromid (EtBr) versetzt war. Das im Puffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose mit einem entsprechenden Volumen 1x TAE/EtBr versetzt, durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in die „Schlitten“ der Elektrophoresekammern gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer/EtBr aufgefüllt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit etwa 1/10 Volumen DNA bzw. RNA-Auftragspuffer gemischt. Als Längenstandard diente die 1kb-Leiter. Nach dem Lauf wurden die DNA- bzw. RNA-Fragmente des Gels unter UV-Licht an einem Transilluminator analysiert, photographisch dokumentiert oder die entsprechenden DNA-Banden für eine Aufreinigung aus der Agarose ausgeschnitten.

2.2.4.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

vorgefertigtes System (Kit): Ultrafree[®]-DA, Fa. Millipore
Geräte: Tischzentrifuge 5415C, Fa. Eppendorf

Die Aufreinigung der DNA aus Agarose erfolgte mit Hilfe eines Kits (Ultrafree[®]-DA). Dieses Kit ist geeignet, um DNA, die 100-10000 Basenpaare umfasst, aus Agarosegelen für Klonierungszwecke oder für die Sequenzierung zu extrahieren. Zur Aufreinigung wird das

DNA-haltige Agarosegelstück ausgeschnitten und in eine Säule („Gel Nebulizer“) überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 5000xg, bei der feste Gelbestandteile zurückbehalten werden, befindet sich die extrahierte DNA im Agarosegelpuffer-haltigen Filtrat und kann direkt weiter verwendet werden.

2.2.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Enzyme: T4-DNA-Ligase, Fa. MBI-Fermentas
Restriktionsendonukleasen, Fa. New England BioLabs; Fa. Takara
Alkalische Phosphatase (CIAP), Fa. Boehringer Mannheim
T4-Polynukleotidkinase, Fa. New England BioLabs

Substanz: ATP (100mM)

Die Ligation von DNA-Fragmenten, z. B. Einfügen von DNA-Fragmenten in Vektorplasmide, erfolgte mit T4-DNA-Ligase. T4-DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3' OH mit der 5' PO₄-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNA durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch. Um ligierbare Enden zu erhalten, mussten zuvor beide Ligationspartner mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gleicher Spaltspezifität behandelt werden. Damit eine intramolekulare Religation eines linearisierten Vektorplasmids verhindert wurde, musste der Vektor zusätzlich durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert werden. Der andere Ligationspartner muss entsprechend phosphorylierte Enden aufweisen, damit die Ligation erfolgen kann. Eine Phosphorylierung kann durch T4-Polynukleotidkinase mit ATP als Phosphatgruppendonor katalysiert werden. Ligationen wurden in einem Volumen von 20-35µl in 1x Ligationspuffer und mit 1U T4-DNA-Ligase angesetzt. Die Menge der Ligationspartner wurde über den Vergleich der Bandenintensitäten auf einem Agarosegel bestimmt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert betrug in etwa 1:3. Die Ligation fand bei RT statt.

2.2.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Enzyme: *Taq*-DNA-Polymerase, Fa. New England BioLabs
Pfu-DNA-Polymerase, Fa. Stratagene

Geräte: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Fa. Perkin Elmer
PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen selektiven Amplifikation von DNA, wobei selbst sehr geringe DNA-Mengen stark vervielfältigt werden

können. Das Prinzip beruht auf der Bindung zweier Oligonukleotide, die zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNA komplementär sind, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen. Das als Plusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNA, während das als Minusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen lagern sich beide Oligonukleotide bei Absenken der Reaktionstemperatur an die DNA an („Annealing“). Im nächsten Schritt dienen sie der hitzebeständigen z. B. *Taq*-DNA-Polymerase als Start für die DNA-Synthese (Elongation).

Durchführung:

Ein PCR-Standardansatz von 100µl wies folgende Zusammensetzung auf (ca. 100ng „Template“):

PCR-Puffer (10x)	10,0µl
dNTPs [10mM]	2,5µl
Plusstrang-primer [100pmol/µl]	0,5µl
Minusstrang-primer [100pmol/µl]	0,5µl
DNA-„Template“ [50ng/µl]	1,0-2,0µl
DNA-Polymerase [2,5U/µl]	1,0µl
H ₂ O bidest.	ad 100,0µl

Die Inkubation der Ansätze erfolgt in einer PCR-Maschine, wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah (Standardbeispiel):

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	5min	95°C
Denaturierung	25-30x	30s	95°C
„Annealing“		30s	50-55°C (variabel)
Elongation		1min/kb	72°C
Elongation	1x	7min	72°C

Nachdem die Erfolgskontrolle durch das Auftrennen von 1µl Reaktionsansatz im DNA-Agarosegel (siehe 2.2.4.7) durchgeführt worden war, wurden die PCR-Fragmente der Hälfte des Ansatzes (50µl) mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.2.4.5) und anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten. Für die Ligation in einen Plasmidvektor wurde der Plasmidvektor ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe 2.2.4.9)

2.2.4.11 Klonierung von PCR-Produkten

Enzyme: T4-DNA-Polymerase, Fa. Takara
T4-Polynukleotidkinase, Fa. New Englands BioLabs

Substanzen: dNTP's (10mM), ATP (100mM)

Um PCR-Produkte in einen linearisierten Vektor mit glatten Enden klonieren zu können, muss der 3'Überhang des PCR-Produktes durch die Herstellung glatter Enden entfernt werden. Dieser Schritt erfolgt mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase. Dieses Enzym katalysiert eine 5'-3'-DNA-Synthese und besitzt zusätzlich eine 3'-5' („Proofreading“)-Exonuklease-Aktivität. 3'Überhänge konnten daher mit diesem Enzym abgebaut werden. Gleichzeitig wurde eine Phosphorylierung der 5'-Enden des PCR-Produktes mit T4-Polynukleotidkinase durchgeführt. Dies war notwendig, um eine erfolgreiche Ligation in einen Vektor, dessen 5'-Enden zur Verhinderung einer Selbstligation dephosphoryliert waren, zu ermöglichen. Hierzu wurden der PCR-Reaktion (50µl) nach Beendigung der Amplifikation 2µl dNTP's (10mM), 1µl ATP (100mM), 1U T4-DNA-Polymerase und 5U T4-Polynukleotidkinase zugegeben und der Ansatz für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung der PCR-Produkte über eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.4.12 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“

Substanzen: „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ Kit, Fa. Stratagene

Geräte: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Fa. Perkin Elmer
PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf

Enzyme: *Pfu* DNA-Polymerase, Fa. Stratagene
DpNI, Fa. Stratagene

Die Erzeugung einzelner Basenaustausche erfolgte weitgehend nach den Herstellerangaben des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ Kits. Bei dieser Methode dient ein doppelsträngiges Plasmid, in das die Mutation eingefügt werden soll, als Matrize. Für den gezielten Austausch bestimmter Basen in der Matrize wurden Oligonukleotide benötigt, welche die gewünschten Basenaustausche in ihrer Sequenz tragen und jeweils an den „sense“ und den „antisense“ Strang der DNA-Matrize binden. Mit Hilfe einer PCR-Maschine wird die Plasmid-DNA denaturiert; die Bindung der Oligonukleotide an die DNA und eine anschließende Primerextension wird durch das Enzym „*Pfu* DNA-Polymerase“ (besitzt eine „proofreading“ Aktivität) durchgeführt. Nach 12-16 Elongationsschritten, bei denen im

Unterschied zur PCR lediglich die Ausgangs-DNA als Matrize diente, wurde die methylierte Ausgangs-DNA durch *Dpn* I abgebaut, während die mutierte, neu synthetisierte nicht methylierte DNA erhalten blieb. Die neu synthetisierte DNA ist wie die Ausgangs-DNA doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche („nicks“) auf. Erst nach Transformation werden diese durch die Bakterien aufgefüllt.

Ein „QuikChangeTM“-Standardansatz von 50µl wies folgende Zusammensetzung auf (ca. 50ng „Template“):

<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	5,0µl
dNTPs [10 mM]	1,0µl
Sense-Oligonukleotide [100 pmol/µl]	0,5µl
Antisense-Oligonukleotid [100 pmol/µl]	0,5µl
DNS-„Template“ [50 ng/µl]	1,0µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase [1,25 U/µl]	1,0µl
H ₂ O bidest.	ad 50,0µl

Die Inkubation der Ansätze erfolgt in einem DNA-Thermal-Cycler 2400, Fa. Perkin Elmer oder in einem Mastercycler Gradient der Fa. Eppendorf, wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	2min	94°C
Denaturierung	12-20x	30s	94°C
„Annealing“		1-1,5min	53-60°C (variabel)
Elongation		2min/kb	68 °C

Im Anschluss an die Mutagenese-Reaktion wurde die Ausgangs-DNA durch Zugabe von 5U *Dpn* I und Inkubation für 1h bei 37°C abgebaut. Für die anschließende Transformation der mutierten DNA in Bakterien wurde 1µl des *Dpn* I-verdauten Reaktionsansatzes und ein 50µl-Aliquot kompetenter *E. coli* verwendet (siehe 2.2.4.3).

2.2.4.13 *in vitro* Transkription

Enzyme: Sp6 RNA Polymerase, Fa. Takara

Für die *in vitro* Transkription mit Sp6 RNA-Polymerase wurden 2µg Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau linearisiert, anschließend über eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.4.4) gereinigt und mit Ethanol gefällt (siehe 2.2.4.5).

Nachdem das getrocknete DNA-Pellet in 10-15 μ l H₂O bidest. aufgenommen worden war, setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

Sp6 Pol.-Puffer (10x)	1 μ l
DTT [0,1M]	1 μ l
DNA-„Template“ [1 μ g/ μ l]	1 μ l
human ribonuclease inhibitor [40U/ μ l]	1 μ l
rNTPs [10mM]	1 μ l
H ₂ O bidest.	4 μ l
<u>Sp6 RNA-Pol. [50U/μl]</u>	<u>1μl</u>
Gesamtvolumen	10 μ l

Die Transkription erfolgte für 1-2h bei 37°C. Anschließend wurde die Qualität der *in vitro* Transkripte über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert, bevor die transkribierte RNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.4.4) gereinigt und mit Ethanol gefällt wurde (siehe 2.2.4.5).

2.2.4.14 Sequenzierung von DNA mittels „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer

Substanzen: „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTPTM“, Fa. Amersham

Geräte: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Fa. Perkin Elmer
PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf

Für die Technik des „Cycle Sequencing“ wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTPTM“ verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wurde als PCR durchgeführt; da allerdings nur ein Oligonukleotid eingesetzt wurde, erfolgte keine exponentielle, sondern nur eine lineare Amplifikation der DNA-Fragmente. Während der sich anschließenden Elektrophorese von unterschiedlich großen DNA-Molekülen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff, mit welchem das Oligonukleotid markiert war, mittels Laser angeregt und detektiert.

Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus Mini- oder Midipräparationen verwendet. Für eine Sequenzierungsreaktion wurde eine DNA-Menge von 200ng/kb Plasmidgröße und 2pMol eines Fluoreszenzfarbstoff (IR 800)-markierten Oligonukleotids (siehe 2.2.5.1) eingesetzt. Dieser Ansatz wurde mit H₂O bidest. auf 25 μ l aufgefüllt und anschließend auf vier PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Pro Reaktion wurden jeweils 2 μ l der verschiedenen Didesoxynukleotidgemische des Kits dazugegeben.

Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	2min	95°C
Denaturierung	30x	15s	95°C
„Annealing“		30s	50°C
Elongation		30s	70°C
Elongation	1x	5min	70°C

Nachdem die PCR-Reaktion abgeschlossen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 2µl Stop-Puffer beendet und auf 4°C gekühlt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Reaktionen zur Denaturierung für 2min auf 72°C erhitzt. Von den Reaktionsansätzen wurde jeweils 1µl auf das Sequenzgel aufgetragen.

2.2.4.15 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Automatische Sequenzierung mit dem LI-COR 4000 L Sequenziergerät:

Elektrophoresepuffer:

10x „Long-Run“-Puffer:	162,0g	Tris
	27,5g	Borsäure
	9,3g	EDTA-Na ₂
	mit H ₂ O bidest. auf 1l auffüllen	

„langes Gel“ (4%, 66cm):	32,0ml	Sequagel XR
	8,0ml	Sequagel-Puffer
	2,0ml	„Long Run“-Puffer
	15,0ml	H ₂ O bidest.
	8,0g	Harnstoff
	400,0µl	10%iges APS
	20,0µl	TEMED

„kurzes Gel“ (6%, 40cm):	30,0ml	Sequagel XR
	7,5ml	Sequagel-Puffer
	300,0µl	10%iges APS
	400,0µl	DMSO

Geräte: Sequenzgelelektrophoreseapparaturen, Fa. LI-COR
Sequenziergerät LI-COR 4000 L, Fa. LI-COR

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf 0,2mm dicken Polyacrylamidgelen. Lange Gele (66cm) wurden für das Lesen von bis zu 1000 Basen verwendet; kurze Gele (40cm) für die Auftrennung von bis zu 600 Basen.

Die für die automatische Sequenzierung verwendeten Polyacrylamidlösungen wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Gelsystems angesetzt. Unmittelbar vor dem Gießen wurden TEMED und 10%iges Ammoniumpersulfat zu den Polyacrylamidlösungen gegeben. Zur Herstellung der Gele wurden „Spacer“ (Ø 0,2mm) zwischen die Glasplatten gelegt, die Platten in dafür vorgesehene Schienen eingespannt und auf eine entsprechende Apparatur gelegt, die ein horizontales Gießen des Gels ermöglichte. Die Polymerisation erfolgte für mindestens 1h, anschließend wurde das Gel in das Sequenziergerät eingespannt und ein Vorlauf unter folgenden Bedingungen gestartet:

lange Gele (4%, 66cm)	kurze Gele (6%, 40cm)
2000V	1500V
37mA	37mA
45°C	50°C
50W	50W

Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurden diese für 2min bei 72°C denaturiert. Der Gellauf wurde bei langen Gelen über 12h, bei kurzen Gelen über 5-6h unter den gleichen Bedingungen wie für den Vorlauf durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffmarkierten DNA-Banden erfolgte mittels eines Lasers während des Laufs. Die als Bild oder Buchstabensequenz verfügbaren Daten wurden anschließend mit Hilfe eines Computerprogramms (DNA Strider) ausgewertet.

2.2.5 Klonierungen

Alle folgenden Konstrukte wurden mit der in 2.2.4.15 beschriebenen automatischen Sequenzierung überprüft.

2.2.5.1 Synthetische Oligonukleotide

Oligo	Nukleotidsequenz	Länge, Restriktions- schnittstelle	+/-
SCR1b-	GGCATCGGAGGACGTGGGC	19nt	-
SCR1b+	TGTCCTACCCTAGCTGATCC	20nt	+
SCR2b-	CCGACATTTTTTACAGCCCTCC	22nt	-
SCR2b+	TGTCAACCGCCTCCAGAAATT	21nt	+
SCR3b-	CAAATCTTTTCACTGTTGG	20nt	-
SCR3b+	TGTGTATATCCAGCCCATTG	20nt	+
SCR4b-	TTTGACCACTTTACTGAGG	21nt	-
SCR4b+	ATTAAAGGACATCCCCCCCG	20nt	+
SCR1p+	TGTGATGAGCCACCGAAGTTT	21nt	+

SCR1p-	GGCTTTTCGTCGACAAGCCTC	21nt	-
SCR2p+	TGTTCGAATCTACCAGACCCG	21nt	+
SCR2p-	CAAAATCTTCTCACATAGCGGG	22nt	-
SCR3p+	TGTAAACCACCTGGCGAAATT	21nt	+
SCR3p-	TTTGACCACTTTACACTCAGGG	22nt	-
SCR4p+	TGTCCATATCCAGTAGTCCCA	21nt	+
SCR4p-	ACATTGGGGCATCTCAGGCTC	21nt	-
oAH5	ACATTCATACTCTACACGGTC	21nt	-
oAH6	CATCTGGGTTTCCAGCCACTAAC	22nt	+
oAH7	CGCCCCGGGTTCAGCCCATG	21nt	+
oAH8	ACATTCATACACAATCTGCTC	21nt	-
oAH9	TGTGATGATCCACCAAGATTTG	22nt	+
oAH10	GGCATCTGAGGGCATGGGAAG	21nt	-
oAH11	GTACATTA ACTTCCATCTTCGCAGACGGCCTTAACG GTTT	41nt	-
oAH12	CTCCAGCGCTCGACGAGAGAAACCAGGTATCTAGCAT CATTGCA	44nt; <i>Eco47 III</i>	+
oAH13	TCTTGCTTTCGCCCCGTCAAATAGGAGCTCA	29nt	-
oAH14	GGATGTAGTCGAGATGGATGATGACTTC	28nt	+
oAH15	ATTGAATGACGTACACTCTACGACACCAGTC	31nt	-
oAH16	ATGGACACCTTAGCAACAGAAAGTGGTGAAAACC	33nt	+
oAH17	GGTGATACAGCCTTGTCTATGTGGAAAAGGCTTATC	36nt	-
oAH18	CAAAAGAATCTGGGAGAAGACCTATTCCATTGCAAG	36nt	+
oAH19	GTATGAATGTCGCCCCGGTTTCCAGCC	27nt	+
oAH20	GGCTGGAAACCGGGGCGACATTCATAC	27nt	-
oAH21	GTTTCCAGCCAATGGTTCCTGGTCAAG	27nt	+
oAH22	CTTGACCAGGAACCATGGCTGGAAAC	27nt	-
oAH23	CAGTAACTCCTGCGCTTCCCCTGGCTCTCG	30nt	+
oAH24	CGAGAGCCAGGGGAAGCGCAGGAGTTACTG	30nt	-
oAH25	CTGCGCTTCCCACCTTTTCCGTTTGTGTCAGG	30nt	+
oAH26	CCTGACAAACGGAAAAGGGTGGGAAGCGCAG	30nt	-
oAH27	GTTTGTGTCAGGATGATAATACATGGTC	26nt	+
oAH28	GACCATGTATTATCATCCTGACAAAC	26nt	-
oAH29	AATACATGGTCGCCCCTCCAGGAGGG	26nt	+
oAH30	CCCTCCTGGAGGGGCGACCATGTATT	26nt	-
oAH33	CATGGTTCCTGGGCAAGTCACCTTTTCCG	29nt	+
oAH34	CGGAAAAGGTGACTTGCCCAGGAACCATG	29nt	-
oAH35	CTGGGCAAGTCTCGCTCTCGTCTGTGTCAGG	30nt	+
oAH36	CCTGACAGACGAGAGCGAGGACTTGCCCAG	30nt	-
AS1-	GGTAGTGGTGAGACCTTCAGC	21nt	-
AS2+	TGGAAAGAATACAGCCACGGT	21nt	+
AS3-	GTTTAACAAAGTGGTGTGTGAC	21nt	-
AS4+	GGCAGTGCTTTCTATCTAGTC	21nt	+
AS5-	CCCCAACTTGCAATGGAATAG	21nt	-
AS6+	GGTAATTGGACATGTGTAAAAG	22nt	+

AS7+	AAGAATTCACCATGAAAGCATCGAGAGGACAGG	33nt; <i>EcoR</i> I	+
AS2,1-	CCTCCTACTAACCACGTTAAG	21nt	-
AS6,1+	GGCAAGTGCATCCTAACAAATG	22nt	+
AS6,2+	CCTATGCCGTGCAGACCCCAAAG	23nt	+
AS2,2-	GGCCTTAACGGTTCGTCGTC	21nt	-
AS6,3+	TCTTGTACATTCAACTACACA	21nt	+
AS6,4+	AGTACTTCCAGCAATATATG	21nt	+
AB1-	AGTGGTGGTAAGGCCTTCAGC	21nt	-
AB2+	TGGAAGGAATACTCACCTGGA	21nt	+
AB3-	GTTCAGCAGCGTTGTATTGAA	21nt	-
AB4+	GGACCGGCCTTCCAGATGGTA	21nt	+
AB5-	TCCAAGGATGCAGTTATGGAG	21nt	-
AB6+	GGAAATTGGACTTGTGTGCCT	21nt	+
AB7+	AAAAGCTTACCATGAAGATAGTCAGGGGCCAG	32nt	+
AB2,1+	TATCTCGCAATCTTGCATACA	21nt	+
AB6,1-	AATGGGGTAGTGTGGTAGTCC	21nt	-
AB6,2-	TCCGAGTTTGGTATCCATAGC	21nt	-
AB2,2+	TGGTGCGAAGATGGGAAGTTAATG	24nt	+
AB6,3-	TGTCTTTTCTACAGGCCCTC	21nt	-
AB6,4-	GTCTCTGGGCTCAAATACTT	21nt	-
IFF17	GGGGCACAAGGCCGGCTAGCCTGT	24nt	+
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	18nt	-

Fluoreszenzfarbstoff (IR 800)-markierte Oligonukleotide für die Sequenzierung:

pTRE320	GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCC	23nt	+
pTRErev	TCACTGCATTCTAGTTGTGG	20nt	-
SP6	GTATACGAGGTTAGCTCTTTCTCGTATA	28nt	-
T7	TAATACGACTCACTATAG	18nt	-
CSF4	GAGGGATTTGACTAGGGTCTGG	22nt	+

2.2.5.2 Klonierung der Deletionsmutanten von CD46_{bov}

Plasmide: pKM6 (pcDNA3 mit bovinem CD46), Maurer, Diss. 2002
pcDNA3, Fa. Invitrogen
pTRE, Fa. CLONTECH

CD46_{M1}: Mit dem Plusstrang-Primer SCR1b+ und mit dem Minusstrang-Primer SCR1b- wurde aus dem „Template“ pKM6 ein PCR-Produkt mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Hierbei wurden die aa43-106 (CCP1) von CD46_{bov} deletiert. Dieses PCR-Produkt wurde mit 5U T4-Polynukleotidkinase, 5µl ATP (10mM) und 1µl *Dpn* I 1h bei 37°C inkubiert. Mit der Zugabe von T4-Polynukleotidkinase und ATP erfolgte eine Phosphorylierung der 5'Enden des PCR-Produktes. Das Enzym *Dpn* I verdaut die methylierte Ausgangs-DNA.

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung des DNA-Fragments (siehe 2.2.3.8) und die Religation (**pCD46_{Δ1}**).

Zur Herstellung einer Zelllinie wurde aus **pCD46_{Δ1}** mit den Restriktionsenzymen *BamH* I / *Bgl* II das deletierte CD46_{bov} in den *BamH* I geschnittenen pTRE ligiert. Hieraus resultierte **CD46_{Δ1}**. Durch einen weiteren „Kontrollverdau“ mit dem Restriktionsenzymen *BamH* I / *EcoR* I und einer dadurch erfolgten Linearisierung der DNA wurde die richtige Orientierung der Deletion von CD46_{bov} im pTRE kontrolliert.

CD46_{Δ2}: Die Klonierung erfolgte entsprechend **CD46_{Δ1}**. Hier wurden der Minusstrang-Primer SCR2b- und der Plusstrang-Primer SCR2b+ eingesetzt. Es wurden die aa107-170 (CCP2) von CD46_{bov} deletiert (**pCD46_{Δ2}**).

pCD46_{Δ2} wurde mit den Restriktionsenzymen *BamH* I / *Bgl* II in den *BamH* I geschnittenen pTRE ligiert. Hieraus resultierte **CD46_{Δ2}**.

pCD46_{Δ3}: Aus dem „Template“ pKM6 wurde entsprechend **CD46_{Δ1}** mit den Primern SCR3b+ / SCR3b- ein PCR-Produkt amplifiziert. Die aa171-236 (CCP3) von CD46_{bov} wurden deletiert.

pCD46_{Δ4}: Hier wurde mit den Primern SCR4b+ / SCR4b- ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Deletion von aa237-292 (CCP4) von CD46_{bov} enthält. Ansonsten erfolgte die Klonierung wie bei **CD46_{Δ1}** beschrieben.

CD46_{Δ1,Δ2}: Die Klonierung erfolgte entsprechend **CD46_{Δ1}**, hier wurde mit den Primern SCR1b- / 2b+ aus pKM6 ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Deletion von aa43-170 (CCP1 und CCP2) von CD46_{bov} enthält. Zur Etablierung einer Zelllinie wurde **pCD46_{Δ1,Δ2}** mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *Bgl* II verdaut und anschließend in den *BamH* I geschnittenen pTRE inseriert. Hieraus resultierte **CD46_{Δ1, Δ2}**.

CD46_{Δ3,Δ4}: Aus pKM6 wurde mit dem Primerpaar SCR3b- / SCR4b+ ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Deletion von aa171-292 (CCP3 und CCP4) von CD46_{bov} umfasst, die weitere Klonierung erfolgte entsprechend **CD46_{Δ1}**. Über den Restriktionsverdau *BamH* I / *Bgl* II wurde **pCD46_{Δ3,Δ4}** in den *BamH* I geschnittenen pTRE inseriert und das Plasmid **CD46_{Δ3, Δ4}** konstruiert.

2.2.5.3 Klonierung der Austauschmutanten von CD46_{bov}

Plasmide: pBlueskript SK II, Fa. Stratagene
pKM6 (pcDNA3 mit bovinem CD46), Maurer, Diss. 2002
pKM1 (pcDNA3 mit porzinem CD46), Rümenapf, nicht publiziert
pcDNA3, Fa. Invitrogen
pTRE, Fa. CLONTECH

pAH29: CD46_{bov} wurde mit den Restriktionsenzymen *BamH I* / *EcoR I* aus dem Plasmid pKM6 in den deutlich kleineren *BamH I* / *EcoR I* geschnittenen pBlueskript SKII kloniert.

CD46_{p1}: Aus dem „Template“ pAH29 wurde mit dem Primerpaar bSCR1b- / bSCR1b+ und der *Pfu*-Polymerase ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Deletion von bovinem CCP1 enthält. Mit den Primern pSCR1+ / pSCR1- wurde mittels *Taq*-Polymerase aus pKM1 porzines CCP1 amplifiziert. An beiden PCR-Produkten wurden glatte Enden hergestellt und anschließend wurden diese miteinander ligiert. Anhand Sequenzierung wurde die richtige Orientierung des Inserts überprüft. Zur Etablierung einer SK6 Tet on Zelllinie wurde **pCD46_{p1}** mit den Restriktionsenzymen *BamH I* / *Bgl II* verdaut und in den *BamH I* geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{p1}**.

CD46_{p2}: Aus pAH29 wurde mit den Primern bSCR2b- / bSCR2b+ ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Deletion von bovinem CCP2 enthält. Mit den Primern pSCR2+ / pSCR2- wurde porzines CCP2 aus pKM1 amplifiziert. Die weitere Klonierung erfolgte entsprechend CD46_{p1}. Als Grundlage für die Herstellung einer SK6 Tet on Zelllinie wurde **pCD46_{p2}** mit den Restriktionsenzymen *BamH I* / *Bgl II* verdaut und in den *BamH I* geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{p2}**.

CD46_{p3}: Diese Klonierung erfolgte entsprechend CD46_{p1}, jedoch wurden hier für die Amplifikation des PCR-Produkts von pAH29 die Primer bSCR3b- / bSCR3b+ verwendet und für das Insert von pKM1 die Primer pSCR3+ / pSCR3- eingesetzt. Zur Etablierung einer SK6 Tet on Zelllinie wurde **pCD46_{p3}** mit den Restriktionsenzymen *BamH I* / *Bgl II* verdaut und in den *BamH I* geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{p3}**.

CD46_{p4}: Aus pAH29 wurde mit den Primern bSCR4b- / bSCR4b+ ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Deletion von bovinem CCP4 enthält. Mit den Primern pSCR4+ / pSCR4- wurde porzines CCP4 aus pKM1 amplifiziert. Die weitere Klonierung erfolgte

entsprechend CD46_{p1}. Als Grundlage für die Herstellung einer SK6 Tet on Zelllinie wurde **pCD46_{p4}** mit den Restriktionsenzymen *BamH* I / *Bgl* II verdaut und in den *BamH* I geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{p4}**.

CD46_{p1,p2}: Diese Klonierung erfolgte entsprechend CD46_{p1}, jedoch wurden hier für die Amplifikation des PCR-Produkts von pAH29 die Primer bSCR1b- / bSCR2b+ verwendet und für das Insert von pKM1 die Primer pSCR1+ / pSCR2- eingesetzt. Porzines CCP1 und CCP2 wurde blind end in CD46_{bov} kloniert, dem CCP1 und CCP2 deletiert worden waren. Zur Etablierung einer SK6 Tet on Zelllinie wurde **pCD46_{p1,p2}** mit den Restriktionsenzymen *BamH* I / *Bgl* II verdaut und in den *BamH* I geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{p1,p2}**.

CD46_{p3,p4}: Aus pAH29 wurde mit den Primern bSCR3b- / bSCR4b+ ein PCR-Produkt amplifiziert, das eine Deletion von bovinem CCP3 und CCP4 enthält. Mit den Primern pSCR3+ / pSCR4- wurde porcines CCP3 und CCP4 aus pKM1 amplifiziert. Die weitere Klonierung erfolgte entsprechend CD46_{p1}. Als Grundlage für die Herstellung einer SK6 Tet on Zelllinie wurde **pCD46_{p3,p4}** mit den Restriktionsenzymen *BamH* I / *Bgl* II verdaut und in den *BamH* I geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{p3,p4}**.

2.2.5.4 Klonierung der Austausche in CCP1 von CD46_{bov}

Plasmide: pKM1 (pcDNA3 mit porzinem CD46), Rümenapf, nicht publiziert
pcDNA3, Fa. Invitrogen
pTRE, Fa. CLONTECH

CD46_{1(p/b)}: Aus pAH29 wurde mit dem Primerpaar oAH6 / SCR1b- mit der *Pfu*-Polymerase ein PCR-Produkt amplifiziert. Hierbei wurde die N-terminale Hälfte von bovinem CCP1 deletiert. Mit dem Primerpaar SCR1p+ / oAH5 wurde die N-terminale Hälfte von porzinem CCP1 aus pKM1 mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert. Bei beiden PCR-Produkten wurden glatte Enden hergestellt und sie wurden anschließend miteinander ligiert. Die richtige Orientierung des Inserts wurde über Sequenzierung kontrolliert. Zur Etablierung einer SK6 Tet on Zelllinie wurde **pCD46_{1(p/b)}** mit den Restriktionsenzymen *BamH* I / *Bgl* II verdaut und in den *BamH* I geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{1(p/b)}**.

CD46_{1(b/p)}: Die Klonierung entspricht CD46_{1(p/b)}. Zur Amplifikation der PCR-Produkte wurden die Primerpaare SCR1b+ / oAH8 für pAH29 und SCR1p+ / oAH5 für pKM1

eingesetzt. Über den Restriktionsverdau *BamH I* / *Bgl II* wurde **pCD46_{1(b/p)}** in den *BamH I* geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{1(b/p)}**.

2.2.5.4.1 Klonierung einzelner Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von bovinem CCP1 mittels „Quik ChangeTM Site-Directed Mutagenesis“ (2.2.4.12)

Plasmide: p583 (pTRE mit bovinem CD46), Rümenapf, nicht publiziert
pTRE, Fa. CLONTECH

CD46_{R31P32}: Im Plasmid p583 wurden mit den Primern oAH19 / oAH20 die bovinen Aminosäuren H₃₁L₃₂ in die porzinen Aminosäuren R₃₁P₃₂ geändert. Hierzu wurde die in 2.2.4.12 beschriebene „Quik ChangeTM Site-Directed Mutagenesis“ PCR Methode angewandt.

CD46_{M37V38}: Bei dieser Klonierung wurden mit den Primern oAH21 / oAH22 und der „Quik ChangeTM Site-Directed Mutagenesis“ PCR Methode die Aminosäuren V₃₇T₃₈ in die Aminosäuren M₃₇V₃₈ geändert.

CD46_{A40LPTES45}: Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Mit der „Quik ChangeTM Site-Directed Mutagenesis“ PCR Methode und den Primern oAH23 / oAH24 wurden im p583 die Aminosäuren G₄₀Q₄₁V₄₂ in die Aminosäuren A₄₀L₄₁P₄₂ mutiert. Hieraus resultiert das Plasmid **CD46_{A40L41P42}**. Anschließend wurde mit CD46_{A40L41P42} als „Template“ eine zweite „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH25 / oAH26 durchgeführt. Hierbei wurden die bovinen Aminosäuren L₄₃A₄₄L₄₅ in die porzinen Aminosäuren T₄₃E₄₄S₄₅ verwandelt.

CD46_{D50}: Mit einer „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH 27 / oAH28 wurde im p583 die bovine Aminosäure N₅₀ in die porzine Aminosäure D₅₀ umgewandelt.

CD46_{P55}: Mit dieser Klonierung wurde die bovine Aminosäure S₅₅ in die porzine Aminosäure P₅₅ umgeändert. Hierfür wurde eine „Quik Change“ PCR im p583 mit den Primern oAH29 / oAH30 durchgeführt.

2.2.5.4.2 Klonierung einzelner Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von porzinem CCP1 mittels „Quik ChangeTM Site-Directed Mutagenesis“ (2.2.4.12)

Plasmide: pT5 (pTRE mit porzinem CD46), Krey, nicht publiziert
pTRE, Fa. CLONTECH

CD46_{p1(40GQVLAL45)}: Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Als erstes wurden mit einer „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH33 / oAH34 und CD46_{p1} als „Template“ die porzinen Aminosäuren A₄₀L₄₁P₄₂ in die bovinen Aminosäuren G₄₀Q₄₁V₄₂ umgewandelt und das Plasmid **CD46_{p1(G40Q41V42)}** etabliert. Mit der sich anschließenden zweiten „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH35 / oAH36 und pAH123 als „Template“ wurden die Aminosäuren T₄₃E₄₄S₄₅ in die Aminosäuren L₄₃A₄₄L₄₅ geändert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{p1(40GQVLAL45)}**.

porz.CD46_(40GQVLAL45): Diese Klonierung erfolgte mittels zwei aufeinander folgender „Quik Change“ PCR. Die erste „Quik Change“ PCR mit dem „Template“ pT5 und den Primern oAH33 / oAH34 führte zu einer Änderung der porzinen Aminosäuren A₄₀L₄₁P₄₂ in die bovinen Aminosäuren G₄₀Q₄₁V₄₂ und zur Etablierung von **porz.CD46_(G40Q41V42)**. Mit der sich anschließenden zweiten „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH35 / oAH36 und porz.CD46_(G40Q41V42) als „Template“ wurden die Aminosäuren T₄₃E₄₄S₄₅ in die Aminosäuren L₄₃A₄₄L₄₅ geändert. Hieraus resultierte das Plasmid **porz.CD46_(40GQVLAL45)**.

2.2.5.5 Klonierung von weiteren CCP-Mutanten

Plasmide: pKM1 (pcDNA3 mit porzinem CD46), Rümenapf, nicht publiziert
pTRE, Fa. CLONTECH

CD46_{2,1,3,4}: Bei dieser Klonierung wurde CD46_{Δ2} als „Template“ für eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase und den Primern oAH9 / SCR1b- verwendet. Das Insert wurde mit den Primern bSCR1+ / bSCR3- aus dem pAH29 mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert. Bei beiden PCR-Produkten wurden glatte Enden hergestellt bevor sie miteinander ligiert wurden (siehe 2.2.4.11).

CD46_{+p1}: Aus pAH29 wurde mit den Primern oAH9 / bSCR1- ein PCR-Produkt mit *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Das Insert wurde mit den Primern pSCR1+ / pSCR 1- aus dem pKM1 mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert. Es wurden bei den PCR-Produkten glatte Enden hergestellt, bevor sie miteinander ligiert wurden. Die Orientierung des Inserts wurde anhand Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde über einen *Bam*H I / *Bgl* II Restriktionsverdau das veränderte CD46 in den *Bam*H I geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{+p1}**, das anschließend für die Etablierung einer SK6 Tet on Zelllinie verwendet wurde.

CD46_{1,p1+p2,3,4}: Für die Klonierung dieser CCP-Mutante wurde mit den Primern bSCR2- / bSCR2+ aus pAH29 ein PCR-Produkt amplifiziert. Ein weiteres PCR-Produkt wurde mit den Primern pSCR1+ / pSCR2- aus dem pKM1 amplifiziert. Bei den PCR-Produkten wurden glatte Enden hergestellt und anschließend wurden sie miteinander ligiert. Die Orientierung des Inserts wurde über Sequenzierung kontrolliert und anschließend wurde die CCP-Mutante über einen *BamH I* / *Bgl II* Restriktionsverdau in den *BamH I* geschnittenen pTRE kloniert. Hieraus resultierte das für die Etablierung der SK6 Tet on Zelllinie verwendete Plasmid **CD46_{1,p1+p2,3,4}**.

CD46_{1,2,p1+p2,3,4}: Aus pAH29 wurde mit den Primern bSCR2+ / bSCR3- ein PCR-Produkt amplifiziert. Ein weiteres PCR-Produkt wurde aus dem pKM1 mit den Primern pSCR1+ / pSCR2- amplifiziert. Beide PCR-Produkte wurden nach Herstellung glatter Enden miteinander ligiert und anschließend mittels Sequenzierung überprüft. Schließlich wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *BamH I* / *Bgl II* verdaut und in den *BamH I* geschnittenen pTRE ligiert. Hieraus resultierte das Plasmid **CD46_{1,2,p1+p2,3,4}**.

2.2.5.6 Etablierung von Glykoprotein E2-Konstrukten im pcDNA3 Plasmid

Plasmide: p568 (pcDNA3 mit BVDV NADL E2, Influenza HA tail)	Rümenapf, nicht publiziert
p194 (pcDNA3 mit KSPV E2, Influenza HA tail, EF Promotor)	Rümenapf, nicht publiziert
pcDNA3, Fa. Invitrogen	

pE2_(b1-29/p30-396): Mit dem Plusstrang-Primer AB7+ und dem Minusstrang-Primer AB1- wurde mittels PCR aus dem „Template“ p586 ein Insert amplifiziert, das 5` mit *Hind III* geschnitten wurde. 3` wurde der Überhang des PCR-Produktes durch die Herstellung glatter Enden entfernt (blund end). Mit dem Plusstrang-Primer AS4+ und dem Minusstrang-Primer Sp6 wurde ein zweites Insert aus p194 amplifiziert. Hier wurden 5` glatte Enden hergestellt und 3` wurde es mit *Xba I* geschnitten. In einer “three piece”-Ligation wurden die beiden Inserts *Hind III* / blund end / *Xba I* in einen *Hind III* / *Xba I* geschnittenen pcDNA3 ligiert.

pE2_(b1-122/p123-396): Die Klonierung erfolgte entsprechend pE2_(b1-29/p30-396) jedoch wurde hier mit den Primern AB7+ und AB3- aus dem „Template“ p568 ein Insert amplifiziert, das 5` mit *Hind III* geschnitten wurde und 3` wurden glatte Enden hergestellt. Das zweite Insert wurde mit den Primern AS4+ und Sp6 aus p194 amplifiziert. Zur transienten Expression wurden die

Inserts in einer „three piece“-Ligation *Hind* III / blund end / *Xba* I in den *Hind* III / *Xba* I geschnittenen pcDNA3 inseriert.

pE2_(b1-185/p186-396): Mit den Primern AB7+ und AB5- wurde aus p568 ein Insert amplifiziert, dass 5` mit *Hind* III geschnitten wurde und 3` wurden glatte Enden hergestellt. Ein zweites Insert wurde aus p194 mit den Primern AS6+ und Sp6 amplifiziert. Mittels einer „three piece“-Ligation wurden die beiden Inserts *Hind* III / blund end / *Xba* I in den *Hind* III / *Xba* I geschnittenene pcDNA3 ligiert.

pE2_(p1-29/b30-397): Aus p568 wurde mit den Primern AB2+ und Sp6 ein PCR-Produkt amplifiziert, dem 3` glatte Enden hergestellt wurden und 5` mit *Xba* I geschnitten wurde. Aus p194 wurde ein zweites PCR-Produkt mit den Primern AS7+ und AS5- amplifiziert. Dieses Produkt wurde 5` mit *Eco*R I geschnitten und 3` wurden glatte Enden hergestellt. Die beiden PCR-Produkte wurden mittels einer „three piece“-Ligation *Eco*R I / blund end / *Xba* I in den *Eco*R I / *Xba* I geschnittenen pcDNA3 inseriert.

pE2_(p1-122/b123-397): Aus p568 wurde mit den Primern AB4+ und Sp6 ein PCR-Produkt amplifiziert. Das zweite PCR-Produkt wurde aus p194 mit den Primern AS7+ und AS3- amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden *Eco*R I / blund end / *Xba* I in den *Eco*R I / *Xba* I geschnittenen pcDNA3 ligiert.

pE2_(p1-184/b185-397): Mit den Primern AB6+ / Sp6 wurde aus p568 ein PCR-Produkt und aus p194 mit den Primern AS7+ und AS5 das zweite PCR-Produkt amplifiziert. Beide Produkte wurden mittels einer „three piece“-Ligation *Eco*R I / blund end / *Xba* I in den *Eco*R I / *Xba* I geschnittenen pcDNA3 inseriert.

pE2_(b1-223/p224-396): Mit den Primern AB7+ / AB6,1- wurde aus p568 ein PCR-Produkt und aus p194 mit den Primern AS6,1+ / Sp6 ein weiteres PCR-Produkt amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden *Hind* III / blund end / *Xba* I in den *Eco*R I / *Xba* I geschnittenen pcDNA3 ligiert.

pE2_(b1-274/p275-396): Die Klonierung erfolgte wie bei pE2_(b1-223/p224-396) beschrieben, jedoch wurden hier zur Amplifikation der PCR-Produkte die Primer AB7+ und AB6,2- für das „Template“ p568 und AS6,2+ und Sp6 für p194 eingesetzt.

pE2_(p1-64/b65-397): Aus p568 wurde mit den Primern AB2,1+ und Sp6 und aus p194 wurde mit den Primern AS2,1- und AS7+ zwei PCR-Produkte amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden *EcoR* I / blund end / *Xba* I anhand einer „three piece“ Ligation in den *EcoR* I / *Xba* I geschnittenen pcDNA3 inseriert.

pE2_(b1-293/p294-396): Hier wurde mit den Primern AB7+ / AB6,3- ein PCR-Produkt aus p568 und mit den Primern AS6,3+ / Sp6 das zweite PCR-Produkt aus p194 amplifiziert. Die Ligation erfolgte *Hind* III / blund end / *Xba* I in das *Hind* III / *Xba* I geschnittene pcDNA3 Plasmid.

pE2_(b1-312/p313-396): Diese Klonierung erfolgte entsprechend pE2_(b1-293/p294-396), es wurden zur Amplifikation der PCR-Produkte die Primer AB7+ / AB6,4- für p568 und die Primer AS 6,4+ / Sp6 für p194 eingesetzt.

pE2_(p1-46/b47-397): Mit den Primern AB2,3+ / Sp6 wurde aus p568 und mit den Primern AS7+ / AS2,3- wurde aus p194 jeweils ein PCR-Produkt amplifiziert. Diese Produkte wurden *EcoR* I / blund end / *Xba* I anhand einer „three piece“ Ligation in das *EcoR* I / *Xba* I geschnittene Plasmid pcDNA3 ligiert.

pE2_(p1-56/b57-397): Die Klonierung erfolgte entsprechend pE2_(p1-46/b47-397) mit den Primern AB2,3+ /Sp6 für das „Template“ p568 und mit den Primern AS7+ / AS2,3- für p194.

pE2_(p1-56/b57-293/p294-396): Für diese Klonierung wurden aus dem „Template“ p194 mit den Primerpaaren AS7+ / AS2,3- und AS6,3+ / Sp6 zwei PCR-Produkte amplifiziert. Als drittes wurde ein PCR-Produkt aus dem „Template“ p568 mit den Primern AB6,3- / AB2,3+ amplifiziert. Diese drei PCR-Produkte wurden anschließend *EcoR* I / blund end / blund end / *Xba* I über eine „four piece“-Ligation in das *EcoR* I / *Xba* I geschnittene pcDNA3 Plasmid ligiert.

2.2.5.7 Etablierung chimärer Gesamtklone

Plasmide:	p757 (p447 Vorklon mit NgoM IV Site)	Rümenapf, nicht publiziert
	p447 (infektiöser cDNA-Klon des KSPV „Alfort/Tübingen“)	Rümenapf, nicht publiziert
	pBluescript SK II, Fa. Stratagene	

rKSPV_{p760} E2_(aa57-293BVDV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Mit dem Primerpaar IFF17 / SP6 wurde aus pE2_(p1-56/b57-293/p294-396) ein PCR-Produkt amplifiziert. Dieses Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *NgoM IV* / *BstAP I* anschließend verdaut und in den *NgoM IV* / *BstAP I* geschnittenen p757 Vorklon ligiert. Hieraus resultierte das Plasmid **p758**. Dieses Plasmid wurde schließlich mit den Restriktionsenzymen *Sma I* / *BstAP I* verdaut und in den ebenfalls mit *Sma I* / *BstAP I* geschnittenen Gesamtklon p447 inseriert.

rKSPV₇₆₃ E2_(aa57-274BVDV): Für diese Klonierung wurde mit den Primern IFF17 / SP6 aus pE2_(b1-274/p275-396) ein PCR-Produkt amplifiziert, das anschließend mit den Restriktionsenzymen *Cpo I* (*Rsr II*) / *BstAP I* verdaut wurde. Schließlich wurde es in den mit *Cpo I* / *BstAP I* geschnittenen Gesamtklon rKSPV_{p760} E2_(aa57-293BVDV) inseriert.

pAH76: Hierbei handelt es sich um die Konstruktion eines Vorklons für die Etablierung weiterer Gesamtklonchimären. KSPV E2 wurde über die Restriktionsenzyme *NgoM IV* blund end / *BamH I* aus p757 geschnitten und in den mit den Restriktionsenzymen *Apa I* blund end / *BamH I* verdauten pBlueskript SK II inseriert.

rKSPV E2_(I): Diese Klonierung erfolgte in drei Schritten. In dem Vorklon pAH76 wurden mittels einer „Quik Change“ PCR und den Primern oAH11 / oAH12 die porcinen Aminosäuren (variabler Bereich **I**) 49-63 des Glykoproteins E2 durch die bovinen Aminosäuren ersetzt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH77**. pAH77 wurde über einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *NgoM IV* / *BamH I* in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Plasmidvektor p757 inseriert. Hieraus resultierte **pAH81**. Im letzten Schritt wurde ein *BstApI* / *Sda I* Fragment aus pAH81 isoliert und in den *BstAp I* / *Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(II): Die Klonierung erfolgte entsprechend rKSPV E2_(I) in drei Schritten. Hier wurden per „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH13 / oAH14 im Vorklon pAH76 die porcinen Aminosäuren (variabler Sequenzbereich **II**) 87-93 des Glykoproteins E2 in die bovinen Aminosäuren umgewandelt. Es resultierte das Plasmid **pAH78**. Aus pAH78 wurde ein *NgoM IV* / *BamH I* Fragment isoliert und in den *NgoM IV* / *BamH I* geschnittenen p757 inseriert. Hieraus entstand das Plasmid **pAH82**. Schließlich wurde im letzten Schritt pAH82 mit den Restriktionsenzymen *BstAp I* / *Sda I* verdaut und dieses Fragment wurde in den ebenso geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(III): Die Klonierung erfolgte in drei Schritten nach der gleichen Vorgehensweise wie für rKSPV E2_(I) beschrieben. In pAH76 wurden anhand einer „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH15 / oAH16 die porcinen Aminosäuren 141-149 (Sequenzbereich **III**) im Glykoprotein E2 in die entsprechenden bovinen Aminosäuren geändert. Es resultierte das Plasmid **pAH79**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH79 ein *NgoM* IV / *BamH* I Fragment isoliert und in den *NgoM* IV / *BamH* I geschnittenen p757 inseriert. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH83**, aus dem im letzten Schritt ein *BstAP* I / *Sda* I Fragment isoliert wurde. Dieses Fragment wurde in den *BstAP* I / *Sda* I geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(IV): Die Klonierung erfolgte in drei Schritten. In pAH76 wurden anhand einer „Quik Change“ PCR mit den Primern oAH17 / oAH18 die porcinen Aminosäuren 166-175 (Bereich **IV**) im Glykoprotein E2 in die entsprechenden bovinen Aminosäuren geändert. Nach anschließender Religation resultierte das Plasmid **pAH80**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH80 ein *NgoM* IV / *BamH* I Fragment isoliert und in den *NgoM* IV / *BamH* I geschnittenen p757 inseriert. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH84**, aus dem im letzten Schritt ein *BstAP* I / *Sda* I Fragment isoliert wurde. Dieses Fragment wurde in den *BstAP* I / *Sda* I geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(I+II): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH13 / oAH14 wurde in pAH77 neben den bereits bovinen Aminosäuren 49-64 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 87-93 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH92**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH92 ein *BstAp* I / *Sda* I Fragment isoliert und in den *BstAp* I / *Sda* I geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(I+III): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH15 / oAH16 wurde in pAH77 neben den bereits bovinen Aminosäuren 49-64 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 141-149 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH93**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH93 ein *BstAp* I / *Sda* I Fragment isoliert und in den *BstAp* I / *Sda* I geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(I+IV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH17 / oAH18 wurde in pAH77 neben den bereits bovinen Aminosäuren 49-64 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 166-175 eingefügt. Hieraus

resultierte das Plasmid **pAH94**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH94 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(II+III): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH15 / oAH16 wurde in pAH78 neben den bereits bovinen Aminosäuren 87-93 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 141-149 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH95**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH95 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(II+IV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH17 / oAH18 wurde in pAH78 neben den bereits bovinen Aminosäuren 87-93 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 166-175 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH96**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH96 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(III+IV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH17 / oAH18 wurde in pAH79 neben den bereits bovinen Aminosäuren 141-149 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 166-175 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH97**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH97 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(I+II+III): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH15 / oAH16 wurde in pAH92 neben den bereits bovinen Aminosäuren 49-64 und 87-93 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 141-149 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH104**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH104 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(I+II+IV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH17 / oAH18 wurde in pAH92 neben den bereits bovinen Aminosäuren 49-64 und 87-93 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 166-175 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH105**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH105 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(II+III+IV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH17 / oAH18 wurde in pAH96 neben den bereits bovinen Aminosäuren 87-93 und 141-149 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 166-175 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH106**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH106 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV E2_(I+III+IV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH17 / oAH18 wurde in pAH93 neben den bereits bovinen Aminosäuren 49-64 und 141-149 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 166-175 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH107**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH107 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

rKSPV_{pAH113} E2_(I+II+III+IV): Diese Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Per „Quik Change“ PCR und mit den Primern oAH13 / oAH14 wurde in pAH107 neben den bereits bovinen Aminosäuren 49-64, 141-149 und 166-175 des Glykoproteins E2 zusätzlich die bovinen Aminosäuren 87-93 eingefügt. Hieraus resultierte das Plasmid **pAH108**. Im zweiten Schritt wurde aus pAH108 ein *BstAp I / Sda I* Fragment isoliert und in den *BstAp I / Sda I* geschnittenen p447 inseriert.

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation der für die Interaktion mit BVDV essentiellen Aminosäuren im bovinen CD46

3.1.1 Etablierung eines Bindungsassays

Bovines CD46 muss, um als zellulärer Rezeptor für BVDV bezeichnet werden zu können, die Kriterien der Virusbindung und der Beteiligung an der Infektion erfüllen. Die Steigerung der Empfänglichkeit bovines CD46 (CD46_{bov}) exprimierender PK15 Zellen (Maurer, Diss. 2002) verdeutlichte die Beteiligung von CD46_{bov} an der Infektion von BVDV. Um Virusbindung an CD46_{bov} nachweisen zu können, wurde folgender Bindungsassay etabliert.

Für die quantitative Messung von Virusbindung an CD46_{bov} wurde BVDV NADL mit [³H]-Uridin markiert. Hierzu wurden 2×10^7 MDBK-Zellen mit einer m.o.i. von 0,1 BVDV NADL infiziert und nach 24h mit 0,5ml [³H]-Uridin (1,0mCi/ml) markiert. Nach 48h Inkubation bei 37°C wurde das markierte Virus durch Ultrazentrifugation konzentriert und anschließend durch Flotation über einen Optiprep-Gradienten und Ultrazentrifugation gereinigt. Von dem Gradienten wurden 20 Fraktionen von jeweils 200µl gewonnen und die Radioaktivität bestimmt (Abb.3). Die Fraktionen 13 und 14 wiesen mit 13359cpm/5µl und 13944cpm/5µl deutlich höhere Werte als die anderen Fraktionen auf. Hierbei handelt es sich um beispielhafte Werte eines Experiments, spätere Versuche stellten sich jedoch ähnlich dar. Durch Virustitration und Proteinnachweis war zuvor vermittelt worden, dass sich in diesen Fraktionen Virus sammelt. Bei allen Versuchen wurden die virusenthaltenden Fraktionen vereint und für jedes Bindungsexperiment wurden hiervon 6000cpm verwendet. Mit dem so markierten Virus war die Grundlage für quantifizierbare Bindungsexperimente geschaffen.

Zu Beginn dieser Arbeit lag das Prinzip des Bindungsassays bereits vor und mit CD46_{bov} exprimierenden Zelllinien (HeLa, Maus-L und PK15, Maurer Diss. 2002) konnten bereits vorläufige Ergebnisse erzielt werden, die verdeutlichten, dass BVDV NADL an CD46_{bov} bindet.

Es zeigte sich jedoch, dass die CD46_{bov} exprimierenden Zelllinien nicht stabil waren und nach 6-7 Zellkulturpassagen zunehmend Zellen auftraten, die kein CD46_{bov} mehr exprimierten. Für die geplanten quantifizierbaren funktionellen Experimente mit CD46_{bov} sollten Zellen etabliert werden, die CD46_{bov} stabil exprimieren.

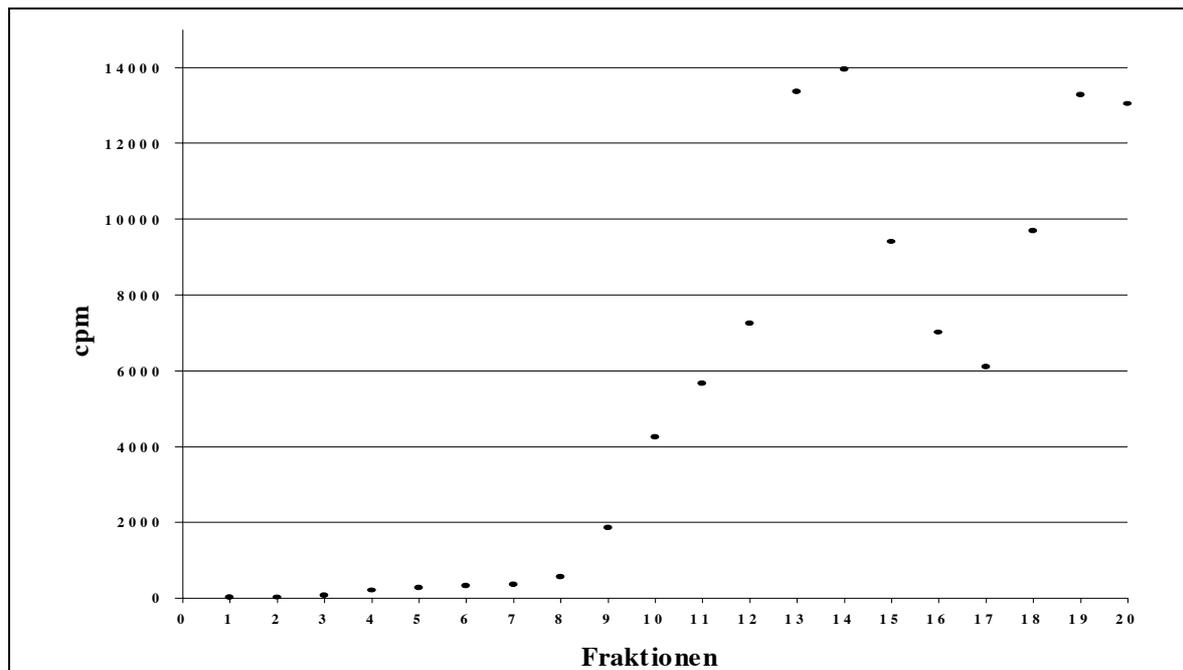


Abb.3: Profil eines Optiprep-Gradienten von [³H] markiertem BVDV

Beispielhafte Werte eines Experiments. Markiertes Virus wurde durch Ultrazentrifugation konzentriert und anschließend durch Flotation über einen Optiprep-Gradienten gereinigt. 20x 200 μ l Fraktionen wurden von diesem Optiprep-Gradienten abgenommen. Von jeweils 5 μ l wurde die Radioaktivität bestimmt. Für die Fraktionen 13 und 14 wurden mit 13359cpm und 13944cpm die höchsten Werte erzielt. In diesen Fraktionen hat sich das markierte Virus angesammelt.

Ein entscheidender Nachteil der transienten Expression bestand in der schwankenden Effizienz der Proteinexpression. Bei ersten Versuchen wurde festgestellt, dass die Expression nicht nur bei wiederholten Versuchsansätzen variierte, sondern auch einzelne Konstrukte unterschiedlich effektiv transfiziert bzw. exprimiert wurden.

Als Grundlage für die geplanten funktionellen Untersuchungen von CD46_{bov} wurde ein induzierbares Expressionssystem auf der Basis von SK6-Zellen gewählt, das bereits im Labor zur Verfügung stand. Der Vorteil liegt hierbei vor allem in der Stabilität der Expression des gewünschten Proteins. Dieses Zellsystem besteht aus zwei Komponenten, nämlich aus einer Zelllinie, in unserem Fall SK6-Zellen (Swine Kidney), die stabil mit dem sogenannten pTet on Regulatorplasmid transfiziert worden sind und aus dem pTRE-Vektor, dem sogenannten „response plasmid“.

Das pTet on Regulatorplasmid enthält das Gen des Regulatorproteins „reverse tetracycline-controlled transactivator“ (rtTA) und ein Neomycinresistenzgen. Das Regulatorprotein rtTA ermöglicht die für das Tet on System spezifische und nur mit dem Tetracyclinderivat Doxycyclin induzierbare Transkription. Das Neomycinresistenzgen erlaubt die Selektion von

SK6 Zellklonen, die das Regulatorplasmid enthalten. Um mit den SK6 Tet on Zellen ein bestimmtes Protein exprimieren zu können, muß die Nukleotidsequenz in den pTRE-Vektor kloniert werden. Der pTRE-Vektor enthält das „Tetrazykline Response Element“ (TRE) und wird über eine stabile Transfektion in die SK6 Tet on Zellen eingebaut. In den SK6 Tet on Zellen kann nun das Regulatorprotein an das „Tetrazykline Response Element“ binden und erst nach Zugabe von Doxycyclin zu den Zellen wird mit der Transkription der mit dem pTRE-Vektor eingebauten, gewünschten Gensequenz begonnen.

Für die Etablierung von SK6 Tet on Zellen, die CD46_{bov} exprimieren, wurde das im pKM6 (Maurer, Diss. 2002) vorhandene CD46_{bov} in den pTRE-Vektor kloniert. Über eine stabile Transfektion wurde der CD46_{bov} enthaltene pTRE-Vektor in die SK6 Tet on Zellen eingebaut. Um den Transfektionserfolg nachweisen zu können, muss bei der Transfektion ein sogenanntes „Selektionsplasmid“ wie z.B. das pEF-PAC Plasmid kotransfiziert werden. Durch Kotransfektion des pEF-PAC Plasmids, das eine Puromycinresistenz kodiert, wurde gewährleistet, dass die CD46_{bov} exprimierenden Zellklone über Zugabe von 2mg/ml Puromycin zum Kulturmedium selektiert werden können. Mit der Zugabe von sowohl G418 als auch von Puromycin zum Kulturmedium wurden ausschließlich Zellklone selektiert, die das pTet on Regulatorplasmid und das pEF-PAC Plasmid enthalten. Anhand der Selektion konnte jedoch nicht unbedingt auf die Anwesenheit des pTRE Vektors und die damit verbundene Expression von CD46_{bov} geschlossen werden. Um nachzuweisen, dass die selektierten Zellklone CD46_{bov} exprimieren, wurden sie 24h mit Doxycyclin induziert und nicht induziert anhand eines immunhistochemischen Nachweises mit den gegen CD46_{bov} gerichteten monoklonalen Antikörpern (mAk) BVD/CA 17, 26 und 27 getestet.

Zusätzlich wurde eine Western Blot Analyse zur Darstellung der induzierbaren Expression des CD46_{bov} in den SK6 Tet on Zellen (SK6CD46_{bov}) durchgeführt (Abb.4). Hierfür wurde die Zelllinie SK6CD46_{bov} ohne und mit Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium 18h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und in einer SDS-PAGE (8% Tricinel) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit anti-CD46-Serum inkubiert. Für das anti-CD46-Serum war bekannt, dass es sowohl bovines als auch porcines CD46 erkennt. Die Detektion des Proteins erfolgte mit Chemilumineszenz. Bereits im Zellysate von SK6CD46_{bov} ohne Doxycyclin Präinkubation war CD46 nachweisbar, jedoch zeigte sich eine deutliche Zunahme der Proteinbande nach Zugabe von Doxycyclin (Induktion). Die parentalen SK6-Zellen weisen nur eine sehr schwache CD46 Proteinbande auf.

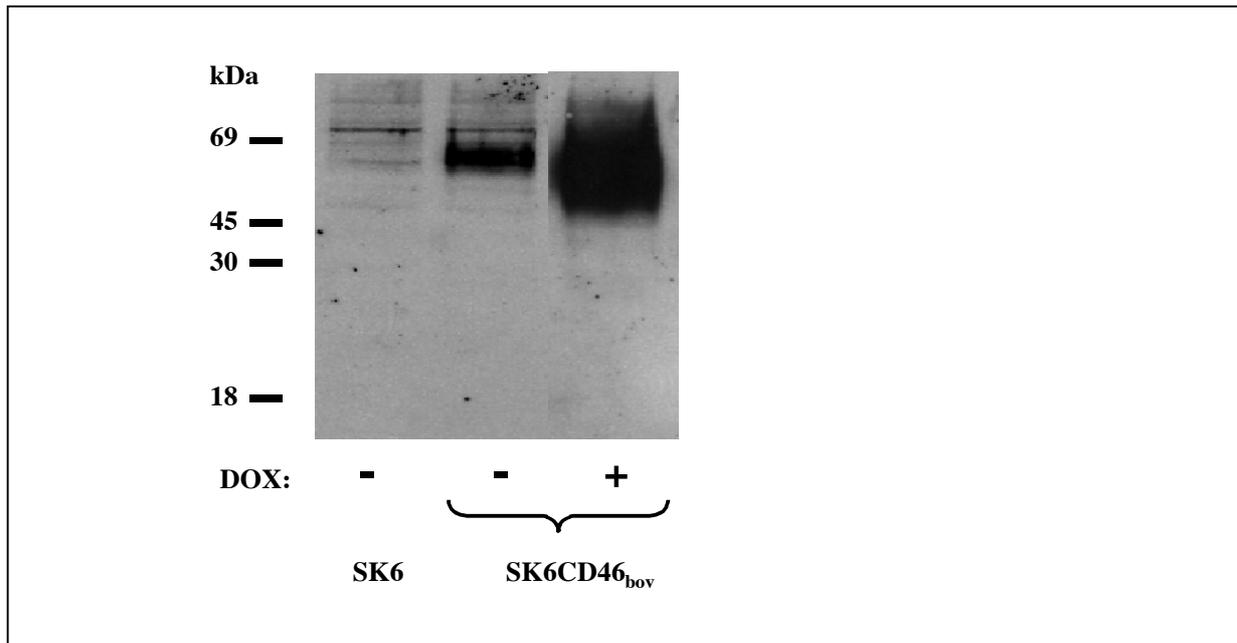


Abb.4: Western Blot Analyse der Zelllinie SK6CD46_{bov}

10 μ l des Zelllysats der Zelllinie SK6CD46_{bov} wurden mit und ohne Zugabe von Doxycyclin unter nicht reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. 10 μ l des Zelllysats von SK6-Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit anti-CD46-Serum inkubiert und die Proteine wurden nach Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörper mit Chemilumineszenz detektiert.

Während für SK6CD46_{bov} bereits ohne Präinkubation CD46 nachweisbar war, zeigte sich eine deutliche Zunahme der Proteinbande nach Zugabe von Doxycyclin.

In dem Bindungsassay wurden die Zelllinien SK6CD46_{bov} und SK6 induziert und nicht induziert auf Bindung getestet. Die SK6-Zellen dienten als Kontrolle. Vier Ansätze von jeder Zelllinie wurden getestet. Die Zelllinien wurden im Doppelansatz jeweils im induzierten und nicht induzierten Zustand auf Bindung untersucht. Zwei weitere Ansätze wurden für den Nachweis der Spezifität der Bindung verwendet. Hierfür wurden die induzierten Zelllinien 1h bei 4°C mit anti-CD46-Serum oder mit Präimmunsereum (Normalserum) präinkubiert. Anschließend wurden alle vier Ansätze mit 6000cpm des markierten BVDV 1h bei 4°C inkubiert. Zur Bestimmung der gebundenen Virusmenge wurde die Virussuspension von den Zelllinien abgenommen und gesammelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die im Lysat enthaltene Radioaktivität sowie die Radioaktivität von Virusinokulum und Waschpuffern wurde im Liquid Szintillations Counter bestimmt. Schließlich wurde der prozentuale Anteil an Radioaktivität im Zelllysats von der Gesamtradioaktivität pro Bindungsexperiment errechnet und als Bindung in Prozent angegeben. Alle

Bindungsexperimente wurden dreimal durchgeführt und daraus der Mittelwert errechnet (Abb.5).

1,7% der eingesetzten [^3H]-Radioaktivität haben an die SK6-Zellen gebunden, während sich 98,7% im Überstand und Waschungen befand. Für die induzierte Zelllinie SK6CD46_{bov} wurde hingegen eine gebundene Radioaktivität von 7,7% festgestellt. Durch Präinkubation der Zelllinie mit anti-CD46-Serum wurde dieser Wert um 3,0% auf 4,7% reduziert und somit die Spezifität der Bindung erwiesen. Die Präinkubation der induzierten Zelllinie SK6CD46_{bov} mit Normalserum ergab einen Bindungswert von 7,7%.

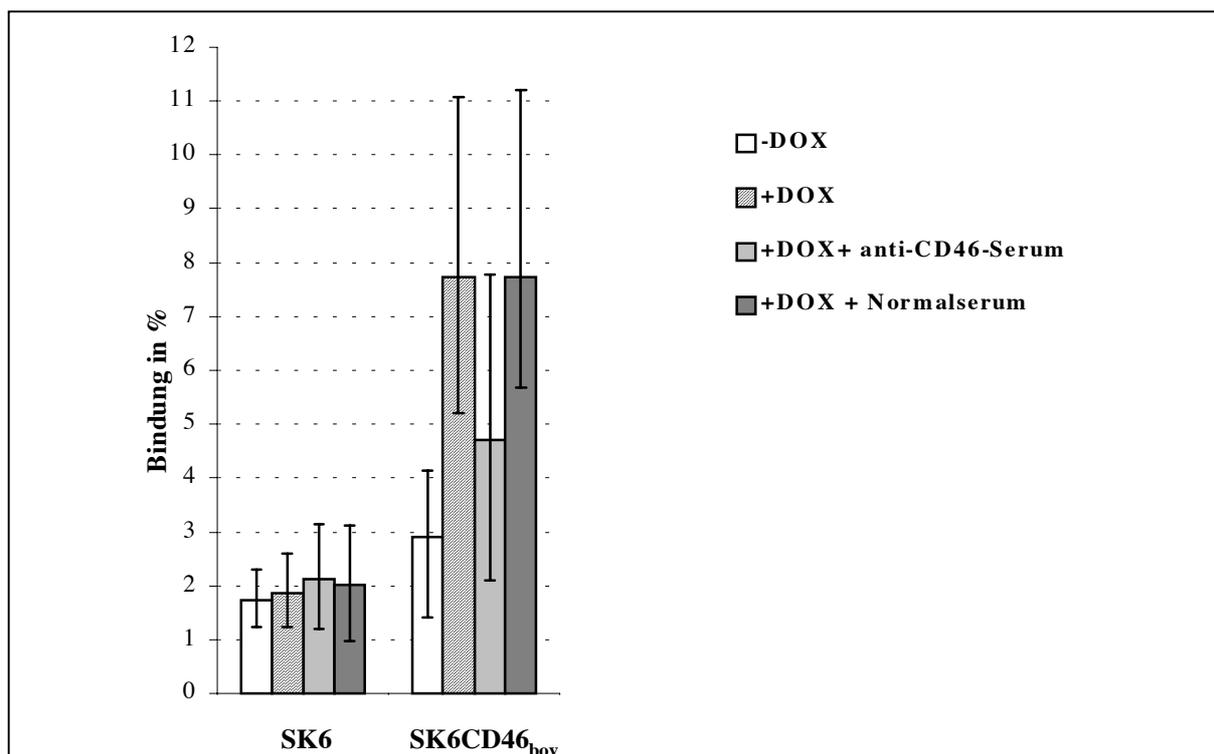


Abb.5: Bindung von [^3H] markiertem BVDV an SK6CD46_{bov}

Im Bindungsassay wurden die nicht induzierten und induzierten Zelllinien SK6 und SK6CD46_{bov} 1h bei 4°C mit markiertem Virus inkubiert. Die Zelllinien wurden jeweils nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum und Präimmenserum (Normalserum) auf Bindung getestet. Nach Induktion ergab sich für SK6CD46_{bov} ein Bindungswert von 7,7%. Die nach Induktion erfolgte Präinkubation mit anti-CD46-Serum führte zu einer Reduktion auf 4,7%. Für die SK6-Zellen wurden unspezifische Bindungswerte von 1,7% und 1,9% gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten, die Fehlerbalken geben den jeweils niedrigsten und höchsten gemessenen Wert an.

3.1.2 Empfänglichkeit von CD46_{bov} für BVDV

Zunächst wurde die etablierte Zelllinie SK6CD46_{bov} auf ihre Empfänglichkeit für BVDV NADL getestet. Als Kontrollen dienten MDBK-Zellen (Marbin Darby Bovine Kidney) und SK6-Zellen (Abb.6). Dieser Versuch wurde in einem Doppelsatz durchgeführt. Die Zelllinien, SK6CD46_{bov} und SK6, wurden sowohl mit und ohne Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium analysiert. 10⁶ Zellen wurden von den mit Doxycyclin induzierten und nicht induzierten SK6CD46_{bov} und SK6 Zelllinien und von der nicht induzierten Kontrolle, den MDBK-Zellen 1h bei 37°C mit einer m.o.i. von 0,1 mit BVDV NADL infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und mittels immunhistochemischem Nachweis mit dem mAk D5, der das BVDV E2 Glykoprotein erkennt und dem mAk Code 4, der gegen das Pestivirus NS3 Protein gerichtet ist, detektiert. Nach Zugabe des anti-Maus IgG Antikörpers und der Substratlösung konnten die gefärbten infizierten Zellen ausgezählt werden. Der für die MDBK-Zellen ermittelte Wert an infizierten Zellen wurde als Standardwert der Empfänglichkeit für BVDV mit 100% festgelegt (Abb.6). Anhand des Standardwertes wurden die prozentualen Empfänglichkeitswerte der SK6CD46_{bov} und SK6 Zelllinien errechnet. Für die nicht mit Doxycyclin induzierten SK6CD46_{bov} und SK6 Zelllinien wurde eine Empfänglichkeit von 18,8% und 1,6% ermittelt. Nach Induktion wurden reduzierte Empfänglichkeitswerte von 5,5% und 1,1% errechnet. Der Empfänglichkeitswert von 18,8% von nicht induzierten SK6CD46_{bov} bestätigt die Funktionalität des in die SK6 Tet on Zellen eingebauten CD46_{bov} und gestattet den Einsatz dieser Zelllinie in weiteren funktionellen Versuchen.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigten (Abb.4), dass SK6CD46_{bov} Zellen schon ohne Induktion eine Expression des CD46_{bov} aufweisen. Diese Expression reicht aus, um die höchsten Empfänglichkeitswerte zu erzielen. Die Zunahme der Proteinexpression von CD46_{bov} nach Induktion der Zelllinie führt zu einer deutlichen Verringerung der Empfänglichkeit für BVDV von 18,8% auf 5,5%.

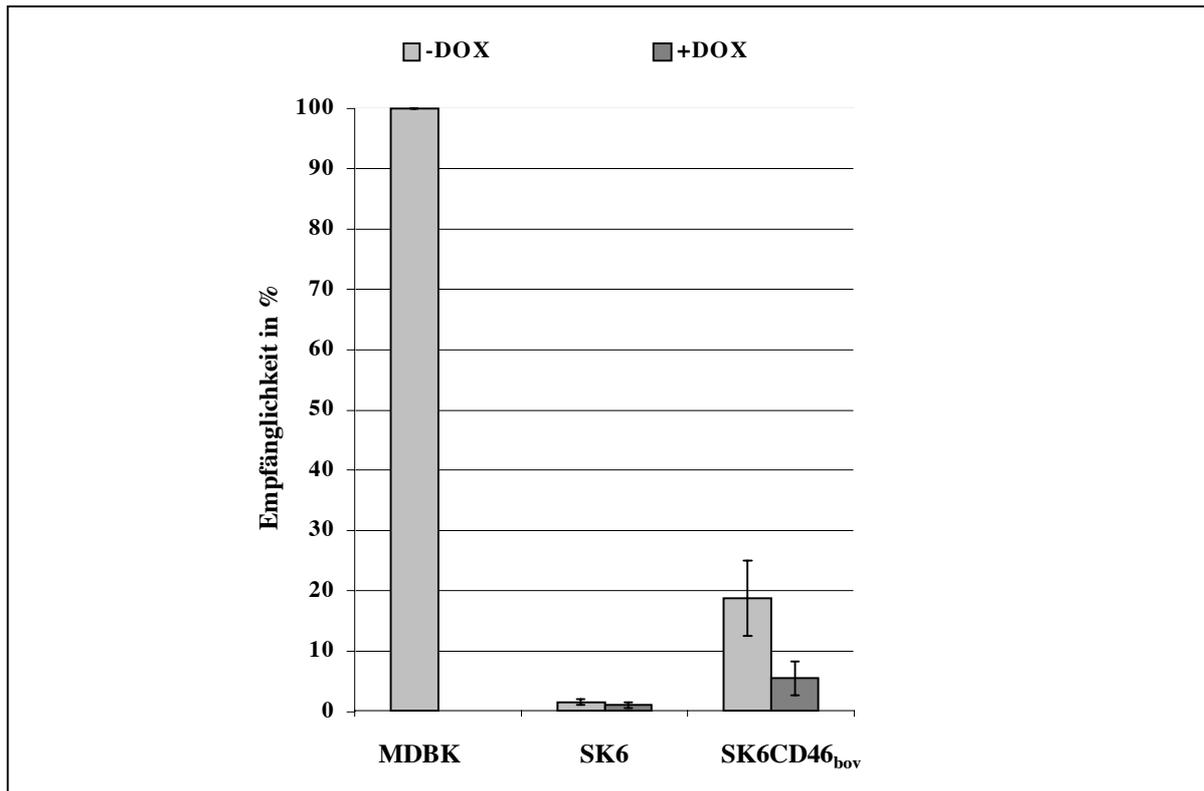


Abb.6: Empfänglichkeit von CD46_{bov} exprimierenden SK6-Zellen für BVDV

Je 10^6 induzierte und nicht induzierte SK6 und SK6CD46_{bov} Zellen sowie MDBK-Zellen wurden 1h bei 37°C mit BVDV NADL mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. 24h später wurden die Zellen fixiert und mittels immunhistochemischem Nachweis mit dem mAk D5, der das BVDV Glykoprotein E2 erkennt und dem mAk Code 4, der gegen das Pestivirus NS3 Protein gerichtet ist, ausgewertet. Der für die MDBK-Zellen ermittelte Empfänglichkeitswert wurde als Standardwert auf 100% festgelegt. Die Expression von bovinem CD46 führte in den nicht induzierten SK6-Zellen zu einer Steigerung der Empfänglichkeit von 1,6% auf 18,8%.

3.1.3 Funktionelle Untersuchung von CD46_{bov} durch Deletion einzelner CCP's

Die Expression von CD46_{bov} in SK6-Zellen zeigte eindeutig eine 3-4fache erhöhte Bindung von [³H] markiertem BVDV sowie eine 50-100fache Steigerung der Empfänglichkeit. Hierdurch waren die Daten von Maurer (Diss. 2002) bestätigt und die basalen Kriterien eines Virusrezeptors erfüllt.

Im weiteren sollte jetzt auf molekularer Ebene untersucht werden, an welche Struktur von CD46_{bov} BVDV NADL bindet. Die N-terminale extrazelluläre Domäne des Typ1 Membranproteins CD46, das auch als „membrane cofactor protein“ (MCP) bezeichnet wird, enthält vier für Angehörige der Familie der Regulatoren der Komplementaktivierung typische Sequenzen („complement control protein“, CCP) (Liszewski et al., 1991). Es handelt sich hierbei um 60-70 Aminosäuren lange Abschnitte, die jeweils vier hoch konservierte Cysteine und ein ebenso konserviertes Tryptophan enthalten (Reid et al., 1986). In CCP1 und CCP4

von CD46_{bov} ist jeweils eine und in CCP2 sind zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen vorhanden. An die CCP-Domänen schließt sich eine Region an, die überdurchschnittlich viele Serine, Threonine und Proline enthält und stark O-glykosyliert ist (STP-Region). Die Verankerung in der Plasmamembran wird durch eine hydrophobe Transmembranregion bewirkt, auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich eine kurze C-terminale Domäne.

Für CD46_{bov} lagen drei spezifische mAk BVD/CA 17, 26 und 27 vor, für die nachgewiesen werden konnte, dass sie die BVDV Infektion hemmen (Schelp et al., 1995; Maurer, Diss. 2002). Da diese Antikörper die Infektion durch BVDV hemmen, lag die Vermutung nahe, dass ihre Epitope im CD46_{bov} in räumlicher Nähe der BVDV Bindungsstelle liegen. Um diese Epitope zu identifizieren, wurde das CD46_{bov} gezielt verändert. Berücksichtigt wurde bei der Veränderung des CD46 Moleküls der modulare Aufbau aus den vier CCP-Domänen. Es wurden zunächst einzelne CCP Module im CD46 Molekül deletiert. Im CD46_{bov} existieren keine Schnittstellen für Restriktionsenzyme zwischen den einzelnen CCP Molekülen, mit deren Hilfe die CCP-Domänen hätten auf einfache Weise deletiert werden können. Das Einfügen solcher Schnittstellen hätte jedoch zu unerwünschten Änderungen in der Aminosäuresequenz geführt. Daher wurde eine Klonierungsmethode auf der Basis der Polymerase Kettenreaktion (PCR) verwendet, um gezielte Deletionen in der CD46 Sequenz einzuführen. Die PCR wurde mit der *Pfu*-Polymerase, mit der im pcDNA3 als Expressionsvektor vorhandenen CD46_{bov} Sequenz (pKM6; Maurer, Diss. 2002) und mit den für jede Deletion spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Hierfür wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass die CCP-Domänen einschließlich der zwischen den CCP Molekülen liegenden Sequenz deletiert wurden. Um die per PCR erhaltenen, linearen DNA-Moleküle mit nicht kompatiblen Enden miteinander ligieren zu können, war es notwendig glatte Enden herzustellen. Alle resultierenden Plasmide wurden durch Sequenzierung bestätigt. Auf diese Weise wurden CCP1 (pCD46_{Δ1}), CCP2 (pCD46_{Δ2}), CCP3 (pCD46_{Δ3}), CCP4 (pCD46_{Δ4}), CCP1 und CCP2 (pCD46_{Δ1,Δ2}) sowie CCP3 und CCP4 (pCD46_{Δ3,Δ4}) deletiert (Abb.7 und Abb.11).

Die CCP-Deletionsmutanten im pcDNA3 Vektor wurden nach Infektion von Vaccinia Virus (MVAT7) in BHK-Zellen transfiziert. Das pcDNA3 Plasmid enthält neben dem hCMV Promotor einen T7-RNA-Polymerase Promotor. Dies ermöglicht eine Expression der CCP-Deletionsmutanten cDNA in eukaryotischen Zellen mit Hilfe des rekombinanten MVAT7. Das MVAT7-System führt hierbei zu einer deutlichen Steigerung der Expression, da die Transkription der Plasmide im Zytoplasma erfolgt.

Die Expression der Konstrukte wurde mit den für CD46_{bov} spezifischen mAk BVD/CA 17, 26 und 27 nachgewiesen. Im immunhistochemischen Nachweis konnte festgestellt werden, dass die Antikörper nur dann die CD46-Konstrukte erkannten, solange CCP1 oder CCP2 erhalten waren (Abb.7). Dabei war CCP1 für die Bindung von BVD/CA 26 und CCP2 für die Bindung von BVD/CA 17 und 27 notwendig. Die Expression von pCD46_{Δ1,Δ2} wurde mit Hilfe eines anti-CD46-Serums (Maurer, Diss. 2002) überprüft.

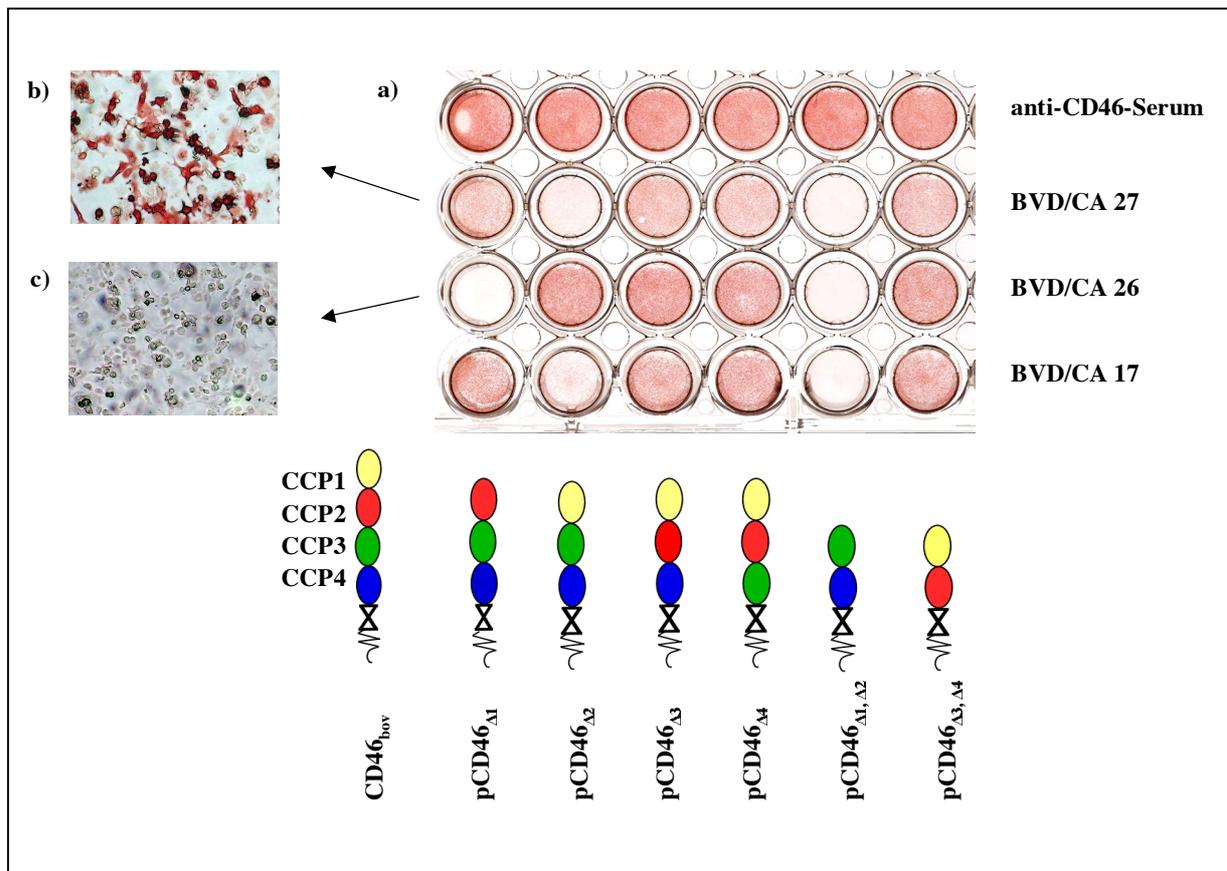


Abb.7: Reaktionsmuster der mAk BVD/CA 17, 26 und 27 im immunhistochemischen Nachweis von pCD46_{Δ1}, pCD46_{Δ2}, pCD46_{Δ3}, pCD46_{Δ4}, pCD46_{Δ1,Δ2} und pCD46_{Δ3,Δ4}

- pCD46_{Δ1}, pCD46_{Δ2}, pCD46_{Δ3}, pCD46_{Δ4}, pCD46_{Δ1,Δ2} und pCD46_{Δ3,Δ4} wurden nach Infektion von MVAT7 in BHK-Zellen transient exprimiert, 24h später fixiert und anschließend mit den mAk BVD/CA 17, 26 und 27 inkubiert. Nach Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörper wurden die Zellen mit einer Substratlösung gefärbt. Anhand der Färbung konnte festgestellt werden, dass mAk BVD/CA 26 bovines CCP1 erkennt, während mAk BVD/CA 17 und mAk BVD/CA 27 mit CCP2 interagieren. Für den Nachweis von pCD46_{Δ1,Δ2} wurde mit anti-CD46-Serum inkubiert.
- 200fache Vergrößerung der gefärbten BHK-Zellen nach Transfektion mit pCD46_{Δ1} und anschließender Inkubation mit mAk BVD/CA 27.
- 200fache Vergrößerung der BHK-Zellen nach transienter Expression von pCD46_{Δ1} und Inkubation von mAk BVD/CA 26.

3.1.3.1 Erzeugung von Zelllinien, die Deletionsmutanten von CD46_{bov} exprimieren

Für die funktionellen Experimente, den Bindungsassay und den Empfänglichkeitsnachweis, wurden von den pCD46 Deletionsmutanten vier SK6 Tet on Zelllinien (SK6CD46 Δ_1 , SK6CD46 Δ_2 , SK6CD46 Δ_{1,Δ_2} und SK6CD46 Δ_{3,Δ_4}) etabliert. Hierzu wurden die im pcDNA3 Expressionsvektor vorhandenen Konstrukte pCD46 Δ_1 , pCD46 Δ_2 , pCD46 Δ_{1,Δ_2} und pCD46 Δ_{3,Δ_4} über Restriktionsschnittstellen in den zur Etablierung von SK6 Tet on Zelllinien notwendigen pTRE Vektor kloniert. Über eine stabile Transfektion wurden die Deletionsmutanten von CD46_{bov} im pTRE-Vektor in die SK6 Tet on Zellen eingebaut. Für die Konstruktion der Zelllinien wurden demzufolge die CD46 Plasmide berücksichtigt, die Deletionen von CCP1, CCP2, CCP1+2 und CCP3+4 enthielten. Das Reaktionmuster der mAk BVD/CA 17, 26 und 27 ließ eine besondere Bedeutung der CCP1 und CCP2-Module erkennen.

Zum Nachweis der Proteinexpression und der Proteingröße wurden diese Zelllinien für die Western Blot Analyse mit und ohne Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin zum Zellkulturmedium 18h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und in einer SDS-PAGE (8% Tricingel) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit anti-CD46-Serum inkubiert (Abb.8).

In Abwesenheit von Doxycyclin erfolgte nur eine geringe Expression der Deletionsmutanten. Bei allen Zelllinien zeigte sich eine deutliche gesteigerte Expression der Deletionsmutanten von CD46_{bov} und des unveränderten CD46_{bov} nach Doxycyclin Zugabe. Für die Positivkontrolle SK6CD46_{bov} konnte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 58kDa festgestellt werden. Während bei SK6CD46 Δ_1 , SK6CD46 Δ_2 und SK6CD46 Δ_{3,Δ_4} eine Reduktion des Molekulargewichtes auf ca. 50kDa erkennbar war. Das Molekulargewicht für SK6CD46 Δ_{1,Δ_2} betrug nur noch ca. 40kDa. Die Reduktion der Molekulargewichte kann durch die Deletion der verschiedenen CCP Module und durch die unterschiedliche Entfernung N-glykosydisch gebundener Zuckerketten bedingt sein. Bei SK6CD46 Δ_1 und SK6CD46 Δ_{3,Δ_4} wurde jeweils nur eine N-Glykosylierungsstelle entfernt, während bei SK6CD46 Δ_2 zwei und bei SK6CD46 Δ_{1,Δ_2} sogar drei N-Glykosylierungsstellen aus der Sequenz deletiert wurden.

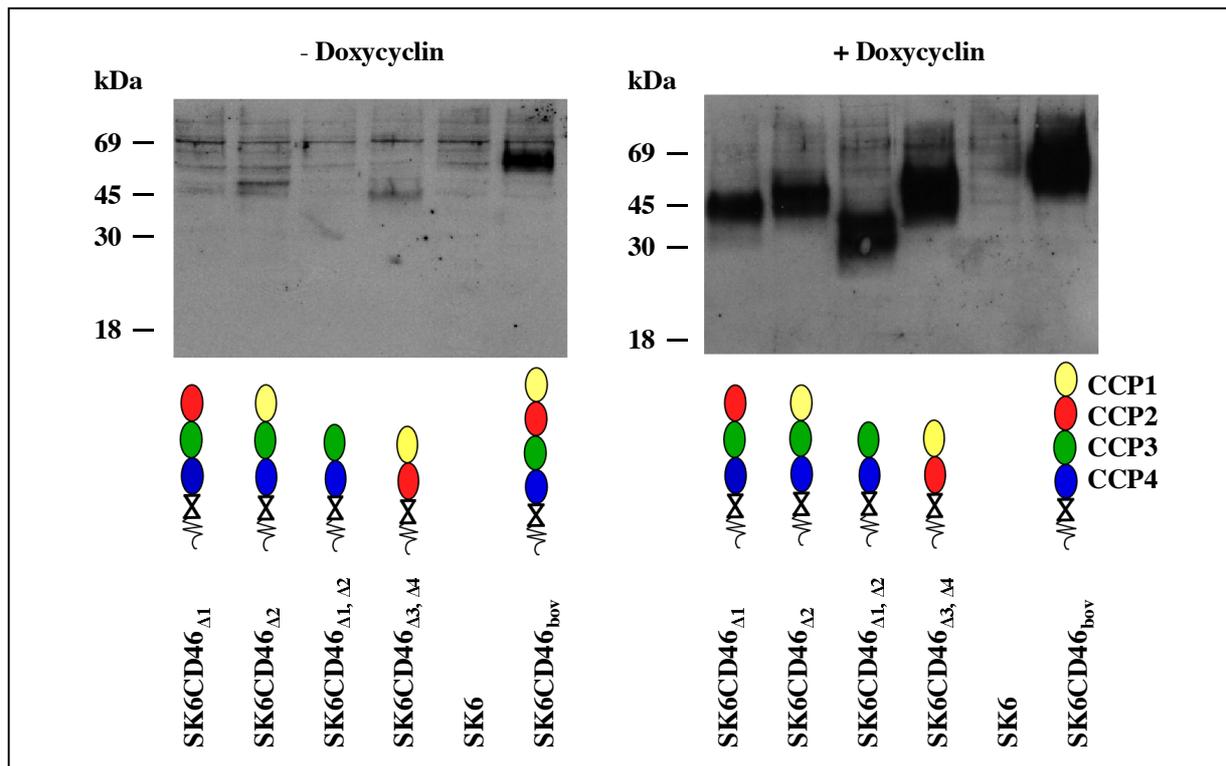


Abb.8: Western Blot Analyse von SK6CD46_{Δ1}, SK6CD46_{Δ2}, SK6CD46_{Δ1,Δ2}, und SK6CD46_{Δ3,Δ4}

Die mit und ohne Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin inkubierten Zelllinien wurden lysiert und in einer SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen mit anti-CD46-Serum inkubiert. Die Detektion erfolgte über Bindung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörpers und anschließender Chemilumineszenz.

Nach erfolgter Doxycyclin Inkubation zeigten alle Zelllinien eine deutlich gesteigerte Expression der Deletionsmutanten von CD46_{bov} und CD46_{bov}.

Die unterschiedlichen Molekulargewichte der Zelllinien können eine Folge der Deletion verschiedener CCP Module sowie der damit einhergehenden Entfernung von N-Glykosylierungsstellen sein.

3.1.3.2 Bindung von [³H] markiertem BVDV an Deletionsmutanten von CD46_{bov}

Nachdem die Western Blot Analysen die Expression der gewünschten CD46 Moleküle bestätigt hatten, konnten die Zelllinien funktionell untersucht werden. Hierzu wurden die Zelllinien jeweils nicht induziert und induziert im Bindungsassay mit [³H] markiertem BVDV getestet. Zur Kontrolle der Spezifität der Bindung wurde jeweils ein Ansatz der induzierten Zelllinien mit anti-CD46-Serum und einer mit Präimmunsereum (Normalserum) 1h bei 4°C präinkubiert. Die Ergebnisse des Bindungsassays zeigten, dass die Deletionsmutanten von CD46_{bov} nicht in der Lage sind BVDV zu binden (Abb.9). Einzig die

Positivkontrolle SK6CD46_{bov} erreichte nach Induktion einen mittleren, spezifischen Bindungswert von 7,3%, der durch anti-CD46-Serum teilweise hemmbar war.

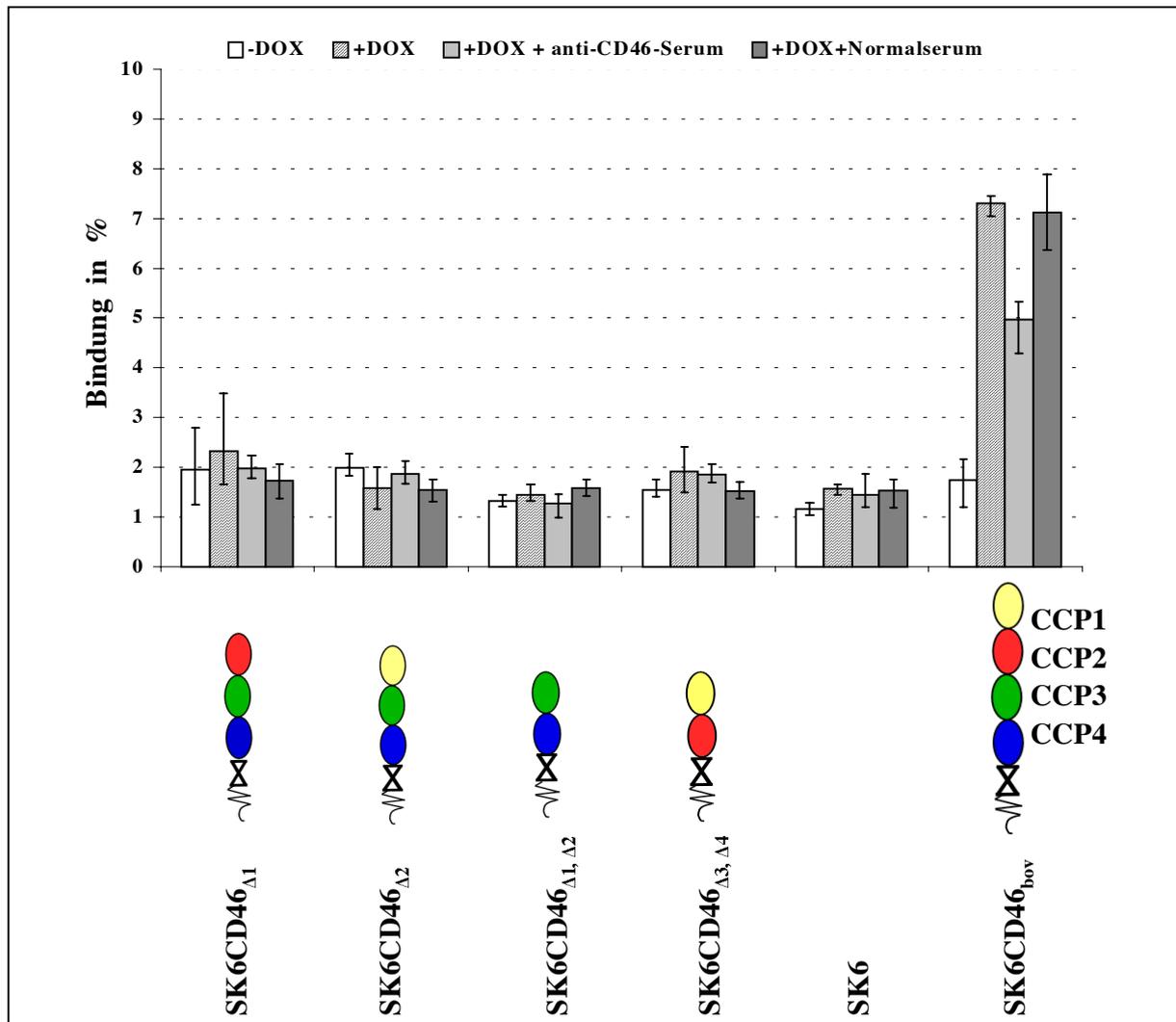


Abb.9: Bindung von [³H] markiertem BVDV an Deletionsmutanten von CD46_{bov}

Im Bindungsassay wurden die nicht induzierten und induzierten Zelllinien der Deletionsmutanten von CD46_{bov}, SK6CD46_{bov} und die SK6-Zellen 1h bei 4°C mit markiertem Virus inkubiert. Die Zelllinien wurden jeweils nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum und Präimmunsrum (Normalserum) auf Bindung getestet. Die induzierten Deletionsmutanten von CD46_{bov} erreichten Bindungswerte von 2,3%, 1,6%, 1,5% und 1,9%. Für die Negativkontrolle, die SK6-Zellen, wurde in Anwesenheit von Doxycyclin ein Bindungswert von 1,6% ermittelt. Die Positivkontrolle SK6CD46_{bov} erreichte nach Induktion einen spezifischen Bindungswert von 7,3%. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten, die Fehlerbalken geben den jeweils niedrigsten und höchsten gemessenen Wert an.

3.1.3.3 Empfänglichkeit der Deletionsmutanten von CD46_{bov} für BVDV

Nachdem die Deletionsmutanten von CD46_{bov} im Bindungsassay keine spezifische Bindung von [³H] markiertem BVDV aufwiesen, wurden sie in einem weiteren funktionellen Experiment auf ihre Empfänglichkeit für BVDV getestet. Hierfür wurden 10⁶ Zellen der induzierten und nicht induzierten Zelllinien der Deletionsmutanten von CD46_{bov} 1h bei 37°C mit BVDV NADL mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert und 24h später fixiert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit den mAk D5 (anti BVDV Glykoprotein E2) und Code 4 (anti Pestivirus NS3). Die nicht induzierte Positivkontrolle SK6CD46_{bov} wurde als Standardwert auf 100% festgelegt, nach Induktion wurde für die Positivkontrolle ein mittlerer Wert von 10,5% ermittelt (Abb.10). Für die nicht induzierten Deletionsmutanten wurden mittlere Werte von 2,3%, 1,7%, 1,6% und 1,4% festgestellt, die ungefähr mit dem Wert der Negativkontrolle von 1,7% übereinstimmten. Nach Induktion wurden deutlich geringere, mittlere Werte von 0,1%, 0,4%, 0,4% und 0,6% für die Deletionsmutanten von CD46_{bov} ermittelt. Der Wert der SK6-Zellen, der Negativkontrolle, war hingegen mit 4,0% deutlich höher. Offensichtlich bewirkt die Deletion einer oder mehrerer CCP Module den Funktionsverlust als BVDV Rezeptor. Interessanterweise wird die basale Empfänglichkeit von SK6-Zellen durch die Überexpression der Deletionsmutanten von CD46_{bov} sogar noch verringert.

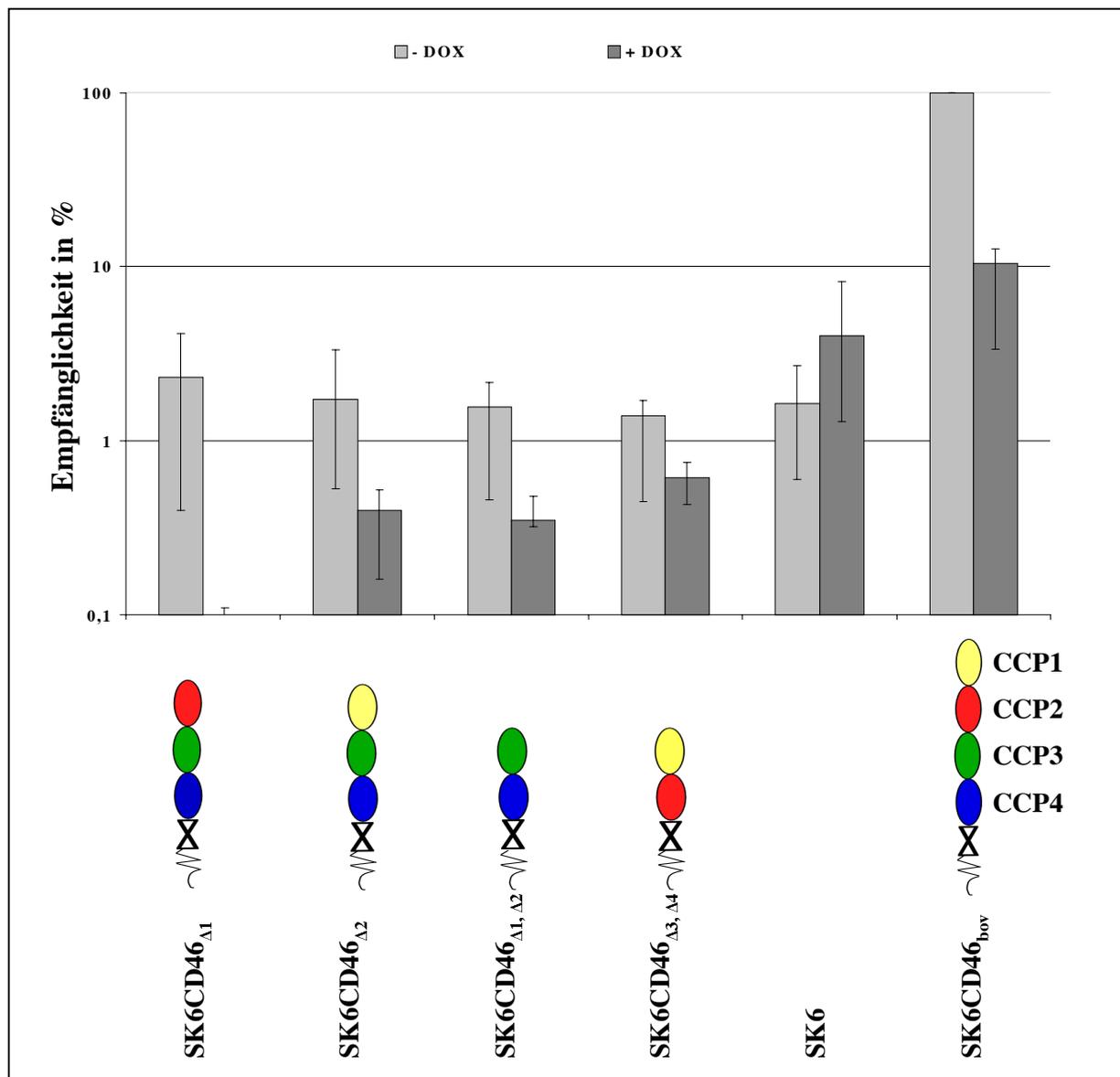


Abb.10: Empfänglichkeit der Deletionsmutanten von CD46_{bov} für BVDV

Für den Nachweis der Empfänglichkeit wurden 10^6 Zellen der Zelllinien der Deletionsmutanten von CD46_{bov}, der SK6CD46_{bov} und der SK6-Zellen nicht induziert und induziert 1h bei 37°C mit BVDV mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit den mAk D5 und Code 4. Die nicht induzierten SK6CD46_{bov} wurden als Standardwert auf 100% festgelegt. Nach erfolgter Induktion lag die Empfänglichkeit der SK6CD46_{bov} bei 10,5%. Die nicht induzierten Deletionsmutanten von CD46_{bov} erreichten Empfänglichkeitswerte, die dem der Negativkontrolle (SK6-Zellen) entsprachen. Nach erfolgter Induktion lagen die Werte der Deletionsmutanten von CD46_{bov} deutlich unter dem Wert der Negativkontrolle. Bei allen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus 3 Experimenten, die Fehlerbalken geben die jeweils höchsten und niedrigsten gemessenen Werte an.

3.1.4 Funktionelle Untersuchung von CD46_{bov} durch Austausch einzelner CCP Module

Der Verlust der Rezeptorfunktion bei den Deletionsmutanten von CD46_{bov} ließ den Schluss zu, dass vermutlich eine Mindestgröße oder Struktur vorhanden sein muss, um Virus zu binden. Aus diesem Grunde wurden Austauschmutanten von CD46_{bov} erzeugt, die bei gleicher Molekülgröße die Sequenz der CCP Module veränderten. Hierfür wurden Zelllinien, die CD46_{bov} mit CCP Modulen eines anderen Rezeptors enthielten, etabliert. Für Masernvirus waren bereits einige Chimären von humanem CD46 konstruiert worden, hierfür wurden CCP-Domänen von CD55 verwendet (M. Manchester et al., 1997; Greenstone et al., 2002). CD55 ist entsprechend CD46 ebenfalls aus CCP Modulen aufgebaut, jedoch besteht es nicht aus 4 sondern aus 5 CCP-Domänen. Um die für Bindung und Infektion relevanten Bereiche im CD46_{bov} identifizieren zu können, galt es, ein möglichst ähnliches Molekül für die geplanten CCP Austausche zu finden, das keine Bindung an BVDV aufweisen durfte. Die als Negativkontrolle eingesetzten SK6-Zellen exprimieren porcines CD46 (CD46_{porz}). Da weder vermehrte Bindung von BVDV noch eine erhöhte Empfänglichkeit für das Virus festgestellt werden konnte, wurde CD46_{porz} für die geplanten CCP Austausche verwendet. Im Sequenzvergleich des CD46_{bov} mit dem porcinen Homolog konnte eine Übereinstimmung von ca. 60% der Aminosäuren der CCP Module festgestellt werden (Abb.11).

bovin (b) 1	M R A S C T P L K A P L R - R P E R L A S S G R F A - - - W - - - - V L L L A P
	M A L L R P E S S F W V L A
porzin (p) 1	M M A F C A - L R K A L P C R P E N P F S S R C F V E I L W - - - - V S L - A L
	CCP1
b 33	L L L L P T S S D A C D D P P R F V S M K P Q G T L K P S Y S P G E Q I V Y E C
	L L P S D A C D P P F S M K P Q L Y P G Y E C
p 35	V F L L P M P S D A C D E P P K F E S M R P Q - F L N T T Y R P G D R V E Y E C
	CCP2
b 73	H L G F Q P V T P G Q V L A L V C Q D N N T W S S L Q E G C K K R R C P T L A D
	G F Q P P V C Q D H T W S L Q E C C L D
p 75	R P G F Q P M V P A L P T E S V C Q D D N T W S P L Q E A C R R R K A C S N L P D
b 112	P T N G Q V I L V N G N T E F G S E V H Y V C N N G Y Y L L G T N I S Y C E V S
	P H G Q V H G F G S C H G Y L L G Y C V S
p 114	P L N G Q V S Y P N G D M L F G S K A Q F T C N T G F Y I I G A E T V Y C Q V S
	CCP3
b 152	S G T G V N W S D N P P T C E K I L C Q P P P E I Q N G K Y T N N H K D V F E Y
	G W S P C E K I L C P P E I H G K Y T H H K D V F E Y
p 154	- G N V M A W S E P S P L C E K I L C K P P G E I P N G K Y T N S H K D V F E Y
b 192	N E V V T Y S C D P S N G P D E Y S L V G E S K L T C I G N G E W S S Q P P Q C
	N E V V T I S C S G P D E Y S L V G E S K L T C I G E W S S P P C
p 134	N E V V T Y S C L S S T G P D E F S L V G E S S L F C I G K D E W S S D P P E C
	CCP4
b 232	K V V K C V Y P A I E H G T I V S G F G P K Y Y K A T V V L K C N E G F N L Y
	K V V K C Y P H G I V S G F G K Y Y K A V V K C H G F L
p 233	K V V K C P Y P V V P N G E I V S G F G S K F Y Y K A E V V F K C N A G F T L H
b 272	G N S V V V C G E N S T W E P E L P K C I K G H - - - - - P
	G V C G H S T W E P E P C I K P
p 273	G R D T I V C G A N S T W E P E M P Q C I K D S K P T D P P A T P G P S H P G P
b 297	P R P T D A S P P N G A E G L G A G Y I V L V I V A V L I G V G L L L C L - - Y
	P P D A S P P A E L G V V L
p 313	P S P S D A S P P K D A E S L D G G I A A I V V G V L A A I A V I - - - - -
b 335	C C F C R Q R K K G I Y V T G E S H R Q D I L F S L
	G Y S
p 348	- - - - - A G G V Y F F H H K Y N K K R - - S K

Abb.11: Sequenzvergleich der bovinen und porzinen CD46 Aminosäuresequenzen

Aminosäuren, die mit der CD46_{bov} Sequenz übereinstimmen, sind grün dargestellt. Die CCP-Domänen sind durch schwarze Umrahmung markiert. Die Cysteine der CCP-Domänen sind konserviert. Die porzinen CCP1 und CCP2-Module umfassen jeweils eine Aminosäure weniger als die bovinen CCP1 und CCP2-Module.

Die in der Aminosäuresequenz der CCP Module vorhandenen Cysteine sind konserviert. Im Sequenzvergleich wird deutlich, dass die porzine Sequenz der CCP1 und CCP2-Domänen jeweils eine Aminosäure weniger umfasst als die bovine (Abb.11).

Zur Herstellung der CCP Austausch im CD46_{bov} wurden PCR-Klonierungen durchgeführt. Die porzinen CCP-Domänen wurden mittels PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden hergestellt. Um die per PCR erhaltenen, linearen DNA-Moleküle mit nicht kompatiblen

Enden miteinander ligieren zu können, war es notwendig glatte Enden herzustellen. In die im pcDNA3 Expressionsvektor vorhandenen Konstrukte pCD46_{Δ1}, pCD46_{Δ2}, pCD46_{Δ3}, CD46_{Δ4}, pCD46_{Δ1,Δ2} und CD46_{Δ3,Δ4} wurden in die fehlenden CCP-Domänen die entsprechenden porcinen CCP-Domänen eingesetzt. Die so im pcDNA3 Vektor etablierten CD46-Konstrukte wurden über Restriktionsschnittstellen in den zur Etablierung von SK6 Tet on Zelllinien notwendigen Vektor pTRE kloniert.

Es wurden folgende SK6 Tet on Zelllinien erzeugt SK6CD46_{p1}, SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p3}, SK6CD46_{p4}, SK6CD46_{p1,p2}, SK6CD46_{p3,p4}. Die Zelllinien wurden nach Induktion mit den mAk BVD/CA 17, 26 und 27 im immunhistochemischen Nachweis getestet (Abb.12). Entsprechend den Ergebnissen der Deletionsmutanten von CD46_{bov} erkannten die mAk BVD/CA 17 und 27 SK6CD46_{p1}, SK6CD46_{p3}, SK6CD46_{p4} und SK6CD46_{p3,p4}, während BVD/CA 26 mit SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p3}, SK6CD46_{p4} und SK6CD46_{p3,p4} interagierte.

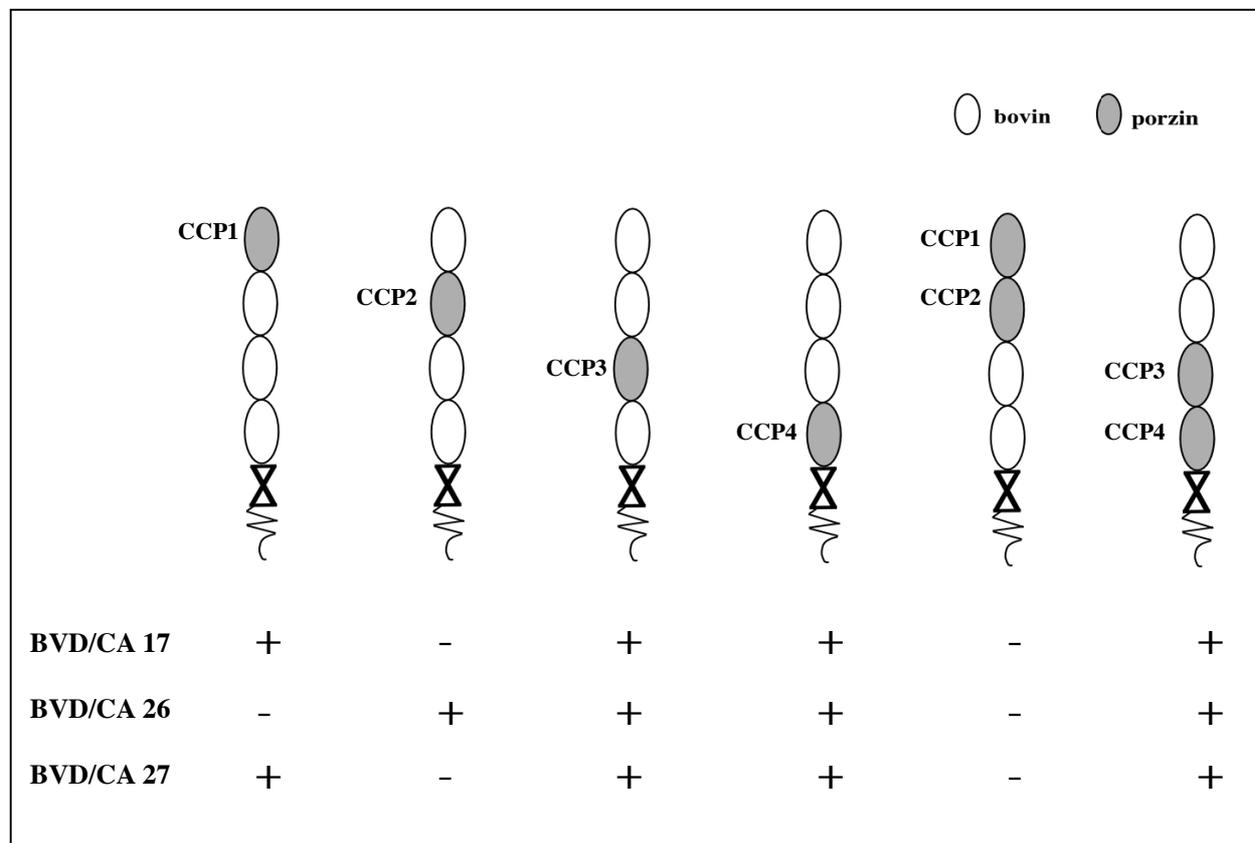


Abb.12: Reaktionsmuster der mAk BVD/CA 17, 26, 27 im immunhistochemischen Nachweis der Austauschmutanten von CD46_{bov}

Die mAk konnten nur mit den Zelllinien interagieren, bei denen CCP1 und/oder CCP2 von CD46_{bov} erhalten blieb. Für BVD/CA 26 wurde bovines CCP1 und für BVD/CA 17 und 27 wurde bovines CCP2 als Bindungsdomäne identifiziert.

3.1.4.1 Western Blot Analyse der Austauschmutanten von CD46_{bov}

Zum Nachweis der korrekten Proteinexpression und der exprimierten Menge wurden die Zelllinien, die Austauschmutanten von CD46_{bov} exprimieren, mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Für die Western Blot Analyse wurden SK6CD46_{p1}, SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p3}, SK6CD46_{p4}, SK6CD46_{p1,p2}, SK6CD46_{p3,p4} mit und ohne Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium 18h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und in einer SDS-PAGE (8% Tricingel) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit anti-CD46-Serum inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Chemilumineszenz (Abb.13). Die Zelllinien SK6CD46_{p2} und SK6CD46_{p4} wiesen bereits ohne Induktion eine Expression des Proteins auf. Dieses Expressionsverhalten wurde, wie schon bei den Deletionsmutanten von CD46_{bov} beschrieben, auch für die Positivkontrolle CD46_{bov} festgestellt.

Nach Induktion war eine starke Proteinexpression der Austauschmutanten von CD46_{bov} erkennbar. Für die Zelllinien SK6CD46_{p2} und SK6CD46_{p1,p2} erscheint das Molekulargewicht von CD46 mit ca. 54kDa etwas kleiner als das der Positivkontrolle SK6CD46_{bov} mit ca. 58kDa. Dieser Molekulargewichtsunterschied lässt sich durch das Fehlen von N-Glykosylierungsstellen im porzinen CCP2 erklären. Während im CD46_{bov} vier N-Glykosylierungsstellen, davon jeweils eine in CCP1 und CCP4 und zwei in CCP2 vorhanden sind, gibt es im CD46_{porz} insgesamt nur zwei N-Glykosylierungsstellen und zwar eine in CCP1 und eine in CCP4.

Das für die Western Blot Analyse verwendete anti-CD46-Serum erkennt CD46_{porz}. Dadurch lässt sich die sowohl ohne als auch nach erfolgter Induktion der Zelllinien vorhandene Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 69kDa erklären.

Die Menge an exprimiertem Protein der Zelllinie SK6CD46_{p3,p4} erschien nach Induktion im Vergleich zu den Proteinexpressionen der anderen Zelllinien deutlich reduziert.

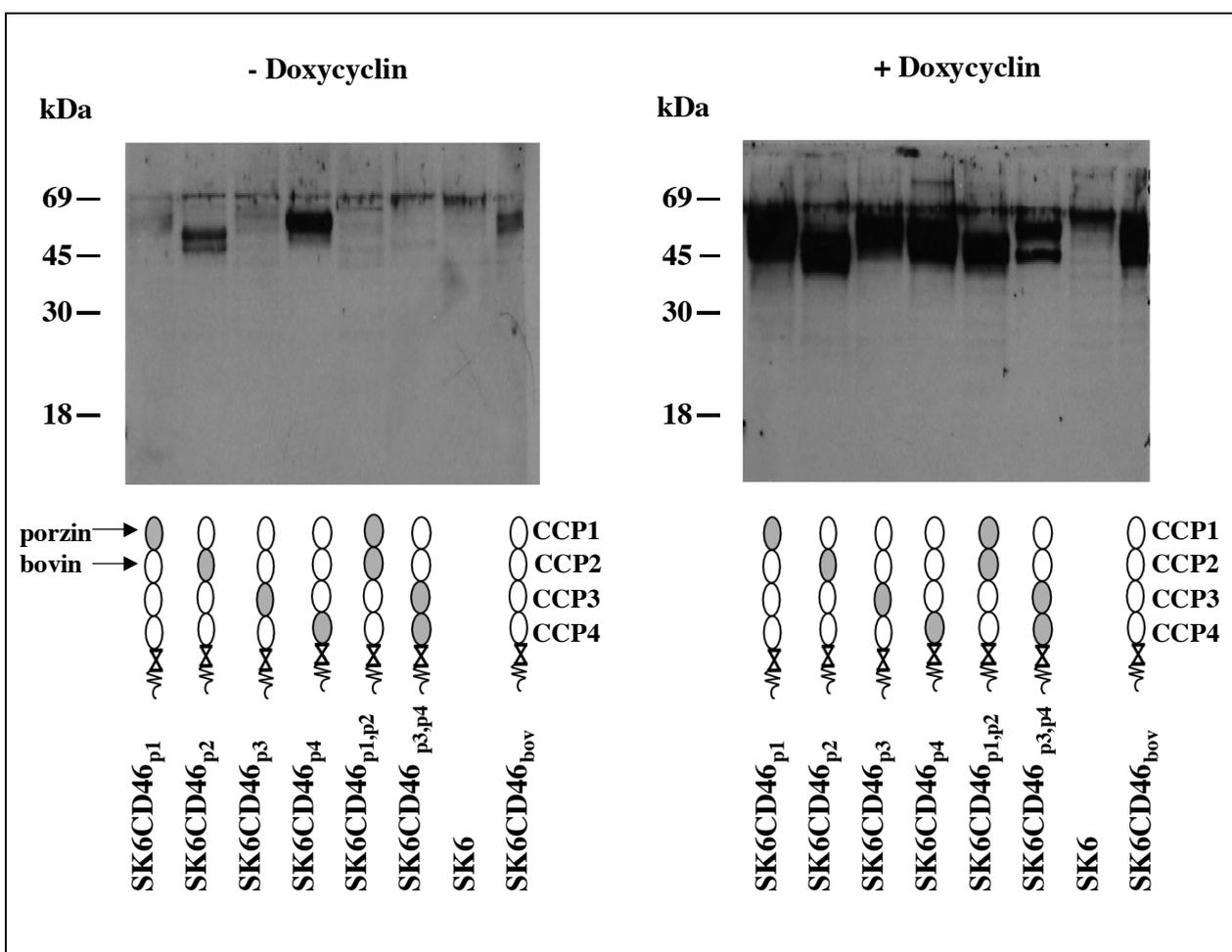


Abb.13: Western Blot Analyse der Austauschmutanten von CD46_{bov}

Die mit und ohne Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin für 18h bei 37°C inkubierten Zelllinien wurden lysiert und in einer SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen mit anti-CD46-Serum inkubiert. Die Detektion erfolgte über Bindung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörpers und anschließender Chemilumineszenz.

Die Zelllinien SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p4} und SK6CD46_{bov} weisen bereits ohne Induktion eine Expression des Proteins auf. Die nach Induktion deutlichen Molekulargewichtsunterschiede der einzelnen Zelllinien lassen sich durch die unterschiedliche Anzahl von N-Glykosylierungsstellen in bovinen und porzinen CCP-Domänen erklären.

3.1.4.2 Bindung von [³H] markiertem BVDV an Austauschmutanten von CD46_{bov}

Die Austauschmutanten von CD46_{bov} wurden entsprechend den Deletionsmutanten wiederum im Bindungstest mit [³H] markiertem BVDV getestet. Bei diesen Analysen gab es im Gegensatz zu den Deletionsmutanten von CD46_{bov} deutliche Unterschiede in der Bindung (Abb.14).

Für SK6CD46_{p1} und SK6CD46_{p1,p2} wurden nach Induktion Bindungswerte von 1,5% und 1,8% gemessen, die somit nur leicht über dem Wert der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, mit

1,1% lagen. Die Vorinkubation mit anti-CD46-Serum nach erfolgter Induktion führte bei diesen Zelllinien zu keiner Beeinflussung der Ergebnisse, sie blieben mit Werten von 1,5% und 1,8% unverändert. Auch nach Präinkubation mit Normalserum veränderten sich die Werte mit 1,4% und 1,6% kaum. Folglich konnte für diese beiden Zelllinien, bei denen bovines CCP1 durch porcines CCP1 ersetzt wurde, keine Erhöhung der spezifischen Bindung von BVDV festgestellt werden, was auch durch die fehlende Wirkung der mAk BVD/CA 17, 26 und 27 verdeutlicht wird.

Für die Zelllinien SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p3} und SK6CD46_{p4} konnten hingegen spezifische Bindungswerte von 7,0%, 5,9% und 6,9% beobachtet werden, die allerdings unter dem Wert von SK6CD46_{bov} (9,2%) lagen. Die Spezifität der Bindung ließ sich anhand der Reduktion dieser Werte nach Vorinkubation der drei induzierten Zelllinien mit anti-CD46-Serum auf 4,1%, 2,6% und 2,4% nachweisen. Während das Normalserum die Bindungswerte kaum veränderte (7,6%, 5,9% und 6,7%). Für alle drei Zelllinien, bei denen bovines CCP1 im CD46 Molekül erhalten blieb, konnte eine spezifische Bindung für BVDV gemessen werden.

Für SK6CD46_{p3,p4} wurde nach Induktion eine spezifische Bindung von 2,6% nachgewiesen und nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum ein Wert von 1,9% ermittelt. Somit wies diese Zelllinie einen geringen Unterschied zu der Negativkontrolle (SK6-Zellen) auf, für die keine spezifische Bindung festgestellt werden konnte.

Die Ergebnisse des Bindungsassays der CD46_{bov} Austauschmutanten zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von bovinem CCP1 und der spezifischen Bindung von [³H] markiertem BVDV auf.

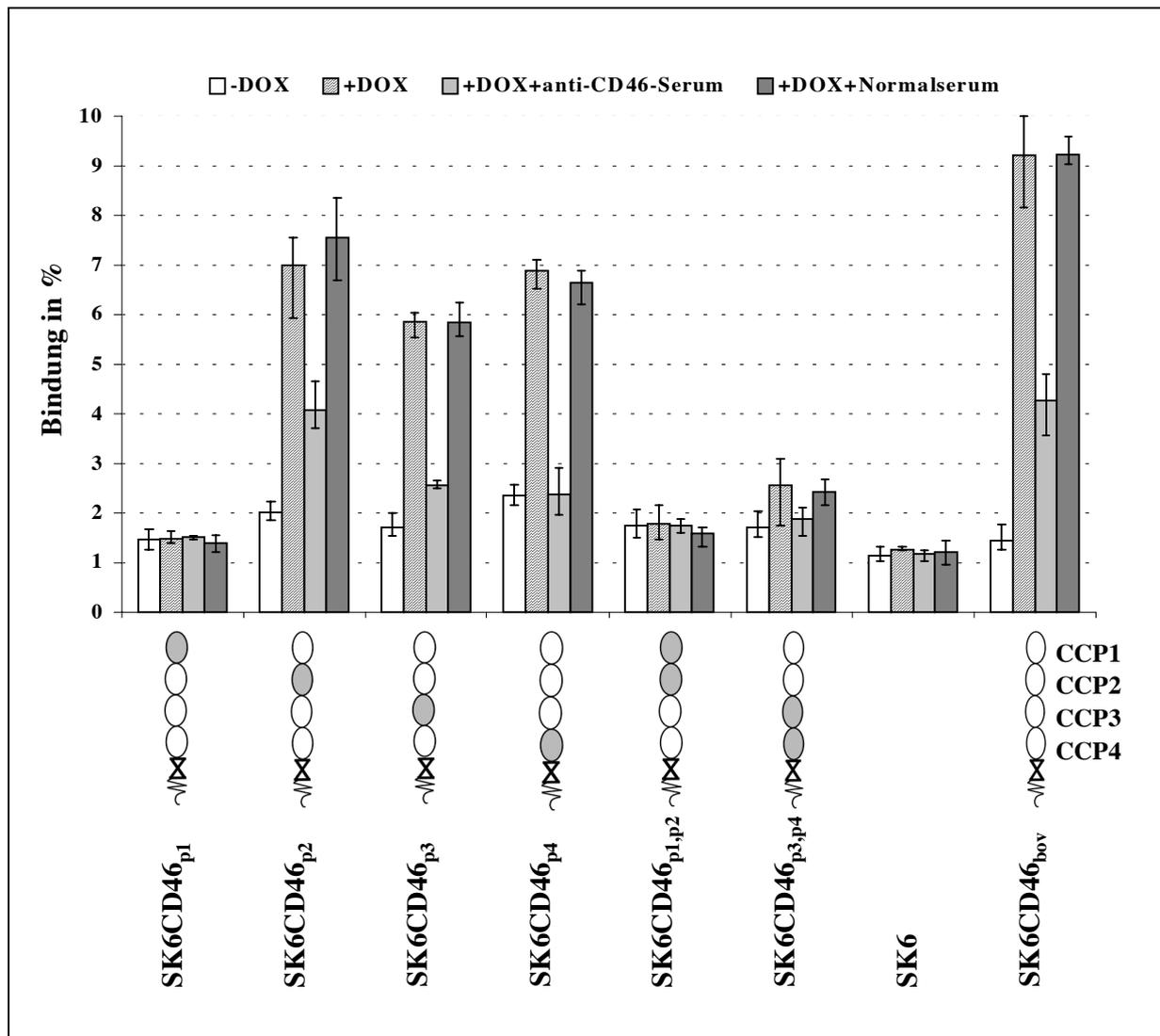


Abb.14: Bindung von [³H] markiertem BVDV an Austauschmutanten von CD46_{bov}

Im Bindungsassay wurden die nicht induzierten und induzierten Zelllinien der Austauschmutanten von CD46_{bov}, SK6CD46_{bov} und die SK6-Zellen 1h bei 4°C mit markiertem Virus inkubiert. Die Zelllinien wurden jeweils nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum und Präimmenserum (Normalserum) auf Bindung getestet.

Für SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p3}, SK6CD46_{p4}, SK6CD46_{p3,p4} und SK6CD46_{bov} wurden nach Induktion spezifische Bindungswerte von 7,0%, 5,9%, 6,9%, 2,6% und 9,2% ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten, die Fehlerbalken geben jeweils den niedrigsten und höchsten gemessenen Wert an.

3.1.4.3 Empfänglichkeit der Austauschmutanten von CD46_{bov} für BVDV

Aufgrund der besonderen Bedeutung von CCP1 für die Bindung von [³H] markiertem BVDV NADL waren die Untersuchungen zur Empfänglichkeit der Austauschmutanten von CD46_{bov} von großem Interesse. Hierbei zeigte sich im standardisierten „Empfänglichkeitstest“, dass die Zelllinien SK6CD46_{p1} und SK6CD46_{p1,p2} ohne Induktion Empfänglichkeitswerte für BVDV von lediglich 1,2% und 0,8% erreichten (Abb.15). Nach Induktion der beiden Zelllinien reduzierte sich für SK6CD46_{p1} die Empfänglichkeit auf einen mittleren Wert von 0,03%, während sich der Wert von SK6CD46_{p1,p2} mit 0,9% leicht erhöhte. Sowohl die mit und ohne Induktion ermittelten Empfänglichkeitswerte von SK6CD46_{p1,p2} erreichten Werte in der Größenordnung der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, mit 1,0% und 1,2 %.

Dagegen konnten für SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p3} und SK6CD46_{p4} ohne Induktion mit 72,9%, 81,0% und 32,4% deutlich erhöhte Werte für die Empfänglichkeit ermittelt werden. SK6CD46_{p3} erreichte mit einem Mittelwert von 81,0% fast den Bereich der Positivkontrolle SK6CD46_{bov} von 100%. Wie zuvor reduzierten sich die Empfänglichkeitswerte nach Induktion (47,2%, 73,8% und 2,5%). Auch nach Induktion der Positivkontrolle zeigte sich mit einem Wert von 29,1% eine deutliche Reduktion der Empfänglichkeit.

Ein anderes Bild ergab sich bei der Analyse von SK6CD46_{p3,p4}. Hier wurde ohne Induktion ein Empfänglichkeitswert von 1,7% ermittelt, der im Gegensatz zu den anderen Zelllinien nach Induktion auf 16,4% anstieg.

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass alle CD46-Konstrukte, die CCP1 von CD46_{bov} enthielten, eine gesteigerte Empfänglichkeit von SK6-Zellen zur Folge hatten.

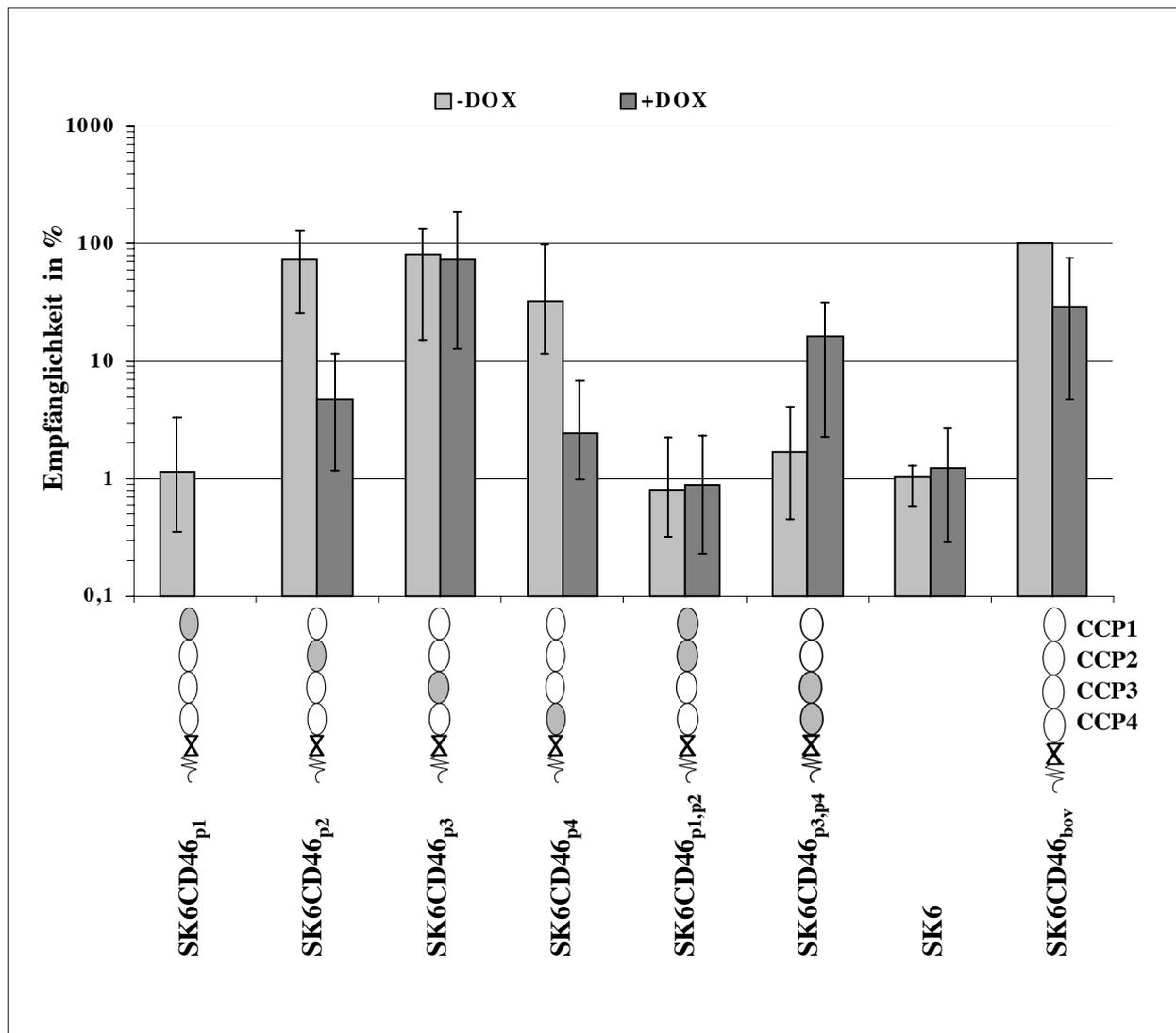


Abb.15: Empfänglichkeit der Austauschmutanten von CD46_{bov} für BVDV

Für den Nachweis der Empfänglichkeit wurden 10^6 Zellen der Zelllinien der Austauschmutanten von CD46_{bov}, von SK6CD46_{bov} und von den SK6-Zellen nicht induziert und induziert 1h bei 37°C mit BVDV mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit den mAk D5 und Code 4. Die nicht induzierten SK6CD46_{bov} wurden als Standardwert auf 100% festgelegt. Für die Zelllinien SK6CD46_{p1} und SK6CD46_{p1,p2} wurden ohne Induktion Werte von lediglich 1,2% und 0,8% ermittelt, während für SK6CD46_{p2}, SK6CD46_{p3} und SK6CD46_{p4} erhöhte Werte von 72,9%, 81,0% und 32,4% festgestellt wurden. Dagegen erzielte die Zelllinie SK6CD46_{p3,p4} ohne Induktion einen Wert von 1,7% der nach Induktion auf 16,4% anstieg.

3.1.5 Funktionelle Untersuchung von CD46_{bov} durch Austausch in CCP1

3.1.5.1 Funktionelle Untersuchung von CD46_{bov} durch CD46_{1(p/b)} und CD46_{1(b/p)}

Die Ergebnisse der Deletionsmutanten und der Austauschmutanten von CD46_{bov} legten nahe, dass bovines CCP1 für die Interaktion zwischen BVDV NADL und zellulärem Rezeptor CD46_{bov} essentiell ist.

Um die Bindungsdomäne in CCP1 einengen zu können, wurden Sequenzaustausche innerhalb von porzinem und bovinem CCP1 durchgeführt. Zunächst wurden zwei CD46 Proteine konstruiert, in denen die N-terminale Hälfte von CCP1 zum einen aus der bovinen (CD46_{1(b/p)}) und zum anderen aus der porzinen CCP1 Sequenz (CD46_{1(p/b)}) stammte, während die C-terminale Hälfte von CCP1 von der jeweils anderen Sequenz eingefügt wurde (Abb.16). Die Zelllinien SK6CD46_{1(p/b)} und SK6CD46_{1(b/p)} wurden im immunhistochemischen Nachweis mit dem spezifischen mAk BVD/CA 26 untersucht. Der Antikörper zeigte lediglich mit SK6CD46_{1(b/p)} eine Reaktion. Hierdurch wird verdeutlicht, dass zumindest ein Teil des mAk BVD/CA 26 Epitops im N-terminalen Bereich des bovinen CCP1-Moduls liegt. Dagegen ließ sich SK6CD46_{1(p/b)} nur mit dem anti-CD46-Serum nachweisen.

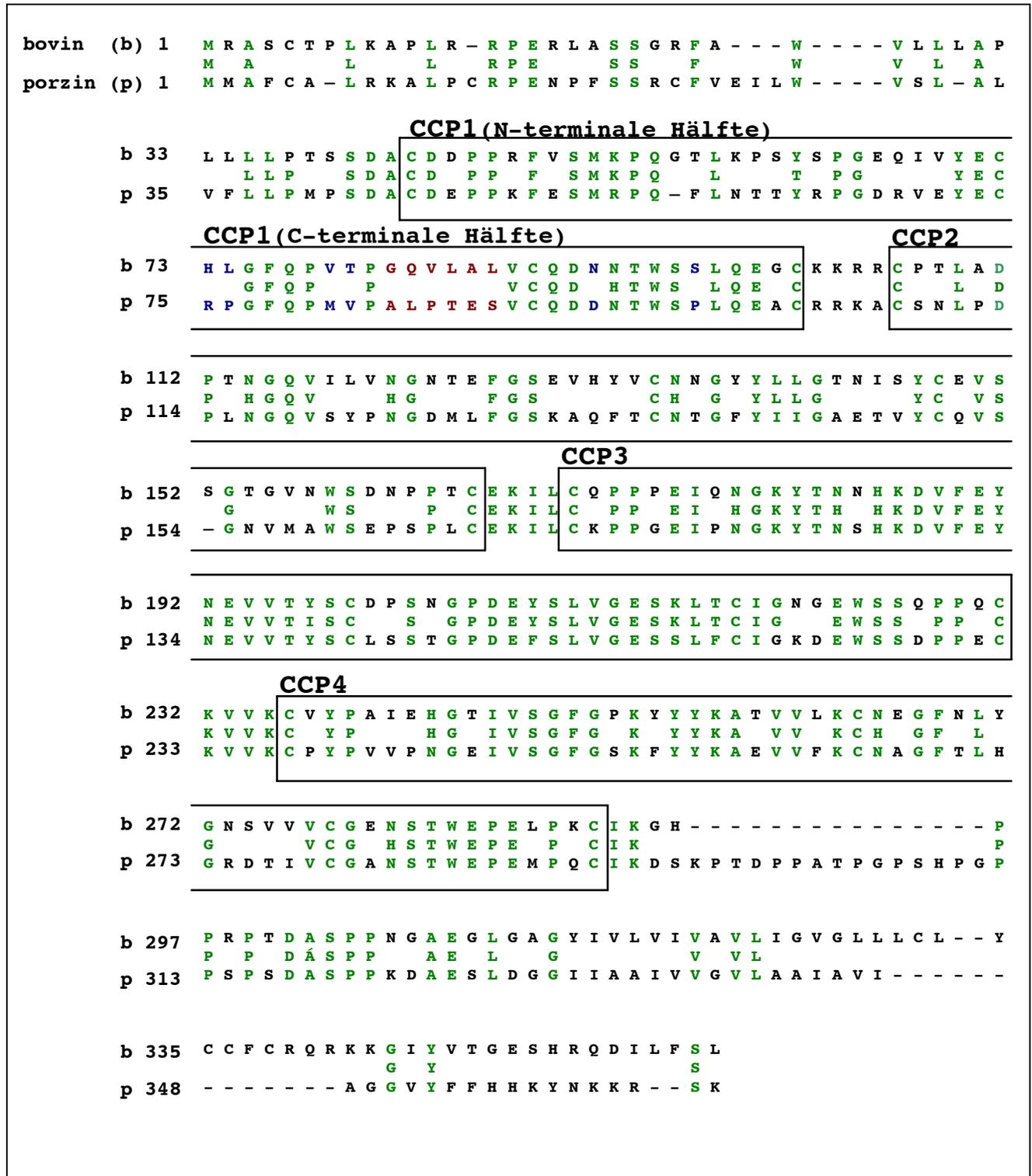


Abb.16: Sequenzvergleich der bovinen und porzinen CD46 Aminosäuresequenzen

Aminosäuren, die mit der CD46_{bov} Sequenz übereinstimmen, sind grün dargestellt. Die CCP-Domänen sind durch schwarze Umrahmung markiert. Von CCP1 ist die N-terminale und C-terminale Hälfte der Aminosäuresequenz bezeichnet.

Die Aminosäureaustausche der Zelllinien SK6CD46_{R31P32}, SK6CD46_{M37V38}, SK6CD46_{D50} und SK6CD46_{S55} sind mit blau und die von SK6CD46_{A40LPTE545} sind mit rot markiert.

3.1.5.2 Bindung von [³H] markiertem BVDV an CD46_{1(p/b)} und CD46_{1(b/p)}

Die beiden etablierten Zelllinien, SK6CD46_{1(p/b)} und SK6CD46_{1(b/p)}, wurden wiederum im standardisierten Bindungstest mit [³H] markiertem BVDV getestet.

Für SK6CD46_{1(p/b)} wurde nach Induktion mit 3,1% ein höherer Bindungswert ermittelt als für SK6CD46_{1(b/p)} mit 0,9% (Abb.17). Die Spezifität der Bindung konnte nach Präinkubation der induzierten Zelllinien mit anti-CD46-Serum jedoch nicht nachgewiesen werden. Mit Werten von 3,0% und 1,2% wurde keine Reduktion festgestellt. Die Werte stellen Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten dar. Die Fehlerbalken geben den jeweils niedrigsten und höchsten gemessenen Wert an.

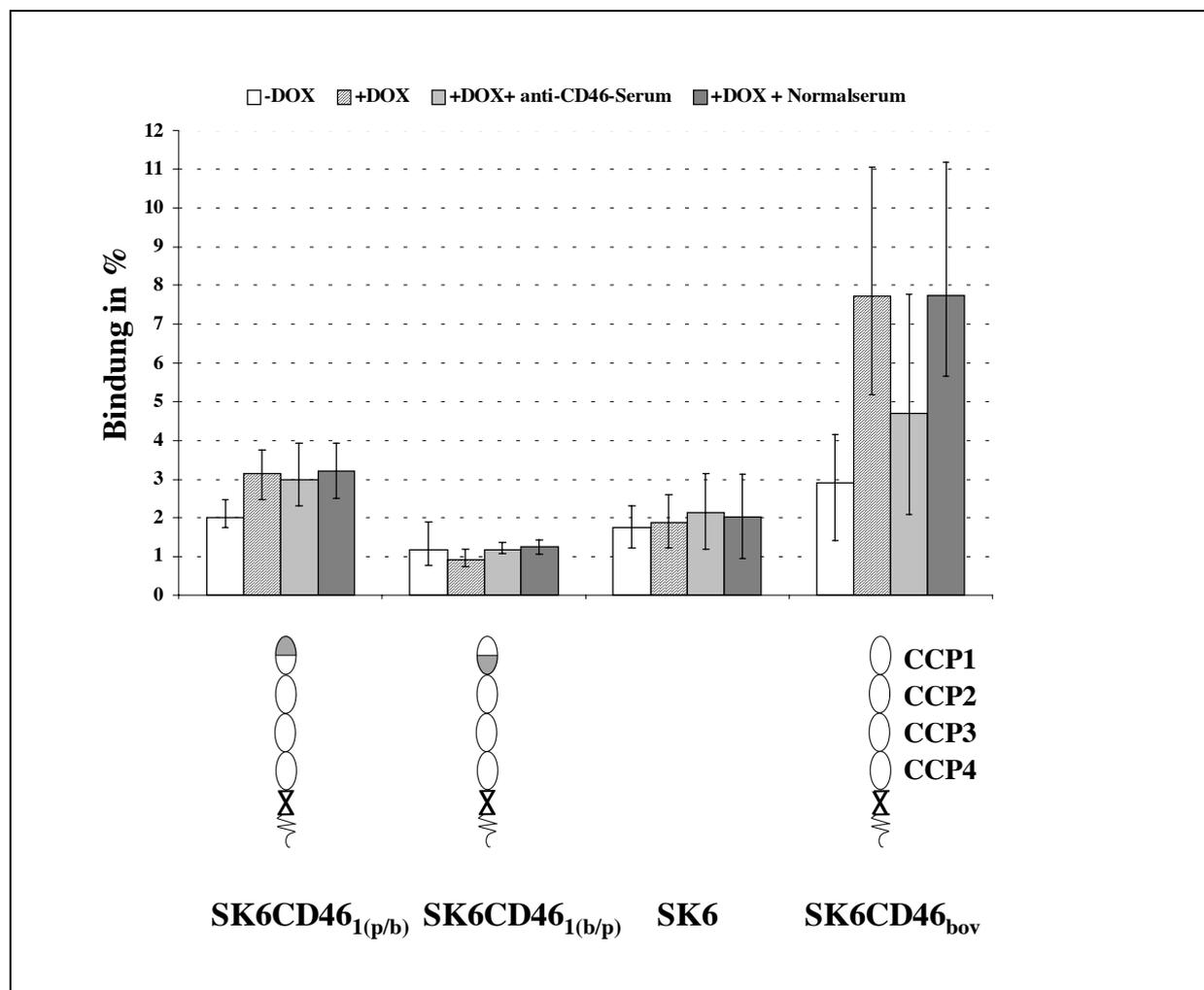


Abb.17: Bindung von [³H] markiertem BVDV an CD46_{1(p/b)} und CD46_{1(b/p)}

Im standardisierten Bindungsassay wurden die nicht induzierten und induzierten Zelllinien SK6CD46_{1(p/b)}, SK6CD46_{1(b/p)}, SK6CD46_{bov} und SK6 1h bei 4°C mit markiertem Virus inkubiert. Die Zelllinien wurden jeweils nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum und Präimmunsrum (Normalserum) auf Bindung getestet. Für SK6CD46_{1(p/b)} und SK6CD46_{1(b/p)} konnte keine spezifische Bindung festgestellt werden, während für die Positivkontrolle SK6CD46_{bov} nach Induktion ein spezifischer Bindungswert von 7,7% ermittelt wurde.

3.1.5.3 Empfänglichkeit von CD46_{1(p/b)} und CD46_{1(b/p)} für BVDV

Im Bindungsassay konnte für die beiden Zelllinien SK6CD46_{1(p/b)} und SK6CD46_{1(b/p)} keine spezifische Bindung an markiertes BVDV NADL festgestellt werden. In dem folgenden zweiten funktionellen Experiment sollte analysiert werden, in welchem Maße diese Zelllinien von BVDV infiziert werden können.

Für die nicht induzierten Zelllinien SK6CD46_{1(p/b)} und SK6CD46_{1(b/p)} wurden im standardisierten „Empfänglichkeitsnachweis“ für BVDV Werte von 1,4% und 0,9% ermittelt (Abb.18). Diese lagen im Bereich der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, von 1,2%. Der Wert der nicht induzierten Positivkontrolle, SK6CD46_{bov}, wurde als Standard auf 100% festgelegt, nach Induktion erfolgte eine Reduktion des Wertes auf 32,8%.

Die induzierten Zelllinien wiesen eine Empfänglichkeit von 143,1% für SK6CD46_{1(p/b)} und von 0,04% für SK6CD46_{1(b/p)} auf.

SK6CD46_{1(p/b)} zeigte zwar nur marginale Bindung, aber die Empfänglichkeit wurde erheblich gesteigert. Hierbei fiel auf, dass diese Steigerung nur nach Induktion erfolgte.

Die Ergebnisse zeigen, dass die C-terminale Hälfte der Aminosäuresequenz von bovinem CCP1 zur Erhöhung der Empfänglichkeit für BVDV und für die Funktionalität des Virusrezeptors notwendig ist.

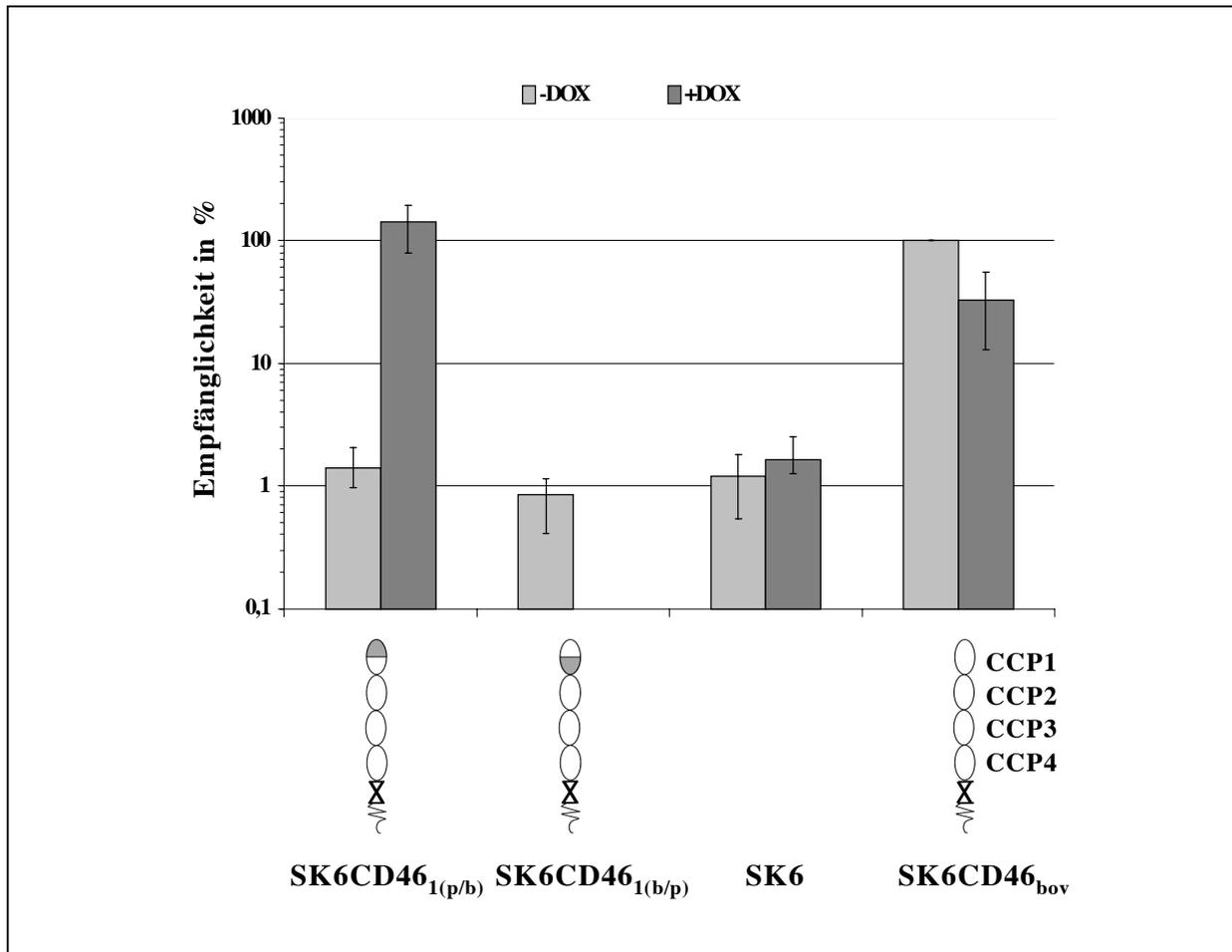


Abb.18: Empfänglichkeit der SK6CD46_{1(p/b)} und SK6CD46_{1(b/p)} Zelllinien für BVDV

Für den Nachweis der Empfänglichkeit wurden jeweils 10^6 Zellen von SK6CD46_{1(p/b)}, SK6CD46_{1(b/p)}, SK6CD46_{bov} und SK6-Zellen nicht induziert und induziert 1h bei 37°C mit BVDV mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit den mAk D5 und Code 4. Die nicht induzierten SK6CD46_{bov} wurden als Standardwert auf 100% festgelegt. Nach erfolgter Induktion wurde für SK6CD46_{1(p/b)} eine Empfänglichkeit von 143,1% und für SK6CD46_{1(b/p)} von 0,04% ermittelt. Der Wert von 0,04% ist für die Darstellung in diesem Diagramm zu niedrig.

3.1.5.4 Funktionelle Untersuchung von CD46_{bov} durch Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von CCP1

Durch die beschriebenen Zelllinien SK6CD46_{1(p/b)} und SK6CD46_{1(b/p)} konnte die für die Infektion mit BVDV relevante Region im CD46_{bov} Molekül weiter auf die C-terminale Hälfte der Aminosäuresequenz in CCP1 eingengt werden. In der C-terminalen Hälfte sind 17 der 30 Aminosäuren konserviert (Abb.16). Durch Mutation der nicht konservierten 13 Aminosäuren sollte die Bindungsdomäne weiter eingengt werden.

Mit Hilfe der „Quik Change“ PCR Methode wurden die Aminosäuren bov.H₃₁L₃₂ durch porz.R₃₁P₃₂, bov.V₃₇T₃₈ durch porz.M₃₇V₃₈; bov.G₄₀QVLAL₄₅ durch porz.A₄₀LPTES₄₅, bov.N₅₀ in porz.D₅₀ und schließlich noch bov.P₅₅ durch porz.S₅₅ ersetzt. Der Austausch der sechs aufeinanderfolgenden Kodons erfolgte anhand zweier nacheinander geschalteter „Quik Change“ PCR Ansätze, bei denen je drei Kodons ausgetauscht wurden. Die anderen vier Austausche konnten mit Hilfe einer „Quik Change“ PCR durchgeführt werden. Insgesamt wurden fünf CD46-Konstrukte hergestellt, die jeweils einen dieser Aminosäureaustausche enthielten. Diese Konstrukte führten nach Transfektion und Selektion in SK6-Zellen zu folgenden Zelllinien: SK6CD46_{R31P32}, SK6CD46_{M37V38}, SK6CD46_{A40LPTES45}, SK6CD46_{D50} und SK6CD46_{S55}.

3.1.5.5 Bindung von [³H] markiertem BVDV an CD46_{bov}, das einzelne Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von CCP1 enthält

Die etablierten Zelllinien wurden wiederum im standardisierten Bindungsassay auf Bindung von BVDV untersucht. Während die Positivkontrolle, SK6CD46_{bov}, Bindung von 9,3% zeigte, wurden für SK6CD46_{R31P32}, und SK6CD46_{M37V38} nach Induktion Bindungswerte von 6,0% und 7,2% gemessen, die durch Präinkubation von anti-CD46-Serum hemmbar waren (2,6% und 4,1%) (Abb.19). Für die Zelllinien SK6CD46_{D50} und SK6CD46_{S55} wurde nach Induktion eine spezifische Bindung von 11,7% und 10,6% festgestellt. Nach Präinkubation der induzierten Zelllinien mit anti-CD46-Serum wurden Bindungswerte von 7,9% und 6,4% erreicht.

Auffällig war das Ergebnis der Zelllinie SK6CD46_{A40LPTES45}. Hier wurde nach Induktion ein Bindungswert von 1,2% ermittelt, der unter dem Wert der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, von 2,2% lag.

Es zeigte sich also, dass die Aminosäuren H₃₁L₃₂, V₃₇T₃₈, N₅₀ und P₅₅ keinen oder nur einen geringen Anteil an der Bindung von BVDV haben. Dagegen sind die Aminosäuren G₄₀QVLAL₄₅ ziemlich sicher an der Bindung beteiligt, da der Austausch in die Aminosäuren A₄₀LPTES₄₅ zu einem vollständigen Verlust der Bindung führte.

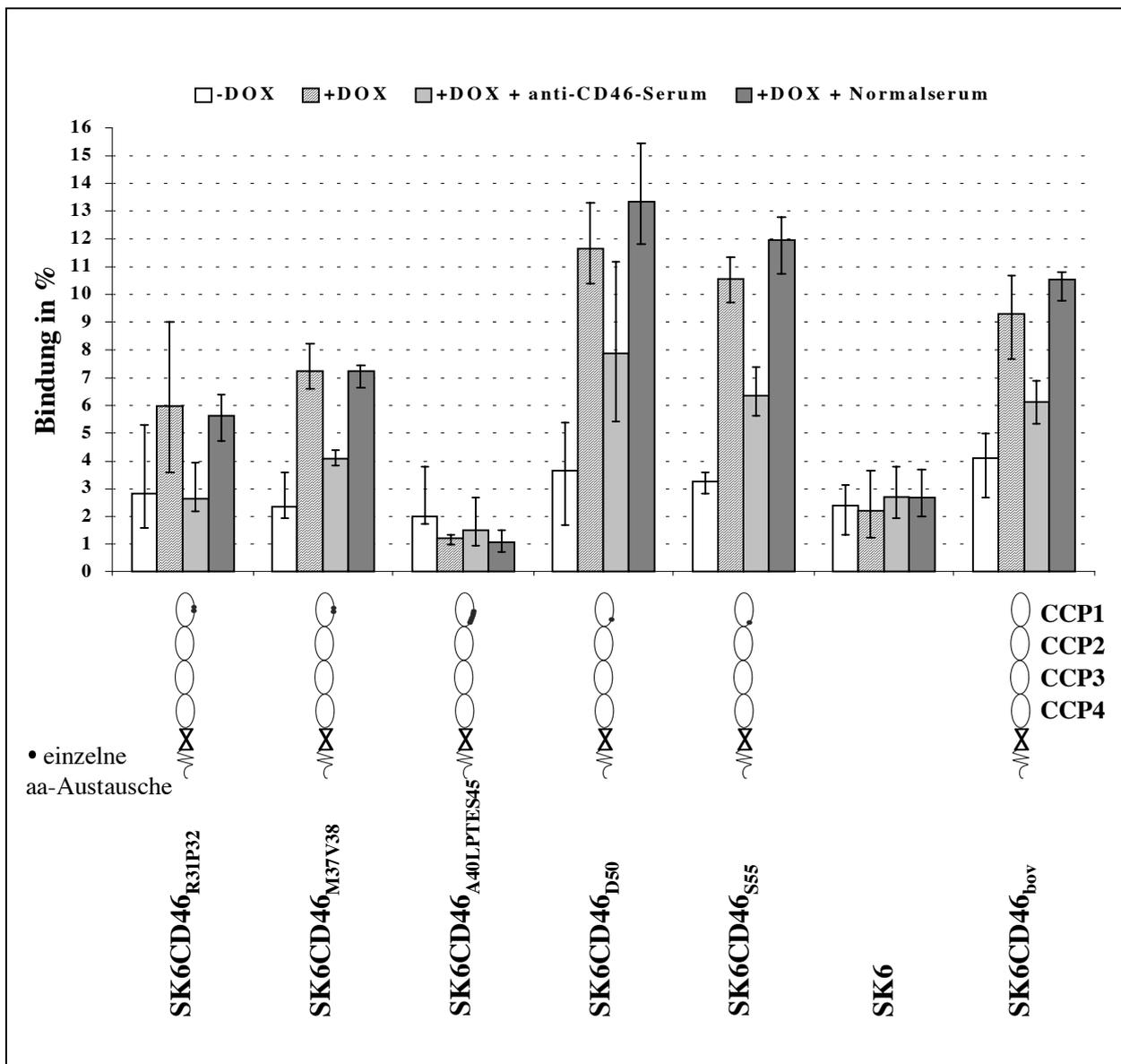


Abb.19: Bindung von $[^3\text{H}]$ -markiertem BVDV an CD46_{bov} mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der C-terminalen Hälfte von CCP1.

Im standardisierten Bindungsassay wurden die nicht induzierten und induzierten Zelllinien SK6CD46_{R31P32}, SK6CD46_{M37V38}, SK6CD46_{A40LPTES45}, SK6CD46_{D50}, SK6CD46_{S55}, SK6CD46_{bov} und SK6 1h bei 4°C mit markiertem Virus inkubiert. Die Zellen wurden jeweils nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum und Präimmunsrum (Normalserum) auf Bindung getestet. Für SK6CD46_{A40LPTES45} konnte keine spezifische Bindung ermittelt werden, während für SK6CD46_{R31P32}, SK6CD46_{M37V38}, SK6CD46_{D50} und SK6CD46_{S55}, spezifische Bindungswerte von 5,6%, 7,2%, 11,7% und 10,6% festgestellt wurden. SK6CD46_{bov}, die Positivkontrolle, erreichte eine spezifische Bindung von 9,3%. Die Werte stellen Mittelwerte aus jeweils 3 Experimenten dar. Die Fehlerbalken geben den jeweils niedrigsten und höchsten Wert an.

3.1.5.6 Empfänglichkeit von CD46_{bov} mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der C-terminalen Hälfte von CCP1 für BVDV

Nachdem im Bindungsassay für vier der fünf Zelllinien eine spezifische Bindung an BVDV NADL ermittelt wurde, sollte nun im zweiten funktionellen Experiment der Einfluss der einzelnen Aminosäureaustausche auf die Empfänglichkeit der Zellen für das Virus festgestellt werden. Hierzu wurden die Zelllinien im standardisierten „Empfänglichkeitsnachweis“ getestet. Für CD46_{R31P32}, CD46_{M37V38}, CD46_{D50} und CD46_{S55} wurden ohne Induktion Empfänglichkeitswerte von 10,8%, 93,3%, 38,4% und 23,6% nachgewiesen (Abb.20). Sie zeigten eine deutliche Steigerung der Empfänglichkeit für BVDV, wohingegen für die nicht induzierte Negativkontrolle, die SK6-Zellen, nur ein Wert von 1,0% festgestellt wurde.

Nach Induktion wurden für diese vier Zelllinien Empfänglichkeitswerte von 24,2%, 7,3%, 64,0% und 29,3% ermittelt.

Für CD46_{R31P32}, CD46_{M37V38}, CD46_{D50} und CD46_{S55} wurde festgestellt, dass sie sowohl im nicht induzierten als auch im induzierten Zustand zu einer Steigerung der Empfänglichkeit führten.

CD46_{A40LPTES45} wies mit 0,3% ohne Induktion und 0,1% nach erfolgter Induktion eine Empfänglichkeit für BVDV auf, die unterhalb der Empfänglichkeit der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, lag. Dieses Ergebnis weist eine Parallele zu der gemessenen Empfänglichkeit der Austauschmutante CD46_{p1} auf. Für die Zelllinie SK6CD46_{p1} wurde nach Induktion eine deutliche Reduktion der Empfänglichkeit auf 0,03% festgestellt.

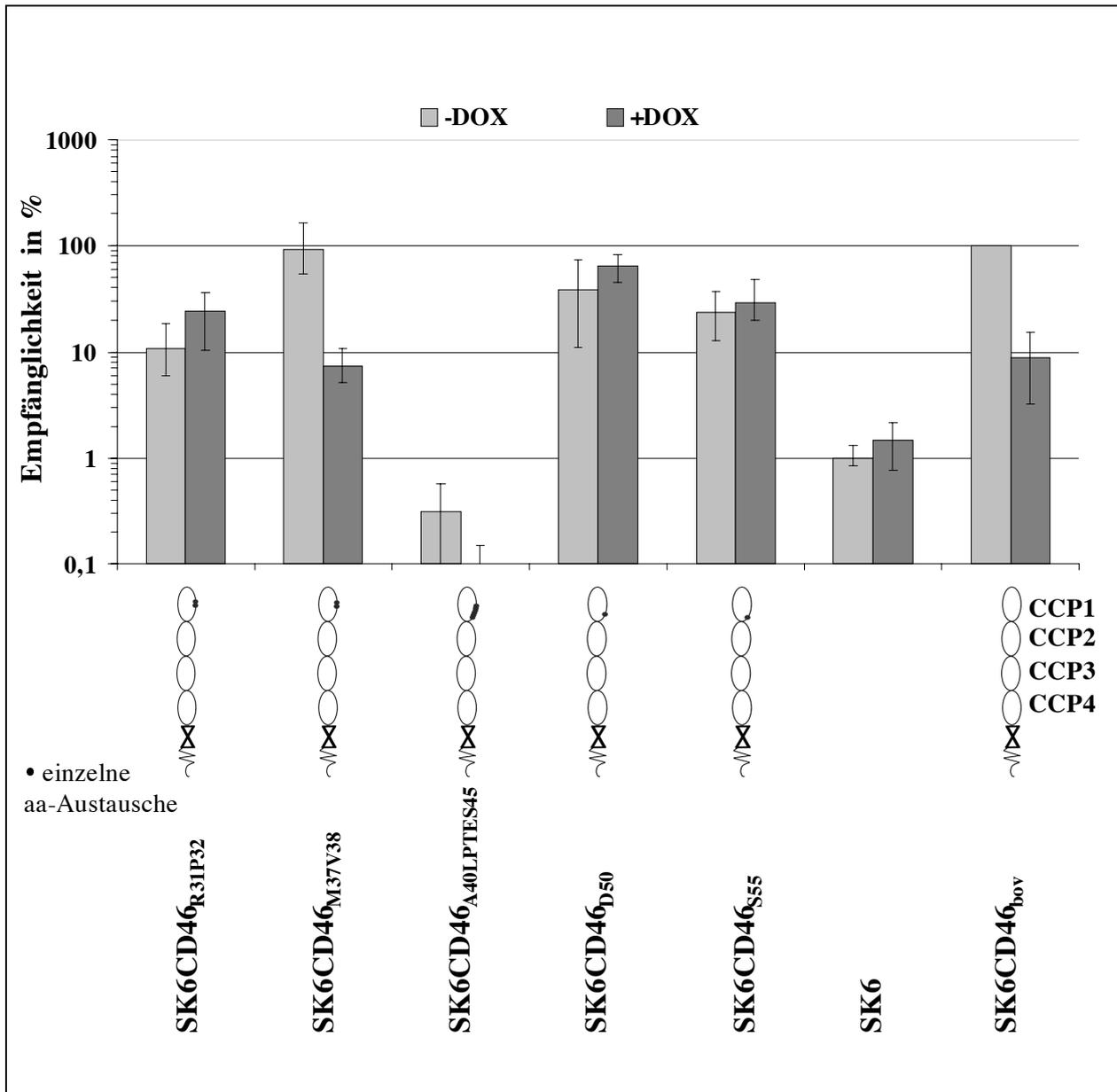


Abb.20: Empfänglichkeit von CD46_{bov} mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der 2. Hälfte von CCP1 für BVDV.

Für den Nachweis der Empfänglichkeit wurden jeweils 10^6 Zellen von SK6CD46_{R31P32}, SK6CD46_{M37V38}, SK6CD46_{A40LPES45}, SK6CD46_{D50}, SK6CD46_{S55}, SK6CD46_{bov} und von SK6-Zellen nicht induziert und induziert 1h bei 37°C mit BVDV mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit den mAk D5 und Code 4. Die nicht induzierten SK6CD46_{bov} wurden als Standardwert auf 100% festgelegt. Für die Zelllinie SK6CD46_{A40LPES45} wurde mit 0,3% ohne Induktion und 0,1% nach erfolgter Induktion die geringste Empfänglichkeit für BVDV festgestellt. Für SK6CD46_{R31P32}, SK6CD46_{M37V38}, SK6CD46_{D50} und SK6CD46_{S55} wurde ermittelt, dass sie sowohl im nicht induzierten als auch im induzierten Zustand zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber der Negativkontrolle führten.

3.1.5.7 Funktionelle Untersuchung von CD46_{p1} und CD46_{porz} durch Aminosäureaustausche in der C-terminalen Hälfte von CCP1

Anhand der Etablierung der Zelllinien mit den Aminosäureaustauschen von CD46_{bov} konnte die für Bindung und Empfänglichkeit relevante Aminosäuresequenz in der C-terminalen Hälfte von bovinem CCP1 weiter eingeeignet werden. Die Aminosäuresequenz G₄₀QVLAL₄₅ scheint eine besondere Bedeutung für die Bindung und Empfänglichkeit von BVDV zu haben, denn der Austausch zu A₄₀LPTES₄₅ führte zu einem vollständigen Verlust der Bindung und Empfänglichkeit.

Um festzustellen, ob die Aminosäuren G₄₀QVLAL₄₅ tatsächlich für die Virusbindung verantwortlich waren, war es notwendig, den reziproken Austausch vorzunehmen, also die bovinen Aminosäuren G₄₀QVLAL₄₅ in CD46_{porz} einzufügen. Hierzu wurden als Ausgangszelllinien SK6CD46_{p1} und die SK6 Tet on Zelllinie, die CD46_{porz} exprimiert (SK6 porz.CD46), ausgewählt. Beide Zelllinien zeigten weder im standardisierten Bindungsassay noch im „Empfänglichkeitsnachweis“ eine Rezeptorfunktion für BVDV. In diesen Zelllinien wurden nun über zwei hintereinander geschaltete „Quik Change“ PCR die porzinen Aminosäuren A₄₀LPTES₄₅ durch die bovinen Aminosäuren G₄₀QVLAL₄₅ ersetzt und somit die Zelllinien SK6CD46_{p1(G40QVLAL45)} und SK6 porz.CD46_(G40QVLAL45) etabliert.

3.1.5.8 Bindung von [³H] markiertem BVDV an CD46_{p1(G40QVLAL45)} und porz.CD46_(G40QVLAL45)

Die Zelllinien SK6CD46_{p1(40GQVLAL45)} und SK6 porz.CD46_(40GQVLAL45) wurden im standardisierten Bindungsassay auf Bindung von BVDV untersucht. Es wurden nach Induktion der Zelllinien Bindungswerte von 1,3% und 1,6% ermittelt, die unter dem Wert der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, von 2,6% lagen (Abb.21). Die Präinkubation mit anti-CD46-Serum oder mit Präimmunserum (Normalserum) wies keinen Einfluss auf die Bindungswerte der beiden Zelllinien auf.

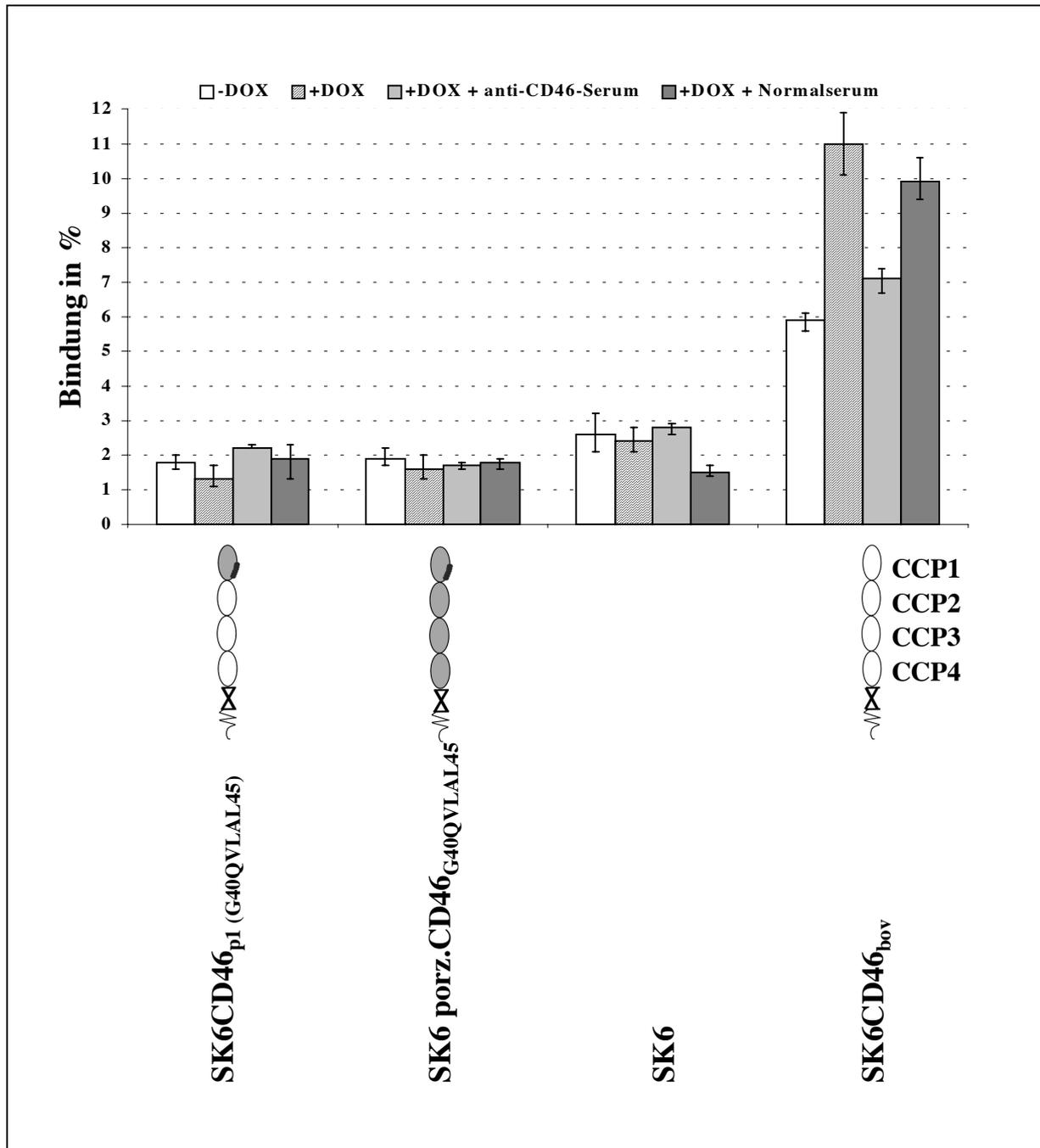


Abb.21: Bindung von [³H] markiertem BVDV an CD46_{p1}(G40QVLAL45) und porc. CD46_(G40QVLAL45)

Im standardisierten Bindungsassay wurden die nicht induzierten und induzierten Zelllinien SK6CD46_{p1}(G40QVLAL45), SK6 porc. CD46_(G40QVLAL45), SK6CD46_{bov} und SK6 1h bei 4°C mit markiertem Virus inkubiert. Die Zelllinien wurden jeweils nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum und Präimmunsrum (Normalserum) auf Bindung getestet. Für die beiden Zelllinien konnte keine spezifische Bindung festgestellt werden. SK6CD46_{bov} erzielte nach Induktion einen spezifischen Bindungswert von 11,0%, der sich durch Präinkubation mit anti-CD46-Serum auf 7,1% reduzierte.

3.1.5.9 Empfänglichkeit von CD46_{p1(40QVLAL45)} und porz.CD46_(40QVLAL45) für BVDV

Nachdem für die Zelllinien SK6CD46_{p1(G40QVLAL45)} und SK6 porz.CD46_(G40QVLAL45) im Bindungsassay keine spezifische Bindung festgestellt werden konnten, sollten sie auf ihre Empfänglichkeit für BVDV untersucht werden. Hierzu wurden 10^6 Zellen der Zelllinien im standardisierten „Empfänglichkeitsnachweis“ mit BVDV mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert (Abb.22).

Weder für SK6CD46_{p1(G40QVLAL45)} noch für SK6 porz.CD46_(G40QVLAL45) konnte eine erhöhte Empfänglichkeit festgestellt werden. Die nicht induzierten Zelllinien erzielten Werte von 4,9% und 4,3%, nach Induktion wurden Werte von 0,9% und 0,04% ermittelt. Sie blieben somit unter den Werten der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, von 8,3% und 8,4%.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der Austausch der Aminosäuren G₄₀QVLAL₄₅ im bovinen CCP1 zwar zum Verlust der Rezeptorfunktion („loss of function“) führte, der reziproke Austausch aber nicht zum Erwerb der Rezeptorfunktion („gain of function“).

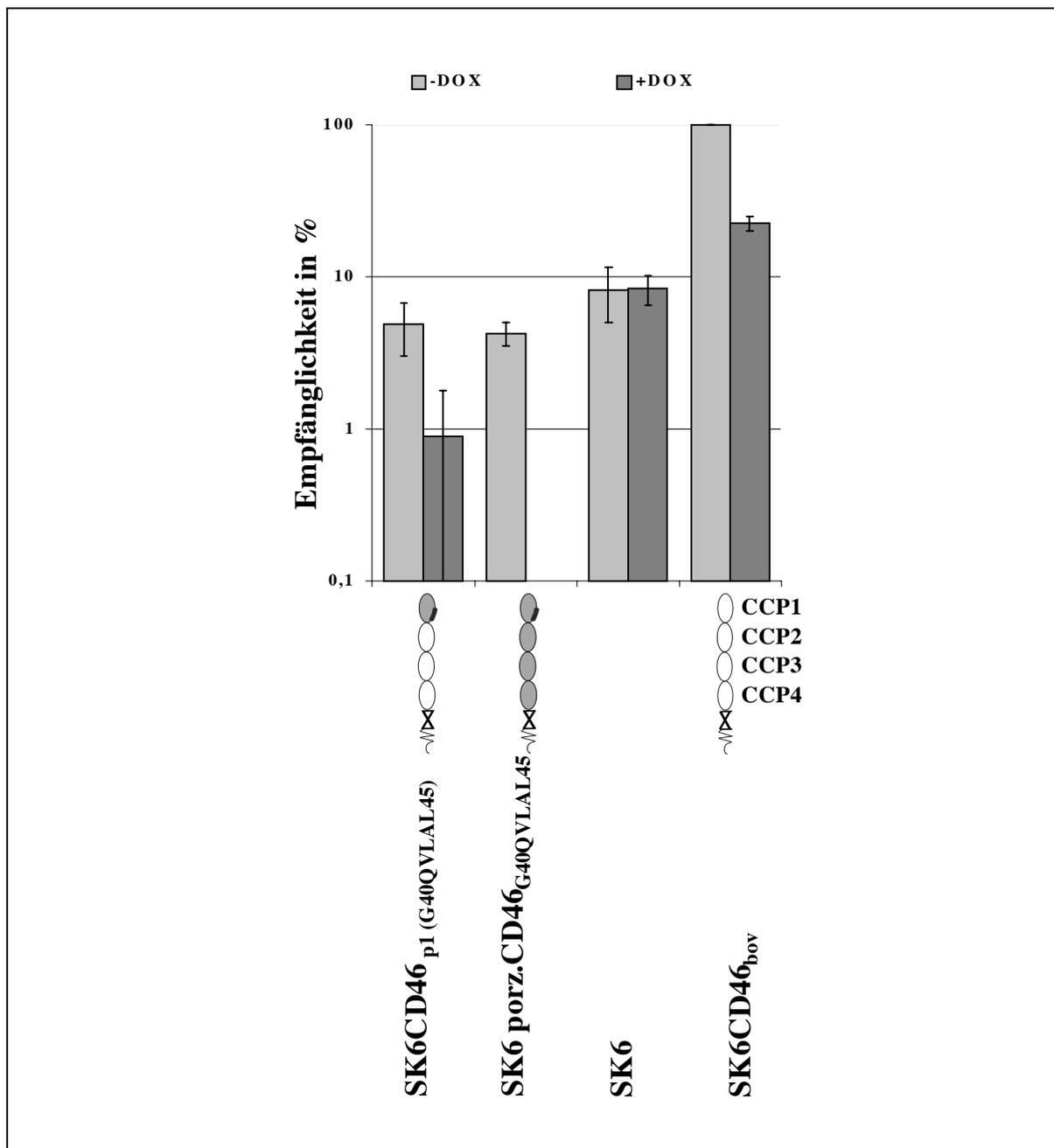


Abb.22: Empfänglichkeit von CD46_{p1(G40QVLAL45)} und porz.CD46_(G40QVLAL45) für BVDV

Für den Nachweis der Empfänglichkeit wurden jeweils 10^6 Zellen von SK6CD46_{p1(G40QVLAL45)}, SK6 porz.CD46_(G40QVLAL45), SK6CD46_{bov} und von SK6-Zellen nicht induziert und induziert 1h bei 37°C mit BVDV mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit den mAk D5 und Code 4. Die nicht induzierten SK6CD46_{bov} wurden als Standardwert auf 100% festgelegt. Für SK6CD46_{p1(G40QVLAL45)} und SK6 porz.CD46_(G40QVLAL45) wurden ohne Induktion Empfänglichkeitswerte von 4,9% und 4,3% ermittelt, die nach Induktion auf Werte von 0,9% und 0,04% reduziert wurden.

3.1.5.10 Funktionelle Untersuchung von CD46_{bov} durch CCP1-Positionsmutanten

Die bisherigen Versuche hatten zum Ziel, die Bindungsdomäne im CD46_{bov} zu identifizieren. Zwar gelang der Nachweis, dass CCP1 sehr wesentlich für die Bindung ist, jedoch sind weitere Anforderungen an CD46_{bov} nötig um Virus zu binden.

Die Deletionsmutanten von CD46_{bov} hatten den Hinweis gegeben, dass die Größe des CD46 Moleküls für die Aufrechterhaltung der Rezeptorfunktion eine wichtige Rolle spielt. Daher sollte im weiteren die Position von CCP1 im CD46 Molekül untersucht werden.

Um abzuklären, ob für CD46_{bov} nach Änderung der Reihenfolge der CCP-Domänen die Funktion als zellulärer Rezeptor für BVDV aufrechterhalten wird, wurde die Zelllinie SK6CD46_{2,1,3,4} konstruiert. Hierfür wurde SK6CD46_{Δ2} als Ausgangsprodukt verwendet und die Position von CCP1 und CCP2 getauscht.

Um die Rolle der Position von bovinem CCP1 im CD46 Molekül näher zu charakterisieren, galt es abzuklären, welchen Einfluss ein zusätzliches, N-terminal gelegenes CCP Modul ausübt. Hierbei sollte weiterhin berücksichtigt werden, dass das zusätzliche CCP Modul keine Bindung von BVDV aufwies. Dementsprechend wurde die Zelllinie SK6CD46_{+1p} etabliert, bei der das CD46_{bov} Molekül N-terminal um das porcine CCP1-Modul erweitert wurde.

Mit den Ergebnissen der Deletionsmutanten von CD46_{bov} wurde verdeutlicht, dass sobald das CD46_{bov} um eine CCP-Domäne verkürzt wird, die Funktion als zellulärer Rezeptor für BVDV nicht mehr aufrechterhalten wird. Mit der Etablierung weiterer CD46-Konstrukte sollte abgeklärt werden, welchen Einfluss zusätzlich eingebaute CCP Module im CD46_{bov} ausüben. Für humanes CD46 wurde eine Länge von 100Å bestimmt (Barlow et al., 1993), eine Verlängerung des Proteins auf 120Å führte zwar zu einer stärkeren Bindung von Masernvirus, die Fusionseffizienz wurde jedoch deutlich vermindert. Mit der Etablierung sogenannter „Hybrid-Rezeptoren“, die aus einer unterschiedlichen Anzahl und Kombination der CCP-Domänen von humanem CD46 und der immunglobulin-ähnlichen Domäne CD4 bestanden, konnte für Masernvirus festgestellt werden, dass neben der Anwesenheit von CCP1 und CCP2 die Länge des humanen CD46 eine wichtige Rolle für die Virusbindung und Infektion spielt (Buchholz et al., 1996). Um den Einfluss der Vergrößerung des CD46_{bov} Moleküls auf die Rezeptorfunktion für BVDV zu untersuchen, wurden zwei Zelllinien konstruiert.

Die Zelllinie SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} enthält fünf CCP Module, wobei das bovine CCP1-Modul an N-terminaler Position zu liegen kam. Die bovine CCP2-Domäne wurde hierbei durch porcines CCP1 und CCP2 ersetzt und somit das gesamte CD46 Molekül um eine CCP-Domäne verlängert. Der Einbau von porcinem CCP1 und CCP2 führte nicht nur zu einer Verlängerung

des CD46 Moleküls um ein CCP Modul, sondern vergrößerte zusätzlich den Abstand zwischen bovinem CCP1 und der Zelloberfläche.

Hingegen besteht die Zelllinie SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4} aus sechs CCP Modulen, wobei bovines CCP1 und CCP2 an N-terminaler Position im CD46 Molekül präsentiert werden. Porzines CCP1 und CCP2 wurden zwischen die bovinen CCP2 und CCP3-Domänen konstruiert und das CD46_{bov} Molekül wurde folglich um zwei CCP Module verlängert. Zusätzlich vergrößerte sich der Abstand von bovinem CCP1 zur Zelloberfläche um zwei CCP Module.

3.1.5.11 Western Blot Analyse der CCP1-Positionsmutanten

Zum Nachweis der Proteinexpression und Analyse der exprimierten Menge der CCP1-Positionsmutanten, wurden jeweils zwei Zellklone desselben Konstrukts mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht (Abb.23). Die Zelllinien wurden in dieser Analyse getestet, bevor sie in den funktionellen Experimenten eingesetzt wurden. SK6 porz.CD46_{b1}, SK6CD46_{2,1,3,4}, SK6CD46_{+p1}, SK6CD46_{1,p1+p2,3,4}, und SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4} zeigten bereits ohne Induktion eine nachweisbare Expression des Proteins. Dieses Expressionsverhalten wurde, wie schon bei den Deletionsmutanten von CD46_{bov} beschrieben, auch für die Positivkontrolle SK6CD46_{bov} festgestellt.

Nach Induktion war eine starke Proteinexpression der CCP1-Positionsmutanten zu erkennen. Die Zelllinie SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} weist trotz Erweiterung des CD46_{bov} Moleküls um ein CCP Modul nur ein geringgradig größeres Molekulargewicht auf, als die Positivkontrolle SK6CD46_{bov} mit ca. 58kDa. Hierfür spielt die Verwendung von nicht reduziertem Zelllysate für die Western Blot Analyse und die unterschiedliche Verteilung der N-Glykosylierungsstellen im bovinen und porzinen CD46 eine Rolle. Während im CD46_{bov} vier N-Glykosylierungsstellen davon jeweils eine in CCP1 und CCP4 und zwei in CCP2 vorhanden sind, besitzt CD46_{porz} lediglich zwei N-Glykosylierungsstellen, davon jeweils eine in CCP1 und eine in CCP4. Der Einbau von porzinem CCP1 und CCP2 anstelle von bovinem CCP2 führte demzufolge zu einer Änderung der Anzahl von N-Glykosylierungsstellen im CD46 Molekül.

Für die Etablierung der Zelllinie SK6 porz.CD46_{b1} wurde im CD46_{porz} CCP1 durch bovines CCP1 ersetzt. In den vorherigen Western Blot Analysen wurde für CD46_{porz} mit ca. 69kDa ein etwas größeres, apparentes Molekulargewicht als für CD46_{bov} mit ca. 58kDa festgestellt. Dieser Molekulargewichtsunterschied lässt sich im Sequenzvergleich der bovinen und porzinen CD46 Aminosäuresequenzen durch das Vorhandensein einer deutlich größeren STP-Domäne im Anschluss an das CCP4-Modul von CD46_{porz} erklären (Abb.16). Dadurch

begründet sich das apparente Molekulargewicht der Zelllinie SK6 porz.CD46_{b1}, das mit dem der Zelllinie SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} übereinstimmt, obwohl deren CD46 Molekül ein CCP Modul und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle weniger enthält.

Für die Zelllinie SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4}, die aus sechs CCP Modulen besteht, wurde ein apparentes Molekulargewicht von ca. 75kDa ermittelt. Diese Vergrößerung des Molekulargewichtes lässt sich durch die Anwesenheit zweier zusätzlicher CCP Module und einer weiteren N-Glykosylierungsstelle im CD46 Molekül erklären.

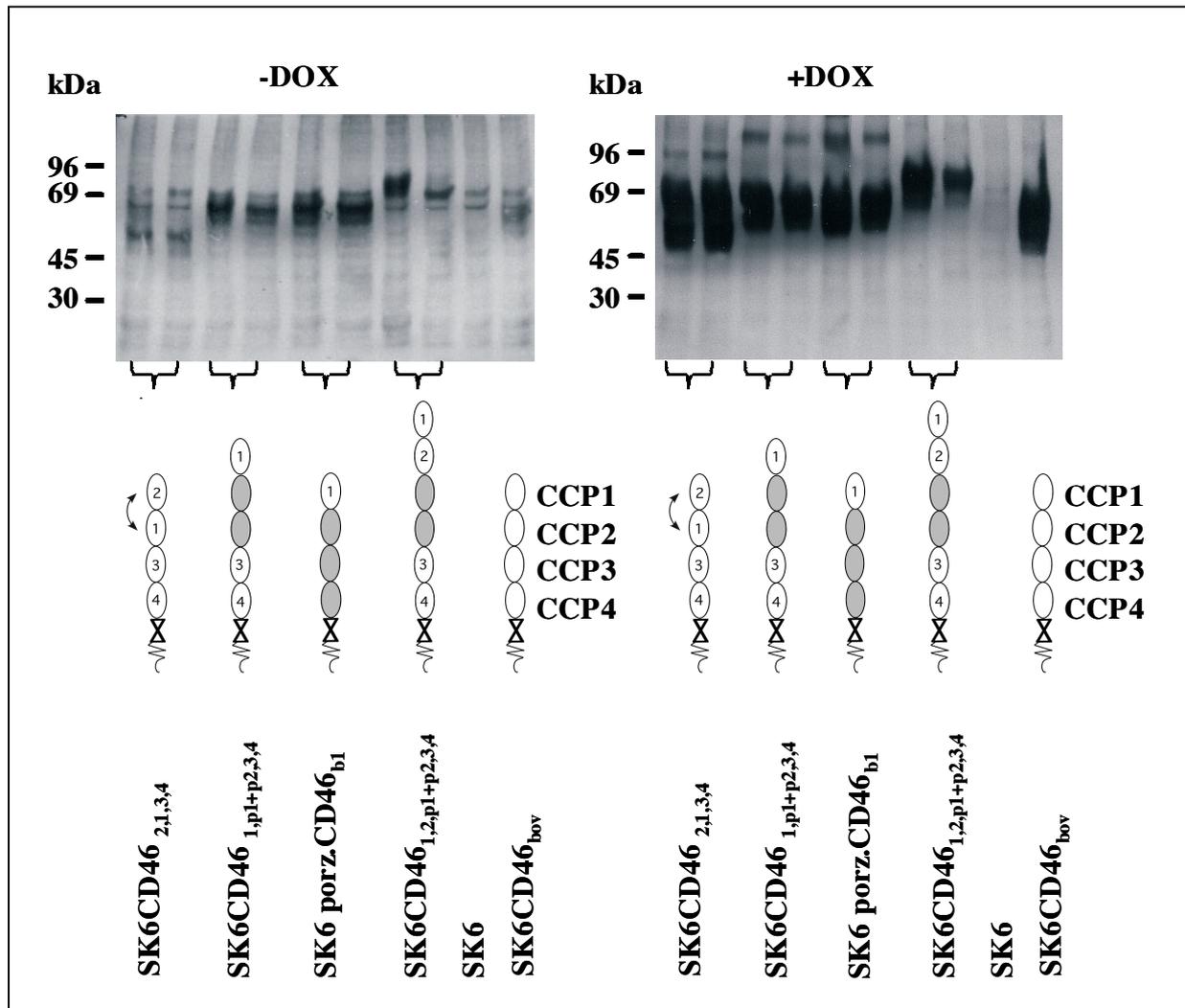


Abb.23: Western Blot Analyse von jeweils zwei Zellklonen der gleichen Zelllinien der CCP1 Positionsmutanten

Die mit und ohne Zugabe von 2mg/ml Doxycyclin für 18h bei 37°C inkubierten Zelllinien wurden lysiert und unter nicht reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen mit anti-CD46-Serum inkubiert. Die Detektion erfolgte über Bindung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörpers und anschließender Chemilumineszenz.

3.1.5.12 Bindung von [³H] markiertem BVDV an CCP1-Positionsmutanten

Anhand der Western Blot Analyse wurde die Proteinexpression der CCP1-Positionsmutanten Zelllinien kontrolliert. Im Bindungsassay wurden die Zelllinien anschließend auf ihre Bindung von [³H] markiertem BVDV NADL untersucht.

Die nach Induktion im Bindungsassay erreichten Bindungswerte von SK6 porz.CD46_{b1}, SK6CD46_{2,1,3,4}, und SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} lagen mit 1,5%, 1,3% und 1,4% unter dem Wert der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, von 1,9% (Abb.24). Die Vorinkubation dieser Zelllinien mit anti-CD46-Serum und Normalserum bewirkte keine Veränderung der Werte. Eine spezifische Bindung von BVDV an diese drei CD46-Konstrukte erfolgte offensichtlich nicht.

Die Zelllinie SK6CD46_{+p1} erreichte nach Induktion einen leicht erhöhten Bindungswert von 2,8%, der sich durch Präinkubation mit anti-CD46-Serum nur leicht verringerte (2,5%).

Lediglich für die Zelllinie SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4} zeigte sich mit einem Wert von 5,8% eindeutig Bindung. Die Präinkubation mit anti-CD46-Serum führte zu einem um 3,0% verringertem Wert und beweist somit die Spezifität der Bindung. Nach Inkubation mit Normalserum wurde keine negative Beeinflussung der Bindung festgestellt, der Wert lag mit 6,8% sogar etwas höher als der Wert der nicht präinkubierten, induzierten Zellen.

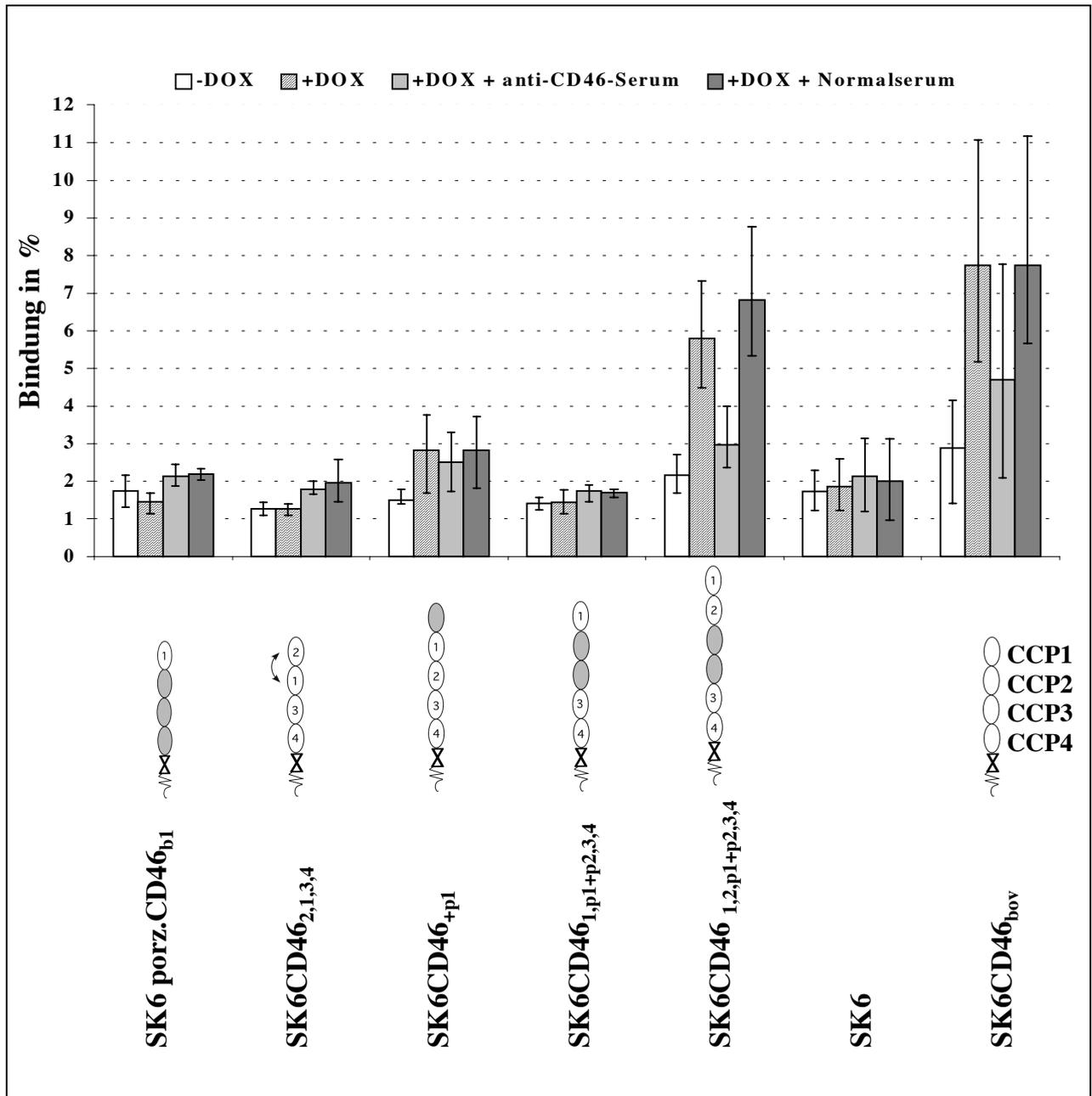


Abb.24: Bindung von [³H] markiertem BVDV an CCP1-Positionsmutanten

Im Bindungsassay wurden die nicht induzierten und induzierten Zelllinien SK6 porz.CD46_{b1}, SK6CD46_{2,1,3,4}, SK6CD46_{+pl}, SK6CD46_{1,p1+p2,3,4}, SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4}, SK6CD46_{bov} und SK6 1h bei 4°C mit markiertem Virus inkubiert. Die Zelllinien wurden jeweils nach Präinkubation mit anti-CD46-Serum und Präimmenserum (Normalserum) auf Bindung getestet.

Lediglich für SK6CD46_{+pl} und SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4} konnten im Bindungsassay nach Induktion spezifische Bindungswerte ermittelt werden. Mit 2,8% und 5,8% erreichten sie nicht den für die Positivkontrolle ermittelten Wert von 7,7%. Bei allen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei Experimenten, die Fehlerbalken geben die jeweils höchsten und niedrigsten gemessenen Werte an.

3.1.5.13 Empfänglichkeit der CCP1-Positionsmutanten für BVDV

Im Bindungsassay konnte für zwei der CCP1-Positionsmutanten Zelllinien eine spezifische Bindung festgestellt werden. In sich hier anschließenden standardisierten „Empfänglichkeitsnachweis“ wurden die Zelllinien auf ihre Empfänglichkeit für BVDV untersucht.

Für SK6 porz.CD46_{b1}, SK6CD46_{2,1,3,4} und SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} wurden ohne Induktion Empfänglichkeitswerte von 0,9%, 1,5% und 1,0% festgestellt (Abb.25). Diese Werte lagen im Bereich der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, für die ein Wert von 1,2% ermittelt wurde. Nach Induktion der Zelllinien wurden Empfänglichkeitswerte von 0,1%, 0,8% und 1,1% festgestellt. Während sich die Werte von SK6CD46_{2,1,3,4} und SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} kaum veränderten, wurde für SK6 porz.CD46_{b1} eine deutliche Reduktion der Empfänglichkeit ermittelt.

SK6CD46_{+p1} erreichte im nicht induzierten Zustand mit 66,5% eine deutlich erhöhte Empfänglichkeit. Die durch Induktion provozierte starke Expression des CD46 Konstrukts führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion des Empfänglichkeitswerts auf 3,9%.

Die Zelllinie SK6CD46_{+p1} vermittelte Daten, die auf eine Beeinträchtigung der Funktion des CD46_{bov} durch den Einbau des porzinen CCP1 vor das bovine CCP1 schließen lassen. Spezifische Bindung und eine Erhöhung der Empfänglichkeit konnten festgestellt werden, blieben jedoch mit ihren Werten deutlich unter denen der Positivkontrolle, SK6CD46_{bov}.

Sehr überraschend war das Verhalten der Zelllinie SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4}. Sie erreichte ohne Induktion einen Empfänglichkeitswert von 5,0%, der nach Induktion auf 293,7% anstieg.

Für die CCP1-Positionsmutanten lässt sich anhand des Bindungsassays und dem Nachweis auf Empfänglichkeit zusammenfassen, dass für SK6 porz.CD46_{b1}, SK6CD46_{2,1,3,4} und SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} weder eine spezifische Bindung noch eine Erhöhung der Empfänglichkeit festgestellt werden konnte. Das bedeutet, dass das bovine CCP1-Modul nicht allein ausreicht, um Bindung und Infektion von BVDV NADL zu vermitteln. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Änderung der Reihenfolge von CCP1 und CCP2 im CD46_{bov} ebenso zu einem Funktionsverlust führte, wie der Einschub von zwei porzinen CCP-Domänen zwischen bovinem CCP1 und CCP3.

Für SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4} konnten trotz Einbau von porzinem CCP1 und CCP2 und der damit stattgefundenen Vergrößerung des Abstandes von bovinem CCP1 zur Zelloberfläche, eine spezifische Bindung und sogar eine deutliche Erhöhung der Empfänglichkeit für BVDV nachgewiesen werden.

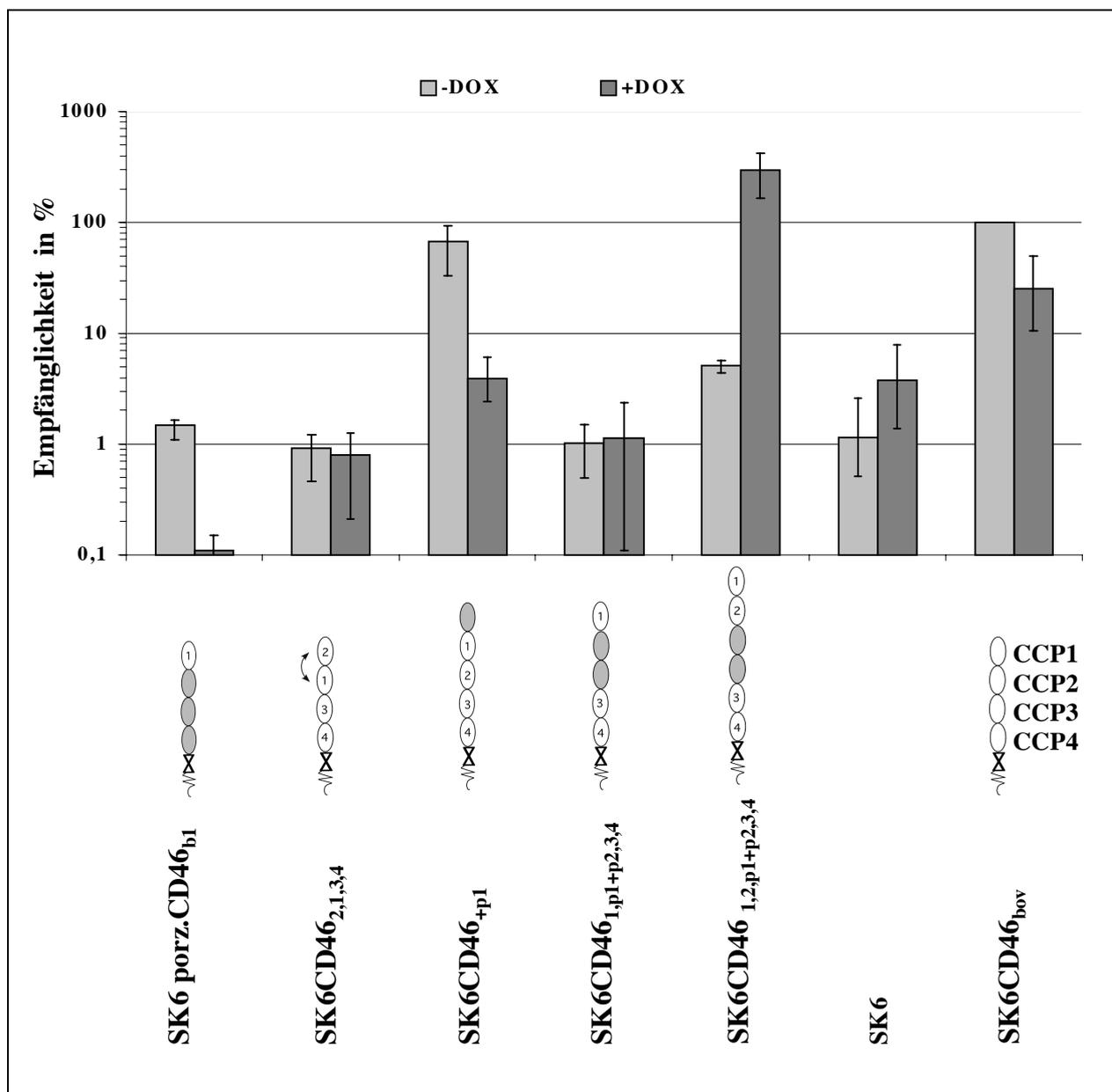


Abb.25: Empfänglichkeit der CCP1-Positionsmutanten für BVDV

Für den Nachweis der Empfänglichkeit wurden 10^6 Zellen von SK6 porz.CD46_{b1}, SK6CD46_{2,1,3,4}, SK6CD46_{+p1}, SK6CD46_{1,p1+p2,3,4}, SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4}, SK6CD46_{bov} und von den SK6-Zellen nicht induziert und induziert 1h bei 37°C mit BVDV mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit den mAk D5 und Code 4. Die Empfänglichkeit der nicht induzierten SK6CD46_{bov} wurde als Standardwert auf 100% festgelegt. SK6CD46_{+p1} erreichte mit 66,5% ohne Induktion eine deutliche Steigerung der Empfänglichkeit gegenüber der Negativkontrolle, den SK6-Zellen, die nach Induktion auf einen Wert von 3,9% gesenkt wurde. Für SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4} wurde erst nach erfolgter Induktion ein deutlicher Anstieg der Empfänglichkeit auf 293,7% festgestellt.

3.2. Identifizierung und Charakterisierung von BVDV Glykoprotein E2 als Bindungspartner für CD46_{bov}

Der Bindungstest mit ³H markiertem BVDV NADL bestätigte nach der bereits festgestellten gesteigerten Empfänglichkeit für CD46_{bov} exprimierende PK15 Zellen (Maurer, Diss. 2002) die Rezeptorfunktion von CD46_{bov}. Durch den Aufbau von Pestiviren, die eine Lipidhülle mit den drei eingelagerten Glykoproteinen E1, E2 und E^{ms} besitzen, kamen für die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor drei Liganden in Frage.

Für das Glykoprotein E1 wird angenommen, dass es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990). Neutralisierende Antikörper werden im Verlaufe einer Infektion mit Pestiviren vorwiegend gegen das Glykoprotein E2 und in geringerem Umfang gegen das Glykoprotein E^{ms}, aber nicht gegen E1 gebildet (Weiland et al., 1992). Im Tierexperiment bewirkte die Immunisierung von Schweinen mit aufgereinigtem E2- und E^{ms}-Protein einen belastbaren Schutz vor der Schweinepest, während das mit E1-Protein nicht gelang (König et al., 1995). Außerdem konnte mit in Insektenzellen synthetisierten, gereinigten E2- und E^{ms}-Glykoproteinen von KSPV eine Inhibition der Pestivirusinfektion in Zellkultur festgestellt werden (Hulst et al., 1997). Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass die BVDV Glykoproteine E2 und E^{ms} als Bindungspartner für CD46_{bov} in Betracht kommen.

Als Nachweismethode wurde ein Zelladsorptionstest etabliert, mit dem Bindung qualitativ festgestellt werden konnte (s.Abb.26). Dieser Zelladsorptionstest wurde mit Glykoprotein E2 bzw. E^{ms} exprimierenden BHK-Zellen (Baby Hamster Kidney, Hamsternierenzellen, „Fängerzellen“) und CD46_{bov} exprimierenden Indikatorzellen, entwickelt. Das BVDV Glykoprotein E2 ist in virusinfizierten Zellen nicht an der Zelloberfläche vorhanden, sondern akkumuliert im endoplasmatischen Retikulum (ER). Um eine Expression des Glykoproteins an der Zelloberfläche zu erreichen, wurde das Glykoprotein E2 mit der C-terminalen Transmembrandomäne und der zytosolischen Domäne des Influenza Virus Proteins Haemagglutinin (Influenza HA) fusioniert und in das pcDNA3 Vektorplasmid kloniert (Zhou et al., 1998). Das pcDNA3 Plasmid enthält neben dem hCMV Promotor einen T7-RNA-Polymerase-Promotor und kann durch die T7 RNA Polymerase abgeschrieben werden. Durch Überinfektion transfizierter Zellen mit einem rekombinanten Vaccinia Virus (MVAT7), das T7 RNA Polymerase synthetisiert, kann eine besonders starke transiente Expression erzielt werden. Die Fängerzellen (BHK-Zellen) wurden 1h bei 37°C mit MVAT7 infiziert und anschließend wurden die Glykoprotein E2 oder Glykoprotein E^{ms} exprimierenden Plasmide in

die Zellen transfiziert. Mit dem MVAT7-System wurde eine Transfektionseffizienz von über 80% erzielt. Als Indikatorzellen wurden 38A₁D (Schweine-Lymphomzellen) verwendet, die das CD46_{bov} stabil exprimieren (38A₁D CD46). Diese Zellen wurden mit Calcein, einem zytoplasmatischen Fluoreszenzfarbstoff, inkubiert. Von den Fängerzellen, die die zu testenden Glykoproteine exprimieren, wurde im Zelladsorptionstest ein konfluenter Zellrasen benötigt, der mit den in Suspension vorhandenen, markierten Indikatorzellen inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen wurde. Die Detektion der Bindung von Indikatorzellen an den Zellrasen erfolgte qualitativ im Fluoreszenzmikroskop.

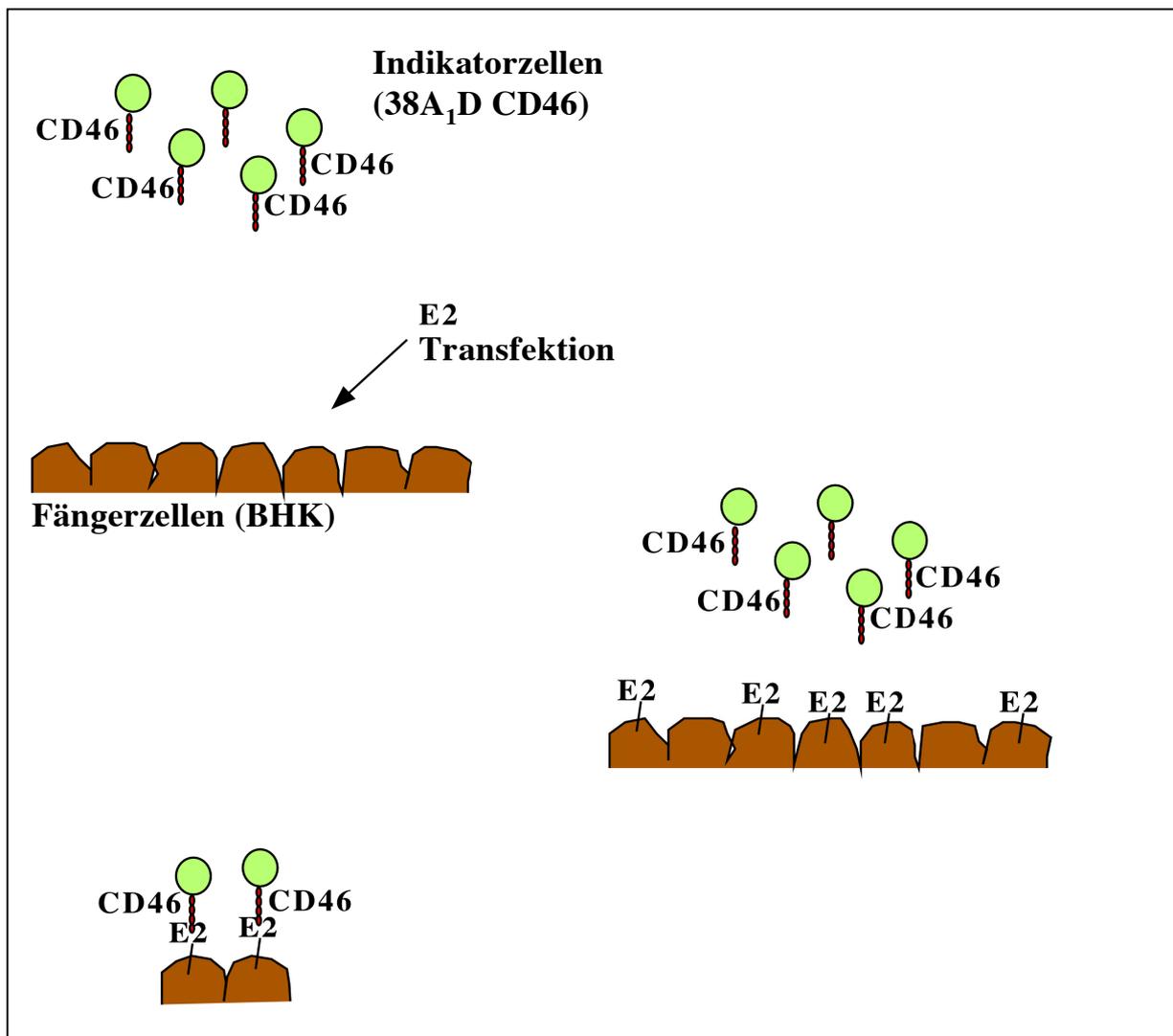


Abb.26: Schema des Zelladsorptionstests

Die Fängerzellen werden mit den für die Bindung an CD46_{bov} in Frage kommenden BVDV Glykoproteinen E2 und E^{ms} exprimierenden Plasmiden transfiziert. Die stabil mit CD46_{bov} transfizierten Indikatorzellen werden metabolisch mit dem zytoplasmatischen Fluoreszenzfarbstoff Calcein 30 Minuten bei 37°C markiert und anschließend bei RT mit dem Fängerzellrasen inkubiert. Die Bindung wird durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Als mögliche Liganden von CD46_{bov} wurden im Zelladsorptionstest das BVDV Glykoprotein E^{rns} (BVDV E^{rns}), das BVDV Glykoprotein E2 (BVDV E2), sowie die analogen Glykoproteine von KSPV (KSPV E^{rns} und KSPV E2) getestet (Abb.27). Von letzteren wurde erwartet, dass keine Bindung erfolgte.

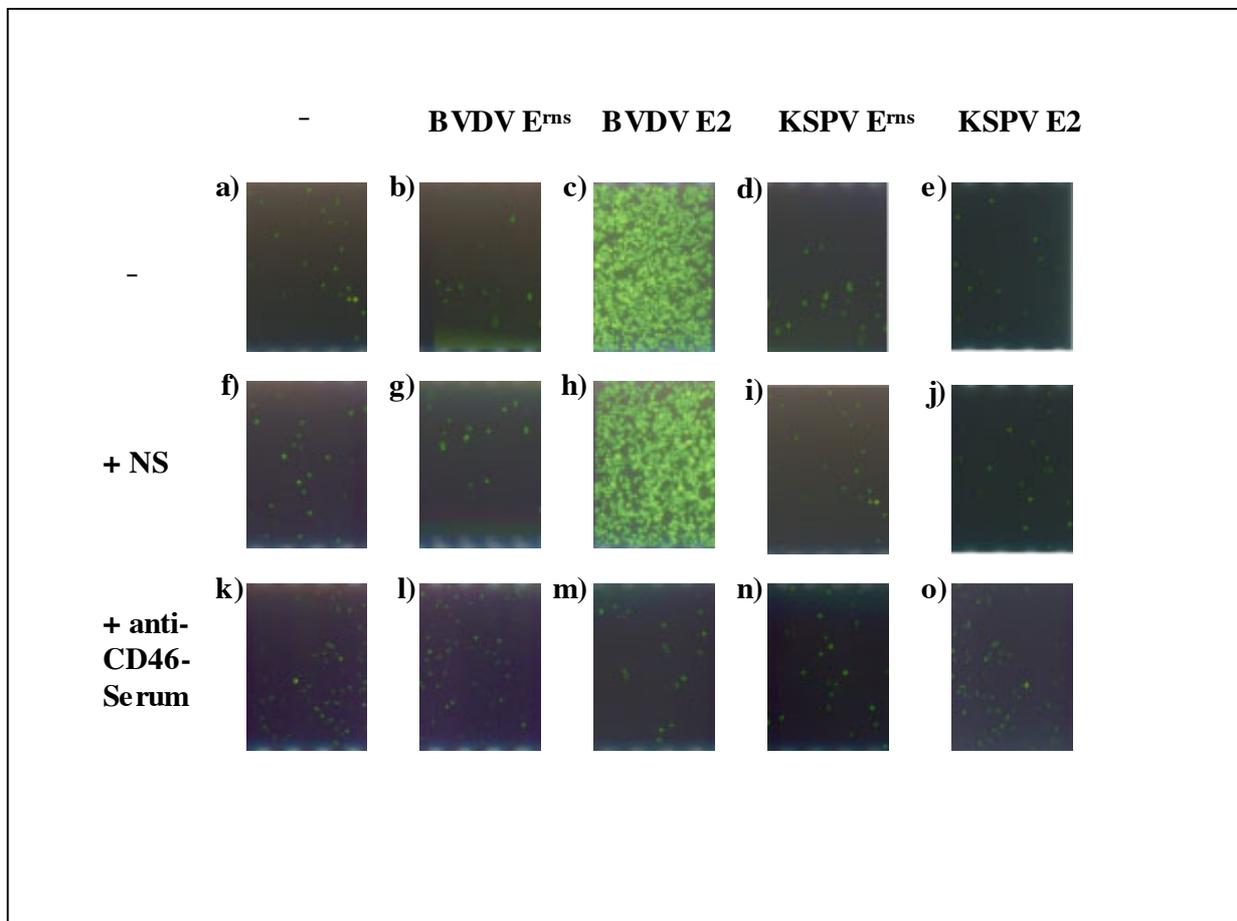


Abb.27: Nachweis der Zelladsorption im Fluoreszenzmikroskop

Im Zelladsorptionstest wurden BHK-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die die Glykoproteine BVDV E^{rns}, BVDV E2, KSPV E^{rns} und KSPV E2 exprimierten. Anschließend wurden diese Zellen mit markierten, CD46_{bov} exprimierenden 38A₁D-Zellen inkubiert und nach mehrmaligem Waschen auf Zelladsorption im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Lediglich die Expression von BVDV E2 führte zu einer Bindung von markierten 38A₁D CD46 Zellen (c). Die Spezifität der Bindung wurde durch Präinkubation der 38A₁D CD46 Zellen mit anti-CD46 Serum und der dadurch erfolgten Bindungshemmung erwiesen (m). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Normals serum (+NS) präinkubiert.

Im Zelladsorptionstest wurde ausschließlich bei den BVDV Glykoprotein E2 (BVDV E2) exprimierenden BHK-Zellen eine Bindung unzähliger, markierter CD46_{bov} exprimierender Zellen (38A₁D CD46) an den Zellrasen festgestellt. (Abb.27/c). Die Präinkubation der BHK-Zellen mit Präimmenserum (Normalserum) beeinflusste dieses positive Ergebnis nicht (Abb.27/h). Hingegen wurde nach Präinkubation mit anti-CD46 Serum und für die BHK-Zellen, die BVDV Glykoprotein E^{rns} (BVDV E^{rns}), KSPV Glykoprotein E2 (KSPV E2) und KSPV Glykoprotein E^{rns} (KSPV E^{rns}) exprimieren, nur eine Bindung vereinzelter, markierter Indikatorzellen (38A₁D CD46) nachgewiesen.

3.2.1 Charakterisierung der Bindungsdomäne im BVDV Glykoprotein E2

3.2.1.1 Etablierung von Glykoprotein E2-Chimären

Nachdem die Ergebnisse des Zelladsorptionstests die Vermutung bestätigt hatten, dass das Glykoprotein E2 von BVDV als Ligand an CD46_{bov} bindet, sollte auch hier die CD46 Bindungsdomäne von Glykoprotein E2 bestimmt werden. Dies sollte methodisch in ähnlicher Weise, wie für CD46_{bov} durch Herstellung von Glykoprotein E2-Chimären geschehen. Für die Konstruktion dieser E2-Chimären wurde das KSPV Glykoprotein E2 gewählt, das im Zelladsorptionstest keine Bindung an CD46_{bov} aufwies (Abb.27/e). Der Sequenzvergleich von KSPV Alfort E2 mit BVDV NADL E2 zeigte eine Homologie von 63,6%, wobei variable von konservierten Bereichen abzugrenzen sind (Abb.28). Da KSPV E2 im Zelladsorptionstest keine Bindung an CD46_{bov} aufwies, lag die Vermutung nahe, dass vor allem die variablen Bereiche für die Rezeptornutzung verantwortlich sind.

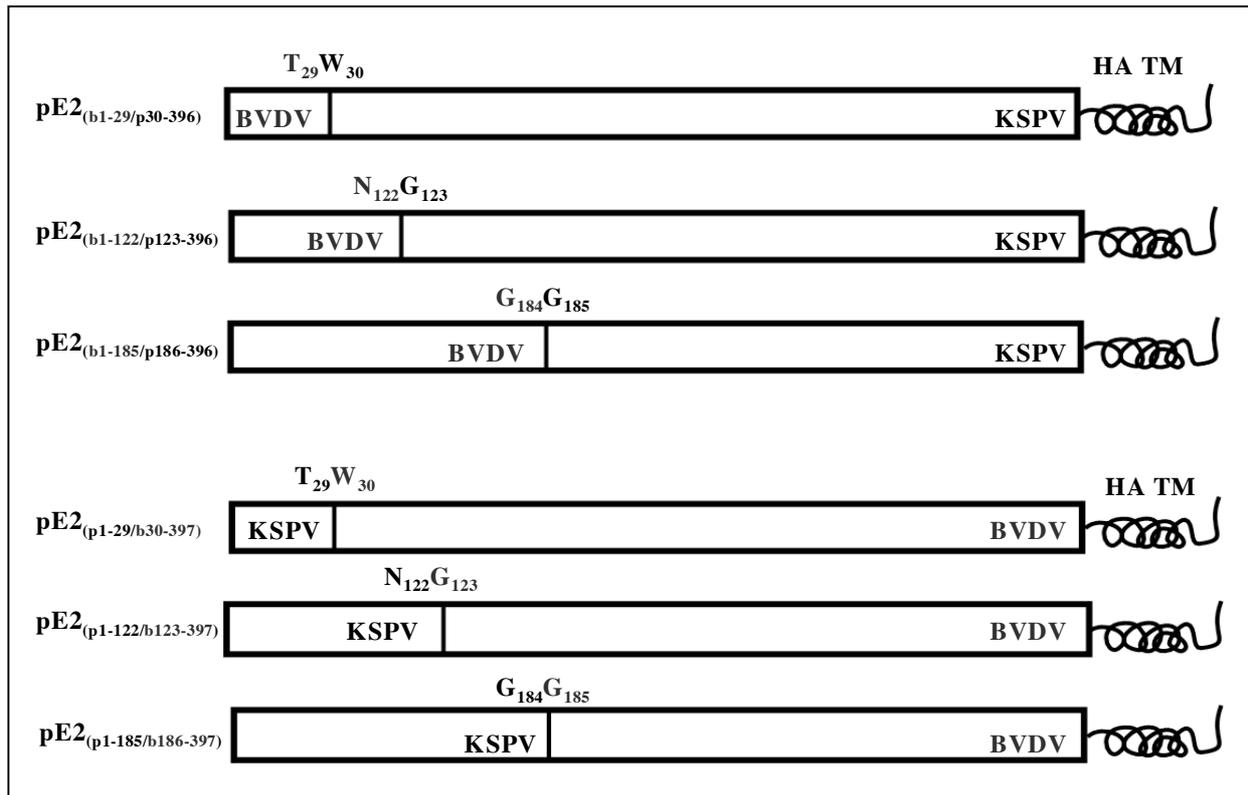


Abb.29: Schematische Darstellung der BVDV/KSPV E2-Chimären

Die Anteile der Glykoprotein E2 Sequenz im pcDNA3 Plasmid von BVDV NADL (**BVDV**) und KSPV Alfort (**KSPV**) der erzeugten Chimären sind eingezeichnet. Die C-terminale Transmembrandomäne und die zytosolische Domäne von Influenza Haemagglutinin (HA TM) zur Präsentation der chimären Proteine an der Zelloberfläche sind gekennzeichnet

Bei der Konstruktion der E2-Chimären wurde insbesondere die Verteilung variabler von weniger variablen Bereichen berücksichtigt. Zunächst wurden sechs KSPV/BVDV E2-Chimären im pcDNA3 Plasmid hergestellt (Abb.29). Hierfür wurden wiederum PCR-Klonierungen durchgeführt, da keine geeigneten Restriktionsschnittstellen in den Glykoprotein E2 Sequenzen vorhanden waren. Die Chimären $pE2_{(b1-29/p30-396)}$, $pE2_{(b1-122/p123-396)}$, und $pE2_{(b1-184/p185-396)}$ enthielten mit aa1-29, aa1-122 und aa1-184 die N-terminale Aminosäuresequenz von BVDV NADL E2, während C-terminal die restliche Sequenz von KSPV Alfort E2 eingesetzt wurde. Die komplementären Chimären $pE2_{(p1-29/b30-397)}$, $pE2_{(p1-122/b123-397)}$ und $pE2_{(p1-184/b185-397)}$ enthielten mit aa1-29, aa1-122 und aa1-184 die N-terminale Aminosäuresequenz von KSPV Alfort E2, während der C-terminale Anteil der Glykoprotein E2 Sequenz von BVDV NADL entstammte. Die E2-Chimären wurden im immunhistochemischen Nachweis auf Expression der chimären Proteine untersucht, bevor sie anschließend im Zelladsorptionstest auf Bindung getestet wurden. Hierfür wurden der mAk

D5, der das BVDV Glykoprotein E2 erkennt und der mAk A18, der mit dem KSPV Glykoprotein E2 interagiert, eingesetzt.

Im immunhistochemischen Nachweis der E2-Chimären erkannte der mAk D5 die Konstrukte pE2_(b1-184/p185-396) und pE2_(p1-29/b30-397). Die Expression der Konstrukte pE2_(b1-29/p30-396), pE2_(b1-122/p123-396) und pE2_(p1-184/b185-397) wurde mit dem mAk A18 nachgewiesen. (Tab.1). Zum Nachweis der Transfektionseffizienz wurde für die Chimäre pE2_(p1-122/b123-397) anti-E2-Serum eingesetzt, da weder mit dem mAk D5 noch mit mAk A18 eine Interaktion festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises lieferten Hinweise auf die Bindungsdomänen der mAk D5 und A18 im Glykoprotein E2 von BVDV und KSPV. Für den mAk D5 wurde eine für die Interaktion mit dem BVDV E2 notwendige Aminosäuresequenz von aa30-184 festgestellt, während die Aminosäuresequenz von KSPV E2 für die Bindung von mAk A18 auf aa123-184 eingengt werden konnte (Tab.1).

Glykoprotein E2 Konstrukt	D5	A18	Bindung an bovines CD46
pE2 _(b1-29/p30-396)	-	+	-
pE2 _(b1-122/p123-396)	-	+	-
pE2 _(b1-184/p185-396)	+	-	-
pE2 _(p1-29/b30-397)	+	-	+
pE2 _(p1-122/b123-397)	-	-	-
pE2 _(p1-184/b185-397)	-	+	-

Tab.1: Reaktionsmuster der mAk D5 und A18 und Ergebnisse des Zelladsorptionstests für die E2-Chimären pE2_(b1-29/p30-396), pE2_(b1-122/p123-396), pE2_(b1-184/p185-396), pE2_(p1-29/b30-397), pE2_(p1-122/b123-397) und pE2_(p1-184/b185-397)

Für den immunhistochemischen Nachweis und den Zelladsorptionstest wurden BHK-Zellen mit den E2-Chimären transfiziert und nach 24h fixiert. Nach Inkubation mit dem mAk D5 und mAk A18 und anschließend mit dem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörper wurden die Zellen gefärbt. Anhand der Färbung wurde die Expression der chimären E2 Glykoproteine überprüft. pE2_(p1-122/b123-397) wurde von beiden mAk nicht erkannt. Die Expression des Proteins wurde mit anti-E2 Serum überprüft.

Im Zelladsorptionstest konnte nur für die Chimäre E2_(p1-29/b30-397) eine Bindung von markierten 38A₁D CD46 Zellen festgestellt werden.

Bisher konnte nur für die E2-Chimäre $pE2_{(p1-29/b30-397)}$ eine Bindung an $CD46_{bov}$ nachgewiesen werden. Um die für die Bindung benötigte BVDV Sequenz weiter einzuengen, wurde die variable Region von aa42-62 ebenfalls ausgetauscht und die E2-Chimäre $pE2_{(p1-64/b65-397)}$ etabliert (Abb.30 und Abb.31). Diese E2-Chimäre wurde wiederum im Zelladsorptionstest auf ihre Bindung an $CD46_{bov}$ untersucht. Interessanterweise konnte keine spezifische Bindung festgestellt werden. Durch die Verlängerung der KSPV E2 Sequenz um 34 Aminosäuren bei der E2-Chimäre $pE2_{(p1-64/b65-397)}$ im Vergleich zu der KSPV Sequenz von $pE2_{(p1-29/b30-397)}$ wurde die Bindung von 38A₁D CD46 Zellen aufgehoben. Das bedeutet, dass diese 34 Aminosäuren wichtig für die Bindung an $CD46_{bov}$ sind.

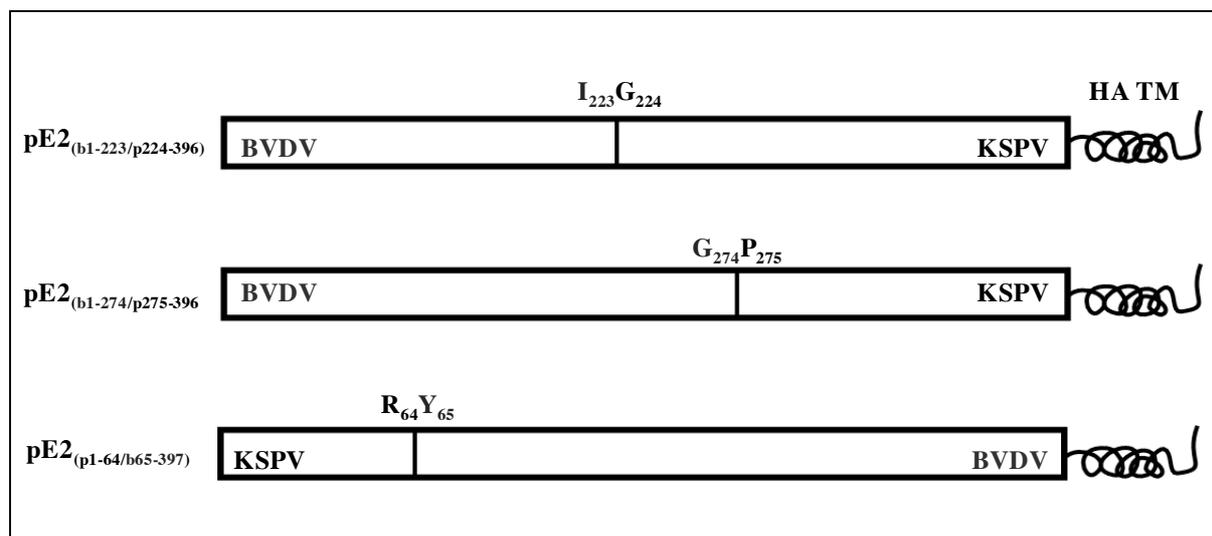


Abb.31: Schematische Darstellung der E2-Chimären: $pE2_{(b1-223/p224-396)}$, $pE2_{(b1-274/p275-396)}$ und $pE2_{(p1-64/b65-397)}$

Die bezeichneten Aminosäuren geben sowohl den Übergang von der BVDV in die KSPV Aminosäuresequenz an als auch von KSPV in BVDV. Die C-terminale Transmembrandomäne und die zytosolische Domäne von Influenza Haemagglutinin (HA TM) zur Präsentation der chimären Proteine an der Zelloberfläche sind gekennzeichnet.

Die E2-Chimären wurden wiederum auf erfolgreiche Proteinexpression mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises mit den mAk D5 und A18 getestet (Tab.2). Die Chimären $pE2_{(b1-223/p224-396)}$ und $pE2_{(b1-274/p275-396)}$ werden nur von mAk D5 erkannt, während $pE2_{(p1-64/b65-397)}$ mit keinem der mAk reagierte. Folglich konnten die aa30-64 von BVDV E2 als essentieller Anteil des mAk D5 Epitops identifiziert werden.

Glykoprotein E2-Konstrukte	D5	A18	Bindung an bovines CD46
pE2 _(b1-223/p224-396)	+	-	-
pE2 _(b1-274/p275-396)	+	-	-
pE2 _(p1-64/b65-397)	-	-	-

Tab.2: Reaktionsmuster der mAk D5 und A18 und Ergebnisse des Zelladsorptionstests von pE2_(b1-223/p224-396), pE2_(b1-274/p275-96) und pE2_(p1-64/b65-397)

pE2_(b1-223/p224-396) und pE2_(b1-274/p275-396) wurden vom mAk D5 erkannt. Die Transfektionseffizienz von pE2_(p1-64/b65-397) wurde mit anti-E2-Serum überprüft. Für alle drei E2-Chimären konnte keine Bindung von 38A₁D CD46 Zellen festgestellt werden.

Nachdem der N-terminale Anteil von aa1-274 für eine Bindung an CD46_{bov} nicht ausreichte, wurden zwei weitere E2-Chimären mit einem N-terminalen BVDV Aminosäuresequenzanteil von aa1-293 und aa1-312 etabliert. Während sich die Sequenzen von BVDV E2 und KSPV E2 zwischen aa274-293 lediglich durch zwei Aminosäuren (aa281 Y→K und aa291 E→R) unterscheiden, sind zwischen aa293 und aa312 nur noch zwei konservative Austausche (aa304 K→R und aa308 F→Y) zu identifizieren (Abb.32 und Abb.33). Beide Chimären wurden wiederum im Zelladsorptionstest auf Bindung an CD46_{bov} getestet, wobei positive Ergebnisse erzielt wurden. Hierdurch ließ sich der für eine Bindung an CD46_{bov} relevante N-terminale BVDV Aminosäuresequenzanteil auf aa1-293 eingrenzen.

Mit den E2-Chimären pE2_(p1-29/b30-397) und pE2_(p1-64/b65-397) konnte der für die Bindung relevante Aminosäuresequenzbereich von BVDV E2 auf aa30-65 eingengt werden (Abb.32). Dieser Bereich umfasst die variable Region von aa42-62. Es lag nahe, den Aminosäuresequenzbereich von aa30-65 weiter einzugrenzen. Hierzu wurden E2-Chimären erzeugt, die die N-terminale Aminosäuresequenz von KSPV E2 von aa1-46 und aa1-56 enthalten (Abb.33). Im Zelladsorptionstest konnte wiederum für beide Chimären eine Bindung an CD46_{bov} nachgewiesen und dadurch der für die Bindung relevante Aminosäuresequenzbereich auf aa57-293 eingengt werden.

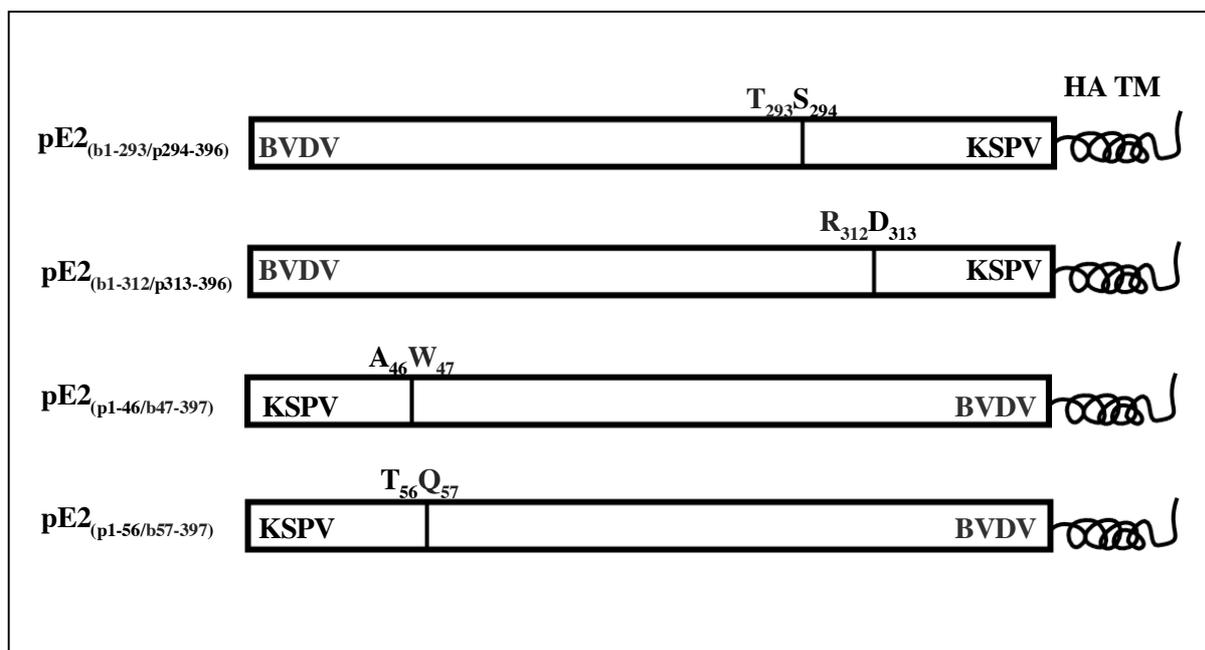


Abb.33: Schematische Darstellung der E2-Chimären: pE2_(b1-293/p294-396), pE2_(b1-312/p313-396), pE2_(p1-46/b47-397) und pE2_(p1-56/b57-397)

Die Anteile der Glykoprotein E2 Aminosäuresequenz im pcDNA3 Plasmid von BVDV NADL (BVDV) und KSPV Alfort (KSPV) der erzeugten Chimären sind gekennzeichnet.

Der zum Nachweis der Proteinexpression durchgeführte immunhistochemische Nachweis dieser vier E2-Chimären zeigte, dass sie einheitlich von mAk D5 erkannt werden. Der zuvor als essentieller Anteil des mAk D5 Epitops identifizierte Bereich von aa30-65 konnte mit diesem Reaktionsmuster weiter auf die aa57-65 von BVDV E2 eingengt werden (Tab.3).

Glykoprotein E2 Konstrukt	D5	A18	Bindung an bovines CD46
E2 _(b1-293/p294-396)	+	-	+
E2 _(b1-312/p313-396)	+	-	+
E2 _(p1-46/b47-397)	+	-	+
E2 _(p1-56/b57-397)	+	-	+

Tab.3: Reaktionsmuster der mAk D5 und A18 und Ergebnisse des Zelladsorptionstests von pE2_(b1-293/p294-396), pE2_(b1-312/p313-396), pE2_(p1-46/b47-397) und pE2_(p1-56/b57-397)

Für E2_(b1-293/p294-396), E2_(b1-312/p313-396), E2_(p1-46/b47-397) und E2_(p1-56/b57-397) konnte eine Interaktion mit dem mAk D5 nachgewiesen werden. Alle vier E2-Chimären zeigten eine deutliche Bindung von 38A₁D CD46 Zellen im Zelladsorptionstest.

Schließlich lag es nahe, die beiden E2-Chimären mit den umfangreichsten N- und C-terminalen KSPV Anteilen ($pE2_{(p1-56/b57-444)}$ und $pE2_{(b1-293/p294-445)}$) in einer Chimäre zu kombinieren, um so eine minimale, für die Bindung an $CD46_{bov}$ essentielle BVDV E2 Sequenz ermitteln zu können (Abb.34).

Für die Konstruktion der E2-Chimäre $pE2_{(p1-56/b57-293/p294-445)}$ wurde der mittlere Abschnitt der Aminosäuresequenz aa57-293 von BVDV E2 in die KSPV E2 Sequenz eingesetzt (Abb.35). Der Zelladsorptionstest zeigte, dass diese minimale BVDV E2 Sequenz von aa57-293 für eine spezifische Bindung von $CD46_{bov}$ ausreicht.

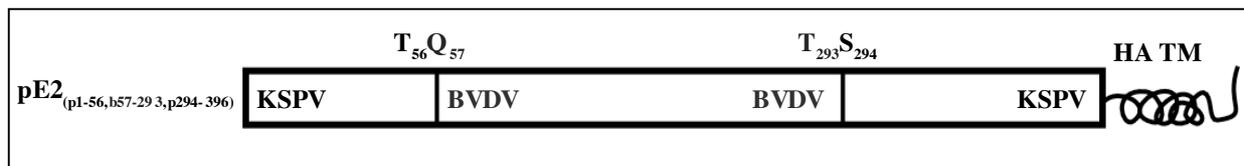


Abb.34: Schematische Darstellung der E2-Chimäre $pE2_{(p1-56/b57-293/p294-396)}$

Die Anteile der Glykoprotein E2 Aminosäuresequenz im pcDNA3 Plasmid von BVDV NADL (**BVDV**) und KSPV Alfort (KSPV) der etablierten Chimäre sind gekennzeichnet.

3.2.1.2 Etablierung von KSPV Gesamtklonen, die Glykoprotein E2 Sequenzabschnitte von BVDV NADL enthalten

3.2.1.2.1 Einbau der BVDV E2 „Minimalsequenz“ in den KSPV Gesamtklon

Mit den E2-Chimären im pcDNA3 Plasmid wurde die für die Bindung an CD46_{bov} notwendige Aminosäuresequenz auf den Bereich von aa57-293 eingegrenzt. Der hierzu verwendete Zelladsorptionstest ließ jedoch nur eine qualitative Aussage über Bindung zu, da insbesondere wegen unterschiedlicher Transfektionsergebnisse große Schwankungen festzustellen waren. Daher sollte als quantifizierbare Messung nicht allein Bindung, sondern das Infektionsvermögen von rekombinanten Viren herangezogen werden. Hierzu wurde die minimierte BVDV E2 Sequenz in den zur Verfügung stehenden KSPV Alfort Gesamtklon (rKSPV) mittels „reverser Genetik“ kloniert und der rekombinante KSPV Gesamtklon rKSPV E2_(aa57-293BVDV) hergestellt.

Unter „reverser Genetik“ wird die synthetische Erzeugung spezifischer Mutanten von infektiösen Viren und die nachfolgende Analyse ihrer entsprechenden Phänotypen verstanden. Für RNA Viren, wie KSPV, muss zunächst eine sogenannte „infektiöse cDNA-Kopie“ hergestellt werden, die das gesamte virale Genom in Form einer cDNA Kopie in einem Plasmid enthält. Nur auf dieser cDNA im Plasmid können Mutationen durchgeführt werden. Ausgehend von einem Bakteriophagen Promotor (SP6 oder T7) kann *in vitro* durch entsprechende Polymerasen die cDNA in eine RNA umgeschrieben werden. Nach Transfektion der *in vitro* transkribierten RNA in permissive Zellen wird der virale Replikationszyklus initiiert. Für eine Reihe von Pestiviren sind bereits infektiöse cDNA-Gesamtklone beschrieben (Mendez et al., 1988; Meyers et al., 1996a und 1996b; Moormann et al., 1996; Ruggli et al., 1996; Vassilev et al., 1997).

Um das Infektionsvermögen dieser rekombinanten Viren zu testen, wurden von der DNA des Ausgangsklons rKSPV und der Gesamtklonchimäre rKSPV E2_(aa57-293BVDV) Transkripte hergestellt. Die Transkript RNA wurde anschließend in SK6-Zellen (Schweinenierenzellen) durch Elektroporation transfiziert. Die elektroporierten Zellen wurden 24h inkubiert, bevor das Zellkulturmedium abgenommen wurde. Mit diesem Zellkulturmedium wurden sowohl SK6 als auch MDBK-Zellen infiziert (Abb.36). Der Test erlaubt die Bestimmung der biologischen Aktivität der chimären E2 Proteine. Es konnte dabei die Empfänglichkeit von Zellen porcinen und bovinen Ursprungs untersucht werden.

Während die Empfänglichkeit der SK6-Zellen für rKSPV als Standardwert auf 100% festgelegt wurde, wiesen die MDBK-Zellen mit einem Wert von 8,3% eine deutlich reduzierte Empfänglichkeit auf. Die E2 Gesamtklonchimäre rKSPV E2_(aa57-293BVDV) infizierte hingegen SK6-

Zellen nur noch mit einer Effizienz von 3,1%, während MDBK-Zellen signifikant empfänglicher waren (22,5%). Diese Ergebnisse bedeuten, dass die Gesamtklonchimäre MDBK-Zellen um den Faktor 7 besser infiziert als SK6-Zellen und somit von einem Wirtswechsel gesprochen werden kann.

Um die für den Wirtswechsel verantwortliche BVDV E2 Sequenz im KSPV Gesamtklon weiter einzuengen, wurde die BVDV E2 Sequenz von aa57-293 auf aa57-274 verringert und die Gesamtklonchimäre rKSPV E_{2(aa57-274BVDV)} konstruiert (Abb.36). Für das daraus hervorgehende Virus wurden Empfänglichkeitswerte von 2,8% für SK6-Zellen und von 17,6% für MDBK-Zellen ermittelt. Auch für diese Gesamtklonchimäre konnte ein Wirtswechsel nachgewiesen werden. Interessanterweise bedingt dieser Austausch ebenfalls einen Wirtswechsel, obwohl für das analoge Konstrukt im Zelladsorptionstest keine Bindung festzustellen war.

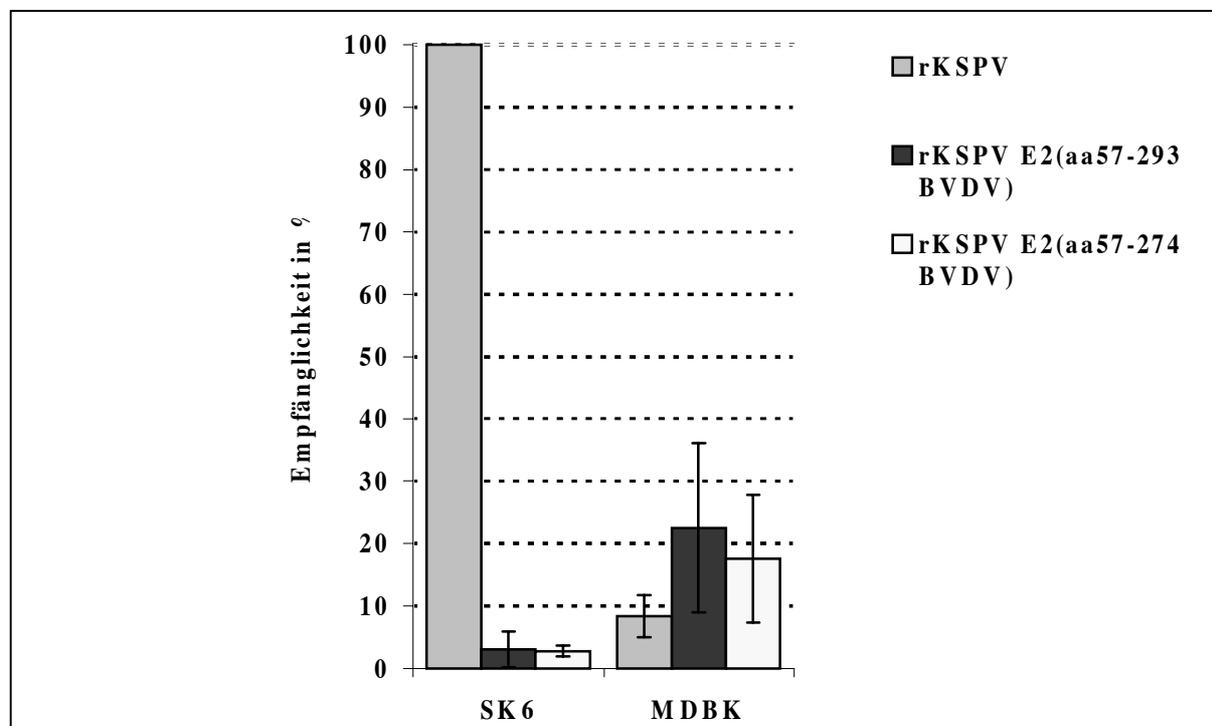


Abb.36: Empfänglichkeit von SK6- und MDBK-Zellen für rKSPV und die E2-Gesamtklonchimären rKSPV E_{2(aa57-293BVDV)} und rKSPV E_{2(aa57-274BVDV)}

SK6 und MDBK-Zellen wurden mit dem Zellkulturmedium von SK6-Zellen infiziert, die 24h vorher mit RNA Transkripten von rKSPV und den Gesamtklonchimären rKSPV E_{2(aa57-293BVDV)} und rKSPV E_{2(aa57-274BVDV)} elektroporiert worden waren. Nach 24h wurden die Zellen fixiert, mit dem mAk Code 4 (anti Pestivirus NS3) inkubiert und infizierte Zellareale immunhistochemisch dargestellt. Die Empfänglichkeit von SK6-Zellen für rKSPV wurde mit 100% festgelegt und somit konnte eine Empfänglichkeit von 8,4% für die MDBK-Zellen ermittelt werden. Die Empfänglichkeit von SK6-Zellen für rKSPV E_{2(aa57-293BVDV)} lag bei 3,1% und von MDBK-Zellen bei 22,5%. Für rKSPV E_{2(aa57-274BVDV)} wurde ein Empfänglichkeitswert von 2,8% für SK6-Zellen und von 17,6% für MDBK-Zellen ermittelt.

3.2.1.2.2 Etablierung von Glykoprotein E2-Gesamtklonchimären durch Austausch variabler Sequenzbereiche

Um die Aminosäuresequenz von bovinem E2 im rKSPV Gesamtklon, die für den Wirtswechsel verantwortlich ist, weiter einengen zu können, wurden vier Chimären erzeugt, bei denen einzelne variable Sequenzbereiche im Glykoprotein E2 ausgetauscht wurden rKSPV E2_(I), rKSPV E2_(II), rKSPV E2_(III) und rKSPV E2_(IV) (Abb.37). Hierbei wurden vier variable Bereiche (I: aa49-63BVDV; II: aa87-93BVDV; III: aa142-149BVDV; IV: aa166-175BVDV) für den Austausch gewählt, die gleichzeitig in dem Sequenzbereich zwischen aa57–274 lagen, der in der Gesamtklonchimäre rKSPV E2_(aa57-274BVDV) zu einer Steigerung der Empfänglichkeit von MDBK-Zellen führte. Im Gegensatz zu den E2-Chimären, die im Zelladsorptionstest auf ihre Bindung an CD46_{bov} anhand des Funktionsverlustes („loss of function“) untersucht wurden, handelt es sich bei diesen Gesamtklonchimären durch den Einbau einer kurzen BVDV E2 Sequenz in den rKSPV Gesamtklon um sogenannte „gain of function“-Mutanten.

Aufgrund der Plasmidgröße von 14,5kb war es nicht möglich, die „Quik Change“ PCR Methode direkt mit der vollständigen cDNA Kopie von rKSPV durchzuführen. Demzufolge wurde die Mutagenese der KSPV Sequenz durch „Quik Change“ PCR mit der *Pfu*-Polymerase in einem KSPV-Vorklon, der das gesamte KSPV E2 umfasste, durchgeführt. Die veränderte E2-Sequenz wurde anschließend über Restriktionsschnittstellen in den rKSPV kloniert.

			20		40		I aa49-63	60
BVDV E2	1	HLDCCKPEFSYAIKDERIGQLGAEGLTTT	WKEYSPGMKLEDTMVI	AWCEDGKLMYLQ	RCT			
		L CK ++ YAI+	IG LGAEGLTTT	WKEYS G++L+D	V A C G			
KSPV E2	1	RLACKEDYRYAISSTNEIGLLGAEGLTTT	WKEYSHGLQLDDGT	VKAVCTAGSFKV	TALNV			
			80		100		II aa87-93	120
BVDV E2	61	RETRYLAILHTRALPTS	VVFKLFDGRKQEDV	VEEMNDNF	FGLCPCDAKPI	VRGKFNTTL		
		FYLA LH RALPTS	V F+ LFDC	+ EM+D+F	FGLCP D P+++GK	+NTTL		
KSPV E2	61	VSRFYLASLHKRALPTS	VTFELLFDG=TNPAIE	EMDDDFG	FGLCPFDTS	PIVIGKYNTTL		
			140		160		III aa142-149	180
BVDV E2	121	LNGPAFQMVCP	IGWTGTVSCT	SFNMDTLAT	TVVRYRRSK	PFPHRQGCITQ	KNLGHDLHN	
		LNG AF +VCP	IGWTG V CT+ +	TL T VV+T+RR	KPFPHR C+T	EDL +		
KSPV E2	120	LNGSAFYLVCP	IGWTGVVECT	AVSPTTLRTE	EVVKTFRRD	KPFPHRVDCVTT	IVEKDLFH	
			200		220		IV aa166-175	240
BVDV E2	181	CILGGNWT	CVPGDQLLYK	GGSI	ESCKWCGYQ	FKESEGLPHYP	IGKCKLEN	ETGYRLVDST
		C LGGNWT	CV GD + YKGG	++ C+WCG++FKE	GLPHYPIGK	C L NETGYR	+VDST	
BVDV E2	180	CKLGGNWT	CVKGD	PVTYKGGQ	VKQCRWCG	FEFKEPYGLPHYP	IGKCIL	NETGYRVVDST
			260		280			300
BVDV E2	241	SCNREGVA	IVPQGT	LKCKIGK	TTVQVIAM	DTKLGMP	PCR	PYEIISSEGP
		CNR+GV I +G	+C IG TTV+V	A+D +LGP	MPCR	EI+SSEGP	V	KT+CTFN
KSPV E2	240	DCNRDGV	VISTE	GEHECL	IGNTTVKV	HALDERL	GMP	PCR
			320		340			360
BVDV E2	301	KTLKNKY	FEP	RSYFQ	OYMLKGEY	OYWF	DLEV	TDHHRDYFAES
		KTL+NKY+EP	RSYFQ	OYMLKGEY	OYWF+L+V	TDH	DYFAE	+++VVV
KSPV E2	300	KTLRNKY	YEP	RSYFQ	OYMLKGEY	OYWF	NLDV	TDHHTDYFAEF
BVDV E2	361	LVTY	MVLSE	QKALG	374			
		+VTY++L+EQ	A G					
KSPV E2	360	IVTY	IILTE	QLAAG	373			

Abb.37: Sequenzvergleich von BVDV NADL (BVDV E2) und KSPV Alfort (KSPV E2) Glykoprotein E2

Darstellung der vier variablen Sequenzbereiche (I: aa49-63; II: aa87-93; III: aa142-149; IV: aa166-175), die in der KSPV E2 Sequenz durch die entsprechenden Bereiche von BVDV E2 ausgetauscht wurden. Da es sich hierbei um die E2 Sequenz des rKSPV Gesamtklones handelt, ist kein Influenza HA Anker vorhanden.

Um die Empfänglichkeit von SK6 und MDBK-Zellen für diese Gesamtklonchimären zu testen, wurden SK6-Zellen wiederum mit den RNA Transkripten der Chimären durch Elektroporation transfiziert und die freigesetzten Viren wurden zur Infektion von SK6 und MDBK-Zellen verwendet. Alle erzeugten Gesamtklonchimären wurden im immunhistochemischen Nachweis

mit den mAk A18, D5 und Code 4 überprüft, bevor ihre Zellkulturüberstände zur Infektion von SK6 und MDBK-Zellen eingesetzt wurden. Hierbei waren die SK6-Zellen für diese Gesamtklonchimären deutlich weniger empfänglich als für den unveränderten Ausgangsgesamtklon rKSPV (Abb.36). Jedoch konnte keine Erhöhung der Empfänglichkeit von MDBK-Zellen für diese Chimären festgestellt werden. Das Reaktionsmuster des mAk A18 verdeutlichte im immunhistochemischen Nachweis, dass der Austausch des Sequenzbereiches III (aa142-149BVDV) zu einem Verlust der Erkennung führte.

Die Empfänglichkeit von SK6 und MDBK-Zellen für die rKSPV Gesamtklonchimären, die einen kurzen Abschnitt der BVDV E2 Sequenz enthielten, war insgesamt deutlich verringert. Um zu untersuchen ob die gewählten variablen Bereiche zusammenwirken müssen um eine CD46 Bindung zu erzielen, wurden Gesamtklonchimären mit verschiedenen Kombinationen der variablen Bereiche erzeugt (Abb.38).

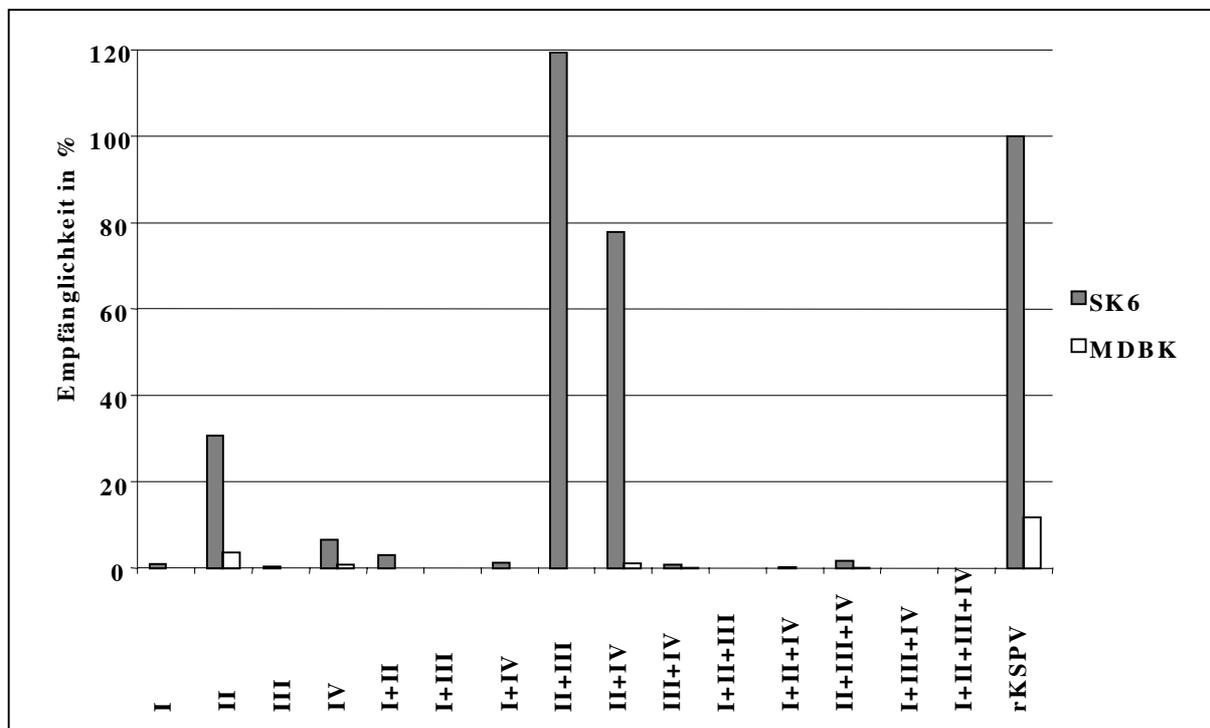


Abb.38: Empfänglichkeit von SK6- und MDBK-Zellen für die Gesamtklonchimären rKSPV E2_(I-IV) und für rKSPV

Vier BVDV E2 Sequenzbereiche (**I**: aa49-63; **II**: aa87-93; **III**: aa142-149; **IV**: aa166-175) wurden in den rKSPV Gesamtklonchimären in unterschiedlicher Anzahl und Kombination ausgetauscht. SK6 und MDBK-Zellen wurden mit dem Zellkulturmedium von SK6-Zellen infiziert, die 24h vorher mit RNA Transkripten der Chimären und des Ausgangsgesamtklons rKSPV elektroporiert worden waren. Die Empfänglichkeit von SK6-Zellen für rKSPV wurde auf 100% festgelegt. Die Chimären rKSPV E2_(II+III) und rKSPV E2_(II+IV) erreichten mit 119,4% und 77,8% Empfänglichkeitswerte für SK6-Zellen, die mit der Kontrolle, rKSPV, vergleichbar waren. Für alle anderen Chimären waren die SK6-Zellen deutlich weniger empfänglich, jedoch konnte keine Erhöhung der Empfänglichkeit für MDBK-Zellen festgestellt werden.

Die Kombination von jeweils zwei der vier Sequenzabschnitte führte zur Etablierung von sechs weiteren Gesamtklonchimären: rKSPV E2_(I+II), rKSPV E2_(I+III), rKSPV E2_(I+IV), rKSPV E2_(II+III), rKSPV E2_(II+IV) und rKSPV E2_(III+IV).

Bei der Infektion von SK6-Zellen wurden für die Gesamtklonchimären rKSPV E2_(II+III) und rKSPV E2_(II+IV) Empfänglichkeitswerte von 119,4% und 77,8% ermittelt. Hingegen konnte keine Erhöhung der Empfänglichkeit von MDBK-Zellen für diese beiden Gesamtklonchimären festgestellt werden (Abb.38). Die restlichen vier Chimären lagen mit ihren Werten im Bereich der vorherigen Gesamtklonchimären, die jeweils nur einen kurzen BVDV Glykoprotein E2 Sequenzbereich enthielten.

Da weder für die Gesamtklonchimären mit einem Sequenzbereich von BVDV E2 noch für die mit zwei Bereichen eine Änderung der Empfänglichkeit von MDBK-Zellen festgestellt werden konnte, wurden anschließend vier Gesamtklonchimären mit drei der im Sequenzvergleich eingerahmten vier variablen Bereiche erzeugt (Abb.35). Bei der Infektion von SK6-Zellen und MDBK-Zellen mit den Gesamtklonchimären rKSPV E2_(I+II+III), rKSPV E2_(I+II+IV), rKSPV E2_(II+III+IV) und rKSPV E2_(I+III+IV) wurden keine erhöhten Empfänglichkeitswerte festgestellt (Abb.38). Es wurden im Gegenteil deutlich reduzierte Werte ermittelt, die weit unter dem mit 100% festgelegten Standardwert der Empfänglichkeit von SK6-Zellen für den Ausgangsgesamtklon rKSPV lagen.

Auch der Einbau der vier im Sequenzvergleich identifizierten variablen BVDV E2 Bereiche (rKSPV E2_(I+II+III+IV)) führte zu keiner Erhöhung der Empfänglichkeit von MDBK-Zellen (Abb.38). Einzig die als erstes beschriebenen Gesamtklonchimären rKSPV E2_(aa57-293BVDV) und rKSPV E2_(aa57-274BVDV) infizierten MDBK-Zellen deutlich besser als SK6-Zellen.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der Bindungsdomäne im CD46_{bov}

Der Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war die Arbeitshypothese, dass das bovine CD46 Molekül bei der Infektion boviner Zellen durch BVDV als Rezeptor dient. Diese Hypothese stützte sich auf die Identifizierung von CD46 als das Protein, welches mit BVDV-infektionshemmenden mAk reagierte (Maurer, Diss. 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die heterologe Expression von CD46_{bov} in porzinen Zellen eine deutliche Steigerung der Empfänglichkeit für BVDV zur Folge hatte. Zunächst galt es zu klären, welche Funktion CD46 im Verlaufe der Invasion von BVDV spielt. In Analogie zu anderen Virussystemen (Masernvirus, HHV 6) lag es nahe zu vermuten, dass es sich bei CD46 um einen zellulären Rezeptor für BVDV handelte.

Um dies zu bestätigen, wurde zur Feststellung der Virusbindung ein quantitativer Bindungsassay etabliert. Versuche zur Markierung von Viren durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren in die Strukturproteine verliefen ergebnislos. Insbesondere die mangelhafte Abtrennbarkeit viraler Partikel von zellulärem Debris bereitete große Schwierigkeiten. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von [³H]-Uridin gelöst werden, das eine spezifische Markierung des Virusgenoms erlaubte. Hierbei wurde auch eine Besonderheit der Pestiviren ausgenutzt, denn die im Virus vorkommende Ribonuklease E^{rns} zerstört kontaminierende zelluläre RNA Moleküle, während das virale Genome geschützt bleibt. Durch Sedimentations- und Gradientenreinigung wurden freie Nukleotide und RNA Fragmente abgetrennt. Mit dem markierten Virusmaterial konnte der Nachweis der Bindung viraler Partikel an CD46_{bov} exprimierende Zellen erbracht werden. Gleichzeitig zeigten die CD46_{bov} exprimierenden SK6-Zellen (SK6CD46_{bov}) im Vergleich zu den parentalen SK6-Zellen eine deutliche Steigerung der Infektion mit BVDV. Hiermit konnte neben der Virusbindung auch die Beteiligung an der Infektion bestätigt werden. Zusammenfassend ergeben die Daten bezüglich Virusbindung und Steigerung der Empfänglichkeit sehr starke Argumente für die Hypothese, dass es sich bei CD46_{bov} um einen Rezeptor für BVDV handelt.

Eine große Hilfe für die Etablierung des Bindungsassay mit [³H]-Uridin markiertem BVDV war die Verwendung von SK6-Zellen mit induzierbarer CD46 Expression. Die Vorteile der hierbei verwendeten induzierbaren SK6 Tet on Zelllinien liegen in der Stabilität der Zellen und in der Effizienz der Proteinexpression. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass auch mit diesem System eine absolute Vergleichbarkeit einzelner Zelllinien aufgrund

unterschiedlicher Expressionsstärke von CD46 in jedem Fall nicht gegeben ist. Interessanterweise zeigte die Positivkontrolle (SK6CD46_{bov}) nach Induktion eine um den Faktor 5 gesteigerte Bindung, während sich die Empfänglichkeit um das 10fache verringerte. Eine zu große Menge an CD46_{bov} wirkt offensichtlich hemmend auf das Infektionsvermögen von BVDV.

Um die für die Bindung und Infektion von BVDV relevanten Domänen im CD46_{bov} zu identifizieren, wurden zunächst Deletionsmutanten von CD46_{bov} etabliert. Mit diesen Deletionsmutanten von CD46_{bov} konnte gezeigt werden, dass die spezifischen mAk BVD/CA 17, 26 und 27, die eine BVD Infektion hemmen (Schelp et al., 1995, Maurer, Diss. 2002) mit CCP1 (BVD/CA 26) oder mit CCP2 (BVD/CA 17, 27) interagieren. Das Reaktionsmuster dieser Antikörper ergab, dass die CCP1 und CCP2-Module von CD46_{bov} vermutlich eine wichtige Rolle für die Bindung und Infektion von BVDV spielen.

Interessanterweise konnte für die Deletionsmutanten von CD46_{bov} weder eine Steigerung der Bindung noch der Empfänglichkeit gegenüber den SK6-Zellen ermittelt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die Deletion einer oder zweier CCP Module ausnahmslos zu einem Verlust der Rezeptorfunktion führte („loss of function“). Hierbei spielte es keine Rolle, ob die CCP1 und CCP2-Module vorhanden waren.

Nachdem die Deletionsmutanten von CD46_{bov} im Bindungs- und Empfänglichkeitstest keine gesteigerten Werte erzielten, sollte für die weitere Charakterisierung auf andere Weise verfahren werden. Für Masernvirus gelang die Identifikation der für Bindung und Infektion relevanten CCP Module durch die Erzeugung von CD46-Chimären. Hierfür wurden strukturell ähnliche CCP-Domänen des CD55 Moleküls eingesetzt, an das Masernvirus nicht bindet (Manchester et al., 1997; Greenstone et al., 2002). Für die Bestimmung der für Bindung und Infektion relevanten Bereiche im CD46_{bov} war es vorteilhaft, Chimären mit einem möglichst nah verwandten aber sicher nicht als BVDV Rezeptor dienenden Protein zu verwenden. Hierfür eignete sich das porcine CD46, denn es erfolgte keine spezifische Bindung von BVDV an CD46_{porz}.

Für den Test auf Virusbindung und den Nachweis der Empfänglichkeit für BVDV wurden zunächst SK6 Zelllinien etabliert, bei denen bovines CCP1, CCP2, CCP3, CCP4, bzw. Kombinationen von CCP1 und CCP2 oder CCP3 und CCP4 durch die entsprechenden porcinen Module ersetzt wurden. Für die Zelllinien SK6CD46_{p1} und SK6CD46_{p1,p2}, die porcines CCP1 bzw. porcines CCP1 und CCP2 enthalten, konnte weder eine erhöhte, spezifische Bindung noch eine gesteigerte Empfänglichkeit für BVDV nachgewiesen werden. Hingegen wurden nach Austausch von porzinem CCP2 in SK6CD46_{p2} immer noch

gesteigerte Bindungs- und Empfänglichkeitswerte erzielt. Diese Ergebnisse zeigten, dass das bovine CCP1-Modul essentiell für die Rezeptorfunktion ist, während das CCP2-Modul ohne Funktionsverlust durch das porcine CCP2 ersetzt werden kann. Hiermit ließ sich ein Unterschied zu den Ergebnissen der Antikörperbindungsdaten von BVD/CA 17, 26 und 27, die sowohl an CCP1 und CCP2 binden ermitteln.

Die Etablierung zusätzlicher Austauschmutanten von CD46_{bov} führte zur weiteren Einengung der für Bindung und Empfänglichkeit essentiellen Aminosäuren im bovinen CCP1-Modul. Mit diesen Zelllinien der Austauschmutanten von CD46_{bov} gelang es schließlich, die für die Bindung und Empfänglichkeit von BVDV notwendige Aminosäuresequenz auf sechs Aminosäuren in der C-terminalen Hälfte von CCP1 einzugrenzen. Der Austausch von G₄₀QVLAL₄₅ zu den analogen Aminosäuren des porcinen CD46 führte zum Verlust der Rezeptorfunktion von CD46_{bov}. Um nachzuweisen, ob dieser Bereich alleine für die Bindung ausreicht, wurden die sechs Aminosäuren in CCP1 von porcinem CD46 (SK6 porz.CD46_{G40QVLAL45} und SK6CD46_{p1(G40QVLAL45)}) eingefügt. Hierbei konnte jedoch weder eine Bindung noch eine Empfänglichkeit nachgewiesen werden, die über die Werte der SK6-Zellen hinausgingen. Das lässt den Schluss zu, dass die Sequenz G₄₀QVLAL₄₅ im bovinen CCP1 zwar an der Bindung beteiligt ist, aber als alleinige Determinante nicht genügt um Rezeptorfunktion zu vermitteln. Allerdings zeigte sich, dass auch das vollständige CCP1 von CD46_{bov} keine Bindung bzw. Empfänglichkeit vermittelt, wenn es in das porcine CD46 Molekül eingefügt wird.

Offensichtlich sind neben dem CCP1-Modul noch weitere Domänen im CD46_{bov} für die Virusbindung und für die Beteiligung an der Infektion essentiell. Ähnliche Ergebnisse sind für Masernviren, für Humanes Herpes Virus 6 (HHV 6) und für *Neisseria gonorrhoeae* bekannt. Für die Masernvirusstämme Edmonston und Hallé wurde eine Interaktion des viralen Haemagglutinin mit den Domänen CCP1 und CCP2 detailliert beschrieben (Manchester et al., 1995; Iwata et al., 1995; Übersicht in Manchester et al., 2000). Mittels Fusionsexperimenten von CD46/CD55-Chimären konnte für HHV 6 eine starke Abhängigkeit von den CD46 Domänen CCP2 und CCP3 ermittelt werden (Greenstone et al., 2002). Für die Anheftung von pilusbildenden *Neisseria* Bakterien an die Wirtszelle wurden die STP-Region, CCP3 und die zytoplasmatische Domäne (Cyt1) als notwendig identifiziert. Neben diesen Krankheitserregern binden auch die natürlichen Liganden von CD46, die Komplementfaktoren C3b und C4b, mit CCP2, CCP3 und CCP4 an mehrere Strukturen innerhalb der vier CCP-Domänen (Liszewski et al., 2000) (Tab.4).

Die Ergebnisse der Deletionsmutanten und Austauschmutanten von CD46_{bov} sowie die Bindungseigenschaften der mAk BVDV/CA 17, 26 und 27 lassen vermuten, dass CD46_{bov} möglicherweise eine zweite Bindungsdomäne im CCP2 beinhaltet.

Komplementfaktoren	CD46 Domäne
C3b,C4b	CCP2, CCP3, CCP4
Erreger	
Masernvirus	CCP1, CCP2
Humanes Herpes Virus 6 (HHV6)	CCP2, CCP3
Bovine Virus Diarrhoe Virus (BVDV)	CCP1, CCP2(?)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CCP3, STP-Region, Zytosolische Domäne (Cyt 1)

Tab.4: Interaktion der verschiedenen pathogenen Mikroorganismen und natürlichen Liganden mit Domänen im CD46 Molekül.

Um den Einfluss der Größe des CD46_{bov} Moleküls auf die Bindung und Infektion von BVDV zu testen, wurden Zelllinien etabliert, die CD46 exprimieren, das um ein oder zwei CCP Module vergrößert war. Für die Zelllinie SK6CD46_{1,p1+p2,3,4}, die anstelle von bovinem CCP2 porcines CCP1 und CCP2 enthielt, konnte weder gesteigerte Bindung noch Empfänglichkeit festgestellt werden. Hingegen wurde für die Zelllinie SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4}, die die beiden zusätzlichen CCP1 und CCP2-Module von porcinem CD46 zwischen dem bovinen CCP2 und CCP3-Modul enthielt, mit 5,8% ein deutlich erhöhter Bindungswert und mit 293,7% nach erfolgter Induktion eine erheblich höhere Empfänglichkeit nachgewiesen. Für Masernvirus wurde beschrieben, dass eine Verlängerung von humanem CD46 zwar zu erhöhter Bindung aber geringerer Fusionsaktivität führte. Hierbei wurden auch die Längen der CD46 Moleküle bestimmt (100Å, 120Å) (Barlow et al., 1993; Buchholz et al., 1996). Die Konstruktion eines humanen CD46 Moleküls, das aus 8 CCP-Domänen von humanem CD46 und CD55 bestand, zeigte neben einer verstärkten Virusbindung verminderte Empfänglichkeit der Zellen für Masernvirus (Christiansen et al., 2002). Weiterhin konnte mit diesem Konstrukt ein negativer

Einfluss auf die Infektion auch bei Koexpression von unverändertem CD46 festgestellt werden. Ebenso wurde eine Hemmung der Infektion bei Koexpression dieses CD46 Konstrukts und CD150 für Masernvirusstämme ermittelt, die sowohl CD46 als auch CD150 als zellulären Rezeptor verwenden.

Die gesteigerten Bindungs- und Empfänglichkeitswerte der Zelllinie SK6CD46_{1,2,p1+p2,3,4} können dadurch erklärt werden, dass Masernvirus und BVDV einen unterschiedlichen Invasionsmechanismus verwenden. Masernviren dringen über Fusion an der Plasmamembran in die Zelle ein (Griffin and Bellini, 1996). Für Pestiviren wird hingegen angenommen, dass sie wie andere Vertreter der *Flaviviridae* über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle gelangen (Rice, 1996). Hierfür spricht auch, dass die Pestivirusinvasion durch Verhinderung der endosomalen Acidifizierung vollständig hemmbar ist (Krey, unveröffentlichte Daten). Ein niedriger pH-Wert ist bei behüllten Viren, die durch Endozytose aufgenommen werden, für die Einleitung der Membranfusion essentiell (Sieczkarski und Whittaker, 2002).

Da das CD46_{1,2,p1+p2,3,4} Molekül noch um ein weiteres CCP Modul verlängert wurde, als CD46_{1,p1+p2,3,4} kann die Vergrößerung der Distanz zwischen dem CCP1-Modul und der Zelloberfläche als Ursache für den Funktionsverlust ausgeschlossen werden. Hingegen bestätigt der Funktionsverlust bei der Zelllinie SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} die Vermutung einer für die Steigerung der Bindung und Empfänglichkeit essentiellen zweiten Bindungsdomäne im bovinen CCP2 Molekül, die hier fehlt. Zur Relevanz der Größe von CD46_{bov} für die Rezeptorfunktion lässt sich zusammenfassen, dass eine Mindestgröße von vier CCP Modulen vorliegen muss, während die Verlängerung des Moleküls aber geduldet wird.

Alternativ lässt sich der Funktionsverlust der Zelllinie SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} durch die Kristallstruktur der CCP1 und CCP2-Domänen des humanen CD46 erklären (Casasnovas et al., 1999) (Abb.2). Diese Struktur verdeutlicht, dass die CCP1 und CCP2-Module in einem bestimmten Winkel zu einander angeordnet sind und sich dadurch erst die für die Infektion mit Masernviren spezifische Bindungsdomäne ausbildet. In SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} treffen bovines und porcines CCP1 direkt aufeinander und damit geht wahrscheinlich eine Veränderung der räumlichen Anordnung des CD46 Moleküls einher, die zum Funktionsverlust von CD46 als zellulärer Rezeptor für BVDV führt. Zusätzlich lässt sich ableiten, dass auch die ungerade Anzahl von CCP Modulen in SK6CD46_{1,p1+p2,3,4} und die damit veränderte Orientierung des N-terminal gelegenen CCP1-Moduls die Ursache des Funktionsverlustes sein könnte.

Durch Veränderung der Molekülstruktur lässt sich auch der Funktionsverlust der Zelllinie SK6CD46_{2,1,3,4} erklären. Sie wurde etabliert um die Relevanz der Position von CCP1 als N-terminales Modul im CD46_{bov} Molekül nachzuweisen. Im Bindungsassay und im

Empfänglichkeitsnachweis wurden für diese Zelllinie Werte ermittelt, die denen der Negativkontrolle, den SK6-Zellen entsprachen. Die räumliche Anordnung der einzelnen CCP Module und damit der Bindungsdomäne(n) wurde durch den Tausch von CCP1 und CCP2 wahrscheinlich so stark verändert, dass diese CCP1-Positionsmutante nicht mehr als Rezeptor von BVDV erkannt wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass neben CCP1 eine zweite Bindungsdomäne essentiell ist, die höchstwahrscheinlich in CCP2 zu lokalisieren ist.

Einzig die Ergebnisse der Zelllinie SK6CD46_{p2} widersprechen der Annahme einer zweiten Bindungsdomäne im bovinen CCP2-Modul. Trotz Austausch von bovinem CCP2 in porcines CCP2 wurden eine deutliche Steigerung der Bindung und der Empfänglichkeit dieser Zelllinie für BVDV festgestellt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die hohe Sequenzübereinstimmung von porcinem und bovinem CCP2 sein, die nur zu einer geringfügigen Veränderung des CD46_{bov} Moleküls führt.

Im Empfänglichkeitsnachweis der Zelllinien SK6CD46_{p1}, SK6CD46_{1(b/p)}, SK6CD46_(A40LPTES45), SK6CD46_{p1(G40QVLAL45)}, SK6 porc. CD46_(G40QVLAL45) und porc. CD46_{b1} waren nach erfolgter Induktion Werte festzustellen, die um das 10 bis 50fache unter dem Wert der Negativkontrolle (SK6-Zellen) lagen. Gemeinsam ist diesen fünf Zelllinien, dass bei den durchgeführten Austauschen jeweils CCP1 verändert wurde. Sie unterscheiden sich jedoch in der Größe des Austausches und es handelt sich sowohl um CD46_{bov} exprimierende Zellen, denen porcine Austausche zugefügt wurden, als auch um CD46_{porz} exprimierende Zellen, in denen sechs bovine Aminosäuren oder das komplette bovine CCP1 Molekül ersetzt wurden. Offensichtlich bewirkt die Überexpression eines funktionslosen CD46 Moleküls in SK6-Zellen eine Verringerung der basalen Empfänglichkeit. Es kann angenommen werden, dass hierbei eine kompetitive Hemmung von bislang unbekanntem zellulären Faktoren erfolgt, die für die BVDV Invasion notwendig sind.

4.2 Charakterisierung der Bindungsdomäne im BVDV Glykoprotein E2

Im [³H] Bindungstest wurde eindeutig nachgewiesen, dass BVDV an CD46_{bov} bindet, unbeantwortet blieb jedoch die Frage nach dem tatsächlichen viralen Liganden. Durch den Aufbau von Pestiviren, die eine Lipidhülle mit drei eingelagerten Glykoproteinen (E1, E2 und E^{ms}) besitzen, kamen für die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor drei Liganden in Frage.

Für das Glykoprotein E1 wird angenommen, dass es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990). Aufgrund dieser Daten kommen vor allem die BVDV Glykoproteine E2 und E^{ms} als Bindungspartner für CD46_{bov} in Betracht. Um die Bindung dieser Glykoproteine an CD46_{bov} zu untersuchen, wurde ein Zelladsorptionstest etabliert. Hierfür wurden E2 und E^{ms} sowohl von BVDV als auch von KSPV durch C-terminale Fusion mit der Influenzavirus Hemagglutinin Transmembrandomäne und der zytosolischen Domäne fusioniert und auf der Oberfläche von BHK-Zellen exprimiert (Zhou et al., 1998). Als Indikatorzellen wurden 38A₁D-Zellen, die das CD46_{bov} stabil exprimieren (38A₁D CD46) mit einem zytoplasmatischen Fluoreszenzfarbstoff markiert und mit E2 bzw. E^{ms} exprimierenden BHK-Zellen inkubiert. Ausschließlich bei den BVDV E2 exprimierenden BHK-Zellen wurde eine Bindung von 38A₁D CD46 Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie festgestellt. Mit den im Zelladsorptionstest erzielten Ergebnissen wurde BVDV E2 eindeutig als Bindungspartner von CD46_{bov} identifiziert. Das deckt sich mit den bislang über BVDV E2 und E^{ms} veröffentlichten Daten. Neutralisierende Antikörper werden im Verlaufe einer Infektion mit Pestiviren vorwiegend gegen E2 und in geringerem Umfang gegen E^{ms}, aber nicht gegen E1 gebildet werden (Weiland et al., 1992). Zusätzlich bewirkte die Immunisierung von Schweinen mit aufgereinigtem E2- und E^{ms}- Protein einen belastbaren Schutz vor der Schweinepest, während das mit E1-Protein nicht gelang (König et al., 1995). Weiterhin konnte mit in Insektenzellen synthetisierten, gereinigten KSPV Glykoproteinen E2 und E^{ms} die Infektion von porzinen und bovinen Zellen mit den Pestiviren BVDV und KSPV kompetitiv gehemmt werden (Hulst et al., 1997). Allerdings war eine deutlich höhere Konzentration von E^{ms} (100 µg/ml) gegenüber E2 (10 µg/ml) erforderlich, um eine vollständige Inhibition der KSPV Infektion zu erzielen. Dieser deutliche Konzentrationsunterschied weist daraufhin, dass die beiden Hüllproteine vermutlich mit verschiedenen Strukturen auf der Zelloberfläche interagieren. Zusätzlich konnte für den BVDV Stamm P515 eine Interaktion von E^{ms} mit verschiedenen Glukosaminoglykanen (Heparin, Fucoidan, Dermatansulfat), die auch eine Hemmung der

Virusinfektion durch Präinkubation der Zellen mit diesen Substanzen bewirken, festgestellt werden (Iqbal et al., 2000).

Kürzlich wurde für Hepatitis C Virus, ein mit Pestiviren verwandtes Mitglied der *Flaviviridae*, durch Bindungsversuche mit dem Glykoprotein E2 das CD81 Molekül als potentieller Rezeptor identifiziert (Pileri et al., 1998). Durch die Bindung an Rezeptoren auf der Zielzelle sollen die Glykoproteine E1 und E2 von HCV die Infektion, Membranfusion und den sich anschließenden „entry“ des Virus vermitteln.

Nachdem die Ergebnisse des Zelladsorptionstests BVDV E2 als CD46_{bov}-rezeptorbindenden Liganden bestätigt hatten, sollten die für die Bindung relevanten Aminosäuren im E2 identifiziert werden. Dabei wurde ähnlich vorgegangen wie bei den Chimären von CD46.

Für die Herstellung von BVDV E2-Chimären konnten Sequenzabschnitte von KSPV E2 verwendet werden, da es im Zelladsorptionstest keine Bindung an CD46_{bov} gezeigt hatte. Weiterhin zeigte sich im Sequenzvergleich der beiden Glykoproteine ein hoher Grad an Übereinstimmung, wodurch zunächst eine Fokussierung auf die variablen Bereiche sinnvoll erschien. Unter Berücksichtigung dieser variablen Bereiche wurden insgesamt 14 E2-Chimären etabliert. Die Eingrenzung der für die Bindung relevanten Aminosäuren erfolgte nach dem Prinzip des Funktionsverlustes („loss of function“). Hierfür wurden in die BVDV E2 Sequenz große KSPV Sequenzabschnitte eingefügt und die entstandenen Chimären im Zelladsorptionstest auf Bindung von CD46_{bov} untersucht. War keine Bindung mehr feststellbar, wurden die von KSPV stammenden Sequenzabschnitte verkleinert, bis 38A₁D CD46 Zellen wieder gebunden wurden. In einem ersten Schritt wurden sechs Glykoprotein E2-Chimären etabliert, wobei die Übergänge der BVDV in die KSPV und der KSPV in die BVDV Aminosäuresequenz bei aa29, aa122 und aa184 lagen. Nur die Chimäre pE2_(p1-29/b30-397) wies Bindung auf. Anschließend wurden drei weitere E2-Chimären etabliert, um die für die Bindung notwendige BVDV E2 Sequenz weiter einzugrenzen. Diese Chimären enthielten aa1-223, aa1-274 und aa65-397 der BVDV E2 Sequenz und zeigten im Zelladsorptionstest keine Bindung CD46_{bov} exprimierender Zellen. Hiermit wurde deutlich, dass der für die Bindung verantwortliche Anteil der BVDV E2 Sequenz verloren gegangen war. Anschließend wurden weitere vier E2-Chimären etabliert, die aa1-293, aa1-312, aa46-397 und aa56-397 und damit einen deutlich erhöhten Anteil der BVDV E2 Sequenz enthielten. Die Vergrößerung des BVDV E2 Sequenzanteils führte im Zelladsorptionstest zu Bindung von CD46_{bov} an alle vier E2-Chimären. Schließlich lag es nahe, die beiden E2-Chimären mit den umfangreichsten N- und C-terminalen KSPV Anteilen zu kombinieren und eine weitere E2-Chimäre (pE2_(p1-56/b57-293/p294-396)) zu erstellen. Für diese E2-Chimäre wurde

im Zelladsorptionstest Bindung nachgewiesen und somit die für die Bindung essentielle BVDV E2 Sequenz auf den Bereich von aa57-293 eingegrenzt.

In der N-terminalen Hälfte des Glykoproteins E2 des KSPV Stamm Brescia konnten mit Hilfe von 13 mAk vier Antikörperbindungsdomänen (A, B, C und D) identifiziert werden (van Rijn et al., 1993). Anschließend wurden neutralisierende mAk, die die Epitope A, B und C erkannten, eingesetzt, um mAk-resistente KSPV E2-Mutanten zu isolieren (van Rijn et al., 1994). Mit diesen E2-Mutanten konnten zwei voneinander unabhängige Antikörperbindungsdomänen identifiziert werden (Epitope B und C und Epitop A) (Abb.37). Für die Etablierung eines KSPV Glykoprotein E2 Modells, das auf diesen Antikörperbindungsdaten basiert, wurden sowohl die beiden voneinander unabhängigen Antikörperbindungsdomänen, als auch die für die Proteinfaltung essentiellen Cysteine berücksichtigt (Abb.37). Da die Cysteine der BVDV und KSPV E2 Sequenzen weitgehend konserviert sind, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Modell auch auf das E2 von BVDV übertragbar ist.

Die vorgeschlagene Struktur der Antikörperbindungsdomäne A kann mit den Zelladsorptionsdaten in Einklang gebracht werden. Diese Domäne liegt im Sequenzbereich der für die Bindung an BVDV E2 notwendig ist. Obwohl die Antikörperbindungsdomänen B und C nicht im Bereich zwischen aa57 und aa293 liegen, kann die Bindung neutralisierender Antikörper an diese Domänen durch sterische Behinderung der Rezeptorbindungsdomäne die Infektion hemmen. (Abb39).

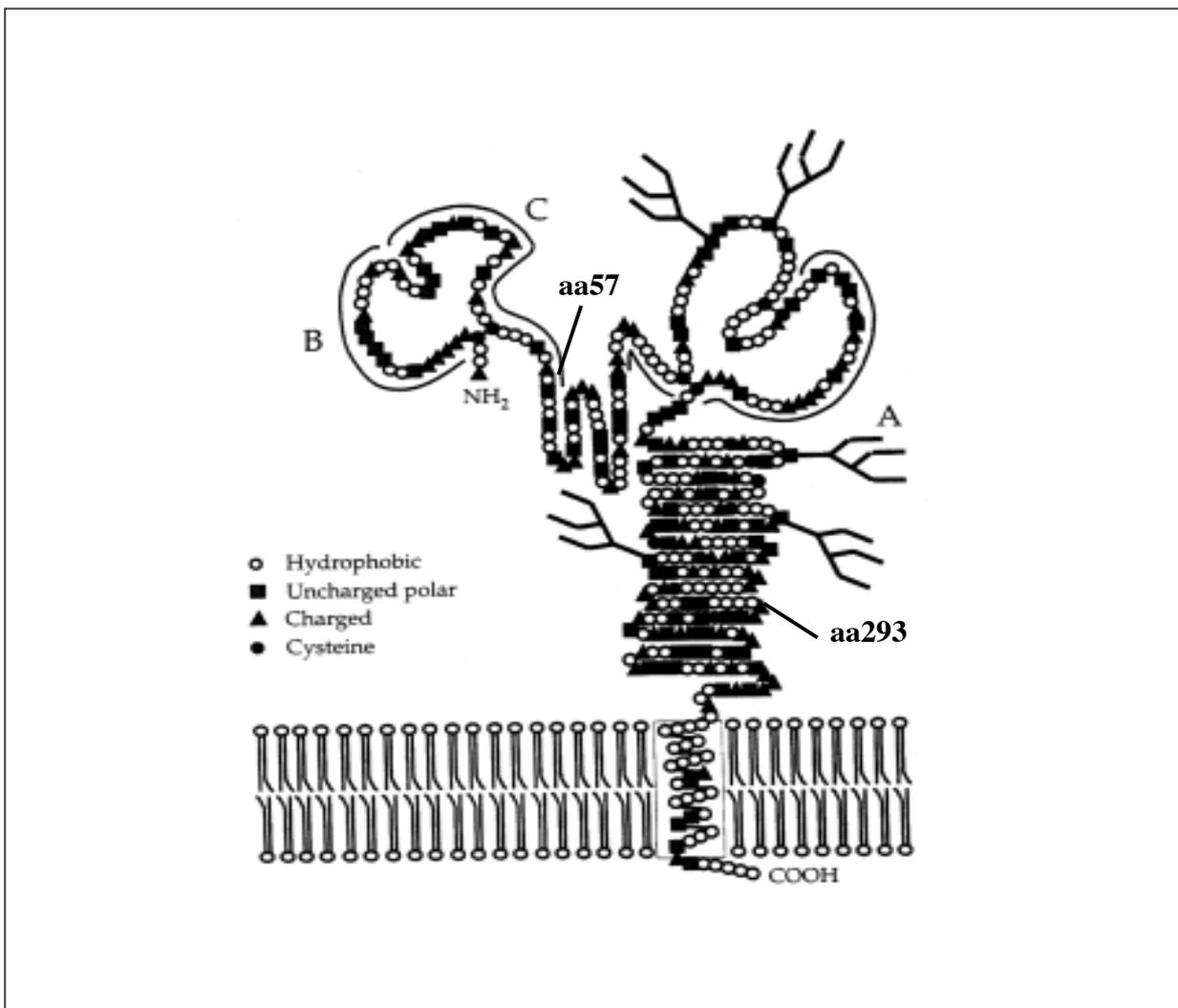


Abb.39: KSPV Glykoprotein E2 Modell (aus van Rijn et al., 1994)

In diesem auf Antikörperbindungsdaten basierendem Modell wurden die Aminosäuren in folgende Gruppen eingeteilt: ○ hydrophobe Aminosäuren (A, G, M, I, L, V, F, W, P); ■ ungeladene Aminosäuren (N, Q, S, T, Y); ▲ geladene Aminosäuren (D, E, K, R, H) und ● Cysteine (C). Zusätzlich wurden die aa57 und aa293, die den Bereich der im Zelladsorptionstest für die Bindung an CD46_{bov} identifizierten „Minimalsequenz“ des BVDV E2 umfassen, eingezeichnet.

Mit Hilfe der E2-Chimäre (pE2_(p1-56/b57-293/p294-396)) konnte die für die Bindung an CD46_{bov} benötigte BVDV E2 Sequenz auf den Bereich von aa57-293 eingegrenzt werden. Mit den bislang etablierten E2-Chimären wurde im Zelladsorptionstest ausschließlich Bindung festgestellt. In einem alternativen Ansatz sollten die Chimären im Virus auf ihre Funktion bei Infektion untersucht werden.

Die ersten „lebensfähigen“ KSPV/BVDV-Chimären wurden aus dem KSPV Stamm C, einem Impfvirus, und den Glykoproteinen E2 und E^{ms} des BVDV Stamm 5250 für die Herstellung

einer Markervakzine etabliert (van Gennip et al., 2000). Nachdem diese KSPV/BVDV-Chimären auch nach mehreren Zellkulturpassagen keine Veränderungen der eingefügten BVDV E2 und E^{rms} Sequenzen aufwiesen, wurde dieses System als stabile Grundlage für weitere Experimente angesehen.

Als Grundlage zur Klärung der Funktionalität der E2-Chimären wurde ein rekombinanter KSPV Gesamtklon (rKSPV) verwendet, in den die identifizierte „Minimalsequenz“ des BVDV E2 (rKSPV E2_(aa57-293 BVDV)) eingesetzt wurde. Mit dieser Gesamtklonchimäre war die Bestimmung der Vermehrungsfähigkeit und die Infektiosität und somit der biologischen Aktivität des chimären E2 Proteins möglich. Gleichzeitig konnten hiermit die Probleme der variierenden Transfektionseffizienzen und der lediglich qualitativen Erfassung von Bindung umgangen werden.

Der Einsatz der Gesamtklonchimäre rKSPV E2_(aa57-293 BVDV) funktionierte im Gegensatz zu den bisher etablierten Glykoprotein E2-Chimären nach dem Prinzip des Funktionsgewinns („gain of function“), da nur ein kleiner BVDV E2 Sequenzabschnitt in die KSPV Gesamtklonsequenz eingefügt wurde. SK6-Zellen wurden mit Transkripten von rKSPV und rKSPV E2_(aa57-293 BVDV) transfiziert und nach 24h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Mit diesen Überständen wurden sowohl SK6 als auch MDBK-Zellen infiziert, um einen Hinweis über das Infektionsverhalten der Gesamtklone zu erhalten. Die hierbei für rKSPV E2_(aa57-293 BVDV) erzielten Ergebnisse erlauben es, von einem Wirtswechsel zu sprechen, für den der Einbau der BVDV E2 Sequenz von aa57-293 verantwortlich ist. Während rKSPV E2_(aa57-293 BVDV) MDBK-Zellen mit einer Effizienz von 22,5% und SK6-Zellen mit 3,1% infizierte, lag die Empfänglichkeit von SK6-Zellen für rKSPV bei 100% und von MDBK-Zellen bei 8,4%. Um die für den Wirtswechsel verantwortliche BVDV E2 Sequenz im KSPV Gesamtklon weiter einzuengen, wurde die BVDV E2 Sequenz von aa57-293 auf aa57-274 verringert. Auch diese Gesamtklonchimäre zeigte einen Wirtswechsel. Für rKSPV E2_(aa57-274BVDV) wurden Empfänglichkeitswerte von 2,8% für SK6-Zellen und von 17,6% für MDBK-Zellen ermittelt. Interessanterweise gelang mit der E2-Chimäre (pE2_(b1-274/p275-397)), welche die aa1-274 der BVDV Glykoprotein E2 Sequenz enthält kein Bindungsnachweis im Zelladsorptionstest.

Um die für den Wirtswechsel verantwortliche Aminosäuresequenz von BVDV E2 im KSPV Gesamtklon weiter einengen zu können, wurden Gesamtklonchimären erzeugt, bei denen jeweils einzelne variable Aminosäuresequenzbereiche ausgetauscht wurden. Diese vier variablen Bereiche umfassen **I**: aa49-63, **II**: aa87-93, **III**: aa142-149 und **IV**: aa166-175 der BVDV E2 Sequenz. Hierbei wurde die bereits für die Bindung von E2-Chimären im CD46_{bov}

identifizierte essentielle „Minimalsequenz“ berücksichtigt und variable Bereiche in dem Sequenzabschnitt von aa57-293 ausgesucht.

Mit der Verwendung eines rekombinanten KSPV Gesamtklons als Grundlage zur Etablierung von Gesamtklonchimären und dem Austausch mehrerer variabler Bereiche sollte berücksichtigt werden, dass die Bindungsdomäne sehr wahrscheinlich auf verschiedenen, nicht zusammenhängenden Sequenzabschnitten liegt. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der E2-Chimären gestützt, die verdeutlichen, dass sowohl der Einbau eines größeren N-terminalen als auch C-terminalen Sequenzabschnittes von KSPV Glykoprotein E2 zum Bindungsverlust führten.

Diese vier im Sequenzvergleich auffälligen variablen Bereiche wurden zuerst einzeln in den Gesamtklon rKSPV eingefügt. Nachdem jedoch für SK6-Zellen und MDBK-Zellen eine insgesamt deutlich verringerte Empfänglichkeit festgestellt wurde, wurden die variablen Bereiche jeweils in Kombination von zwei und anschließend sogar drei Austauschungen in den Gesamtklon eingesetzt (Abb.36). Auch hierbei wurden für diese Gesamtklonchimären keine erhöhten Empfänglichkeitswerte für MDBK-Zellen nachgewiesen. Um die letzte Kombinationsmöglichkeit dieser vier variablen Bereiche auf den Einfluss der Empfänglichkeit von MDBK-Zellen zu testen, wurde eine weitere Gesamtklonchimäre etabliert, die alle vier variablen Bereiche von BVDV E2 enthält. Für diese Chimäre konnten für die SK6-Zellen und MDBK-Zellen nur sehr geringe Empfänglichkeitswerte festgestellt werden. Ein Wirtswechsel war nicht zu ermitteln. Offensichtlich umfassen diese vier getesteten variablen Bereiche nicht die für die Empfänglichkeit essentiellen Domänen des BVDV Glykoproteins E2.

4.3 Fazit

In dieser Arbeit wurde die Bindung von [³H]-Uridin markiertem BVDV an CD46_{bov} exprimierende Zellen nachgewiesen und zusammen mit der CD46 bedingten Steigerung der Empfänglichkeit von porzinen Zellen wurden für CD46_{bov} die Kriterien, um als zellulärer Rezeptor dienen zu können, eindeutig erfüllt. Die Bindungsstelle von BVDV im CD46 Molekül konnte durch Deletions-, Insertions- und Austauschmutagenesen lokalisiert werden. Hierbei wurde CCP1 eindeutig als essentiell für die Bindung und Infektion identifiziert. Durch sogenannte „loss of function“-Mutanten konnte eine wichtige Funktion der sechs in der N-terminalen Hälfte von CCP1 lokalisierten Aminosäuren G₄₀QVLAL₄₅ festgestellt werden.

Während ein auf 3 CCP-Domänen verkürztes CD46 keine Rezeptorfunktion mehr besitzt, lieferte die Insertion zusätzlicher CCP-Domänen Hinweise für die mögliche Beteiligung von CCP2 an der BVDV Bindung und Infektion.

Für das BVDV Glykoprotein E2, stellt sich die Situation schwieriger dar. In einem Zelladsorptionstest konnte E2 als viraler Ligand identifiziert und die für die Bindung notwendige Aminosäuresequenz mittels E2-Chimären auf aa57-293 eingegrenzt werden. Die Funktionalität dieser E2-Chimären wurde durch Herstellung von KSPV/BVDV E2 Gesamtklonchimären überprüft. Für die Gesamtklonchimären rKSPV E2_(aa57-293 BVDV) und rKSPV E2_(aa57-274 BVDV) konnte anhand der Empfänglichkeitswerte von SK6 und MDBK-Zellen ein Wirtswechsel festgestellt werden. Gesamtklonchimären, die Austausche von variablen Sequenzbereichen enthielten, führten zu keiner weiteren Eingrenzung der für den Wirtswechsel verantwortlichen Aminosäuresequenz.

Die Charakterisierung des zellulären Rezeptors CD46 konnte im Rahmen dieser Arbeit weitgehend abgeschlossen werden. Offen bleibt die Frage nach der Lokalisation einer zweiten Bindungsstelle im CD46 Molekül.

Hingegen wurden bei der Charakterisierung der E2 Bindungsdomäne vorläufige Ergebnisse erzielt, die nur eine Einengung auf 236 Aminosäuren erlauben. Als Ursache hierfür kommen die komplexe Struktur des E2 Glykoproteins und die im Virion stattfindende Dimerisierung von E1 und E2 in Frage. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass durch die Herstellung der Gesamtklonchimären andere Funktionen von E2, wie z. B. die Fusion (Garry und Dash, 2002) betroffen sind. Weitere Analysen sind notwendig um die für die Bindung und Infektion einzelnen, essentiellen Aminosäuren im BVDV Glykoprotein E2 zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass es sich beim bovinen CD46 um einen möglichen zellulären Rezeptor für das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) handelt, wurden die molekularen Interaktionen zwischen diesem Molekül und dem Virus näher untersucht und folgende Ergebnisse erzielt:

1. Durch Etablierung eines sensitiven Bindungstests konnte die Adsorption von [³H]-Uridin markiertem BVDV an CD46_{bov} exprimierende Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Zusammen mit einer CD46 bedingten Steigerung der Empfänglichkeit von porzinen Zellen (SK6-Zellen) sind die Kriterien erfüllt, um CD46_{bov} als zellulären Rezeptor für BVDV zu bezeichnen.
2. Die Bindungsstelle von BVDV im modular aus 4 CCP-Domänen aufgebauten CD46 Molekül wurde durch 4 Deletions-, 2 Insertions- und 17 Austauschmutationen lokalisiert. Ein auf 3 CCP-Domänen verkürztes CD46 besitzt keine Rezeptorfunktion mehr. Durch homologe Austausche der CCP Module mit porzinem CD46 konnte CCP1 eindeutig als essentiell für die BVDV Bindung und Infektion identifiziert werden. Die Feinkartierung der Bindungsstelle ergab eine wichtige Funktion der sechs in der C-terminalen Hälfte von CCP1 lokalisierten Aminosäuren G₄₀QVLAL₄₅. Die Insertion von zusätzlichen CCP-Domänen in CD46 lieferte Hinweise für die mögliche Beteiligung von CCP2 an der BVDV Bindung und Infektion.
3. Mit Hilfe eines Zelladsorptionstests konnte das Glykoprotein E2 von BVDV NADL als CD46_{bov}-bindender Ligand identifiziert werden. Weder das E2 Glykoprotein vom Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) noch E^{rms} von BVDV zeigten eine Bindung. Durch Austausch homologer Bereiche im E2 von BVDV und KSPV gelang die Einengung des CD46_{bov} bindenden Bereichs auf die Aminosäuren 57-293. Hierfür wurden 14 E2-Chimären etabliert. Die weitere Untersuchung chimärer E2 Moleküle mit Hilfe reverser Genetik ergab, dass die Anwesenheit der Aminosäuren 57-293 des BVDV E2 im KSPV E2 zu einem Wirtswechsel führte, denn bovine Zellen waren deutlich besser zu infizieren als porzine Zellen.

6. Summary

The working hypothesis that bovine CD46 acts as a possible cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was the basis for the examination of the interactions between this molecule and the virus. The following results were obtained:

1. Specific binding of [³H]-uridine labeled BVDV to CD46_{bov} expressing cells was unambiguously shown. This together with the CD46 mediated increase of the susceptibility of porcine cells (SK6 cells) towards BVDV strongly suggests that CD46_{bov} acts as a cellular receptor for BVDV.
2. The BVDV binding domain in the CD46 molecule which consists of 4 modular CCP-Domains was identified by construction of 4 deletions, 2 insertions and 17 exchange mutations. The truncated CD46 molecule containing only 3 CCP modules displayed no receptor function. Homologous exchanges of the CCP modules with those of porcine CD46 revealed that bovine CCP1 is essential for BVDV binding and infection. 6 amino acids (G₄₀QVLAL₄₅) in the C-terminal half of CCP1 were mapped as an important binding domain. The insertion of additional CCP-Domains into the CD46 molecule suggests that CCP2 is involved in BVDV binding and infection.
3. Using a cell adsorption assay the BVDV NADL glycoprotein E2 could be identified as CD46_{bov}-binding ligand. Neither for classical swine fever virus (CSFV) E2 nor BVDV E^{ns} binding to CD46_{bov} was detected.

By exchanging homologous domains in E2 of BVDV and CSFV and by establishing 14 E2-chimeras a binding domain between amino acid 57-293 could be mapped.

Further investigations of glycoprotein E2-chimeras using reverse genetics revealed that the insertion of amino acids 57-293 of BVDV E2 into CSFV E2 led to a change in host range. The modified CSFV infected bovine cells more efficiently than porcine cells.

7. Literaturverzeichnis

- Agnello, V.**, Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q.-X. (1999); Hepatitis C virus and other flaviviruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *PNAS* **96**,12766-12771
- Akeson, A. L., Woods, C. W.** (1993); A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J. Immunol. Methods* **163**, 181-5
- Akula, S. M.**, Pramod, M. P., Wang, F. Z., and Chandran, B. (2001); Human herpesvirus 8 envelope-associated glykoprotein B interacts with heparansulfate-like moieties. *Virology* **284**, 235-249.
- Allander, T.**, Forn, X., Emerson, S. U., Purcell, R. H. and Bukh, J. (2000); Hepatitis C virus envelope protein E2 binds to CD81 of tamarins. *Virology* **277**, 358-67.
- Andrews, D. W.** (2000); Transport across membranes: a question of navigation. *Cell* **102**, 139-44.
- Avalos-Ramirez, R.**, M. Orlich, M., Thiel, H.-J., and Becher, P. (2001); Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* **286**, 456-465.
- Barilla-LaBarca, M. L.**, Liszewski, M. K., Lambris, J. D., Hourcade, D. and Atkinson, J. P. (2002); Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J. Immunol.* **168**, 6298-304.
- Barlow, R. M.**, Rennie, J. C., Gardiner, A. C., and Vantsis, J. T. (1980); Infection of pregnant sheep with the NADL strain of bovine virus diarrhoea virus and their subsequent challenge with border disease IIB pool. *J. Comp. Path.* **90**, 67-72.
- Bartz, R.**, Firsching, R., Rima, B., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (1998); Differential receptor usage by measles virus strains. *J. Gen. Virol.* **79**, 1015-25.
- Baxi, M. K.**, Deregt, D., Robertson, J., Babiuk, L. A., Schlapp, T. and Tikoo, S. K. (2000); Recombinant bovine adenovirus type 3 expressing bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 induces an immune response in cotton rats. *Virology* **278**, 234-43.
- Becher, P.**, Orlich, M., König, M. and Thiel, H. J. (1999); Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhoea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.* **73**, 5646-53.
- Becher, P.**, Orlich, M., Kosmidou, A., König M., Baroth, M., and Thiel, H.-J. (1999); Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* **262**, 64-71.
- Becher, P.**, Orlich, M., and Thiel, H.-J. (1998); Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.* **72**, 5165-5173.

- Becher, P.**, Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., König M., and Thiel, H.-J. (1997); Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* **78**, 1357-1366.
- Behrens, S.-E.**, Grassmann, C. W., Thiel, H.-J., Meyers, G., and Tautz, N. (1998); Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* **72**, 2364-2372.
- Bergelson, J. M.**, Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1997); Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-23.
- Berger, E. A.**, Murphy, P. M., and Farber, J. M. (1999); Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Ann. Rev. Immunol.* **17**, 657-700.
- Bernhardt, G.**, Bibb, J. A., Bradley, J., and Wimmer, E. (1994); Molecular characterization of the cellular receptor for poliovirus. *Virology* **199**, 105-110.
- Borrow, P.**, Oldstone, M. B. A., (1994); Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* **198**, 1-9.
- Borrow, P.**, Evans, C. F., and Oldstone, M. B. A., (1995); Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J. Virology* **69**, 1059-1070.
- Branza-Nichita, N.**, Durantel, D., Carrouée-Durantel, S., Dwek, R. A., and Zitzmann, N. (2001); Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhoea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J. Virol.* **75**, 3527-3536.
- Bruschke, C. J. M.**, Hulst, M. M., Moormann, R. J. M., van Rijn, P. A., and van Oirschot, J. T. (1997); Glycoprotein E^{ms} of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol.* **71**, 6692-6696.
- Buchholz, C. J.**, Koller, D., Devaux, P., Mumenthaler, C., Schneider-Schaulies, J., Braun, W., Gerlier, D. and Cattaneo, R. (1997); Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J. Biol. Chem.* **272**, 22072-9.
- Buchholz, C. J.**, Schneider, U., Devaux, P., Gerlier, D. and Cattaneo, R. (1996); Cell entry by measles virus: long hybrid receptors uncouple binding from membrane fusion. *J. Virol.* **70**, 3716-23.
- Buckland, R. and Wild, T.F.** (1997); Is CD46 the receptor for measles virus? *Virus Res.* **48**, 1-9.
- Byrnes, K. J.**, Griffin, D. E. (1998); Binding of sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J. Virology* **72**, 7349-7356.
- Campadelli-Fiume, G.** (2000); Virus receptor arrays, CD46 and human herpesvirus 6. *Trends Microbiol.* **8**, 436-8.

- Casasnovas, J. M.**, Larvie, M. and Stehle, T. (1999); Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *Embo J.* **18**, 2911-22.
- Castro, A. G.**, Hauser, T. M., Cocks, B. G., Abrams, J., Zurawski, S., Churakowa, T., Zoni, F., Robinson, D., Tnagye, S. G., Aversa, G., Nichols, K. E., DeVries, J. E., Lanier, L. L., and O'Garra, A. (1999); Molecular and functional characterization of mouse signalling lymphocyte activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* **163**, 5860-5870.
- Chan-Fook, C.**, Jiang, W. R., Clarke, B. E., Zitzmann, N., Maidens, C., McKeating, J. A. and Jones, I. M. (2000); Hepatitis C virus glycoprotein E2 binding to CD81: the role of E1E2 cleavage and protein glycosylation in bioactivity. *Virology* **273**, 60-6.
- Chen, Y.**, Magiure, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D. Linhardt, R. J., and Marks, R. M. (1997); Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine* **3**, 866-871.
- Christiansen, D.**, De Sousa, E. R., Loveland, B., Kyriakou, P., Lanteri, M., Wild, F. T. and Gerlier, D. (2002); A CD46CD[55-46] chimeric receptor, eight short consensus repeats long, acts as an inhibitor of both CD46 (MCP)- and CD150 (SLAM)-mediated cell-cell fusion induced by CD46-using measles virus. *J. Gen.Virol.* **83**, 1147-55.
- Christiansen, D.**, Devaux, P., Reveil, B., Evlashev, A., Horvat, B., Lamy, J., Rabourdin-Combe, C., Cohen, J. H. and Gerlier, D. (2000); Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* **74**, 4672-8.
- Christiansen, D.**, Loveland, B., Kyriakou, P., Lanteri, M., Escoffier, C. and Gerlier, D. (2000); Interaction of CD46 with measles virus: accessory role of CD46 short consensus repeat IV. *J. Gen. Virol.* **81**, 911-7.
- Chung, C. S.**, Hsiao, J. C., Chang, Y. S., and Chang, W. (1998); A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 1577-1585.
- Collett, M. S.**, Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K., and Purchio, A. F. (1988a); Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* **165**, 191-199.
- Collett, M. S.**, Larson, R., Belzer, S. K., and Retzel, E. (1988b); Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200-208.
- Collett, M. S.**, Anderson, D. K., and Retzel E. (1988c); Comparison of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the *flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* **69**, 2637-2643.
- Collett, M. S.**, Wiskerchen, M., Welniak, E., and Belzer, S. K. (1991); Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. Virol. Suppl.* **3**, 19-27.
- Compton, S. R.**, Stephensen, C. B., Snyder, S. W., Weismiller, D. G., and Holmes, K. V. (1992). Coronavirus species specificity: murine coronavirus binds to a mouse-specific epitope on its carcinoembryonic antigen-related receptor glycoprotein. *J. Virol.* **66**, 7420-7428.

- Deng, R. & Brock, K. V.** (1992); Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* **191**, 867-869.
- Devaux, P.**, Buchholz, C. J., Schneider, U., Escoffier, C., Cattaneo, R. and Gerlier, D. (1997); CD46 short consensus repeats III and IV enhance measles virus binding but impair soluble hemagglutinin binding. *J. Virol.* **71**, 4157-60.
- Dimitrov, D. S.** (2000); Cell biology of virus entry. *Cell* **101**, 697-702.
- Doms, R. W.** (2000); Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology* **276**, 229-37.
- Dörig, R. E.**, Marcil, A., Chopra, A. and Richardson, C. D. (1993); The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**, 295-305.
- Dörig, R. E.**, Marcil, A., and Richardson, C. D. (1994); Membrane cofactor protein CD46 is a receptor for measles virus that determines host specificity. In: Wimmer, E.(Ed.). *Cellular receptors for animal viruses*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Drummer, H. E.**, Wilson, K. A. and Pountourios, P. (2002); Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J. Virol.* **76**, 11143-7.
- Dubuisson, J. & Rice, C. M.** (1996); Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* **70**, 778-786.
- Dunne, H. W.** (1973); Hog cholera (European swine fever). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **17**, 315-359, review.
- Durantel, D.** (2001); Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* **75**, 8987-8998.
- Edwards, S.**, Fukusho, A., Lefèvre, P. C., Lipowski, A., Pejsak, S., Roehe, P., and Westergaard, J. (2000); Classical swine fever: the global situation. *Vet. Microbiol.* **73**, 103- 119.
- Elbers, K.**, Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rüménapf, T., and Thiel, H.-J. (1996); Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**, 4131-4135.
- Ellgaard, L. & Helenius, A.** (2001); ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 431-437.
- Erlenhöfer, C.**, Wurzer, W. J., Löffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (2001); CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J. Virol.* **75**, 4499-505.
- Erlenhöfer, C.**, Duprex, W. P., Rima, B. K., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (2002); Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J. Gen. Virol.* **83**, 1431-6.

- Evlashv, A.**, Moyses, E., Valentin, H., Azocar, O., Trescol-Biemont, M. C., Marie, J. C., Rabourdin-Combe, C. and Horvat, B. (2000); Productive measles virus brain infection and apoptosis in CD46 transgenic mice. *J. Virol.* **74**, 1373-82.
- Firsching, R.**, Buchholz, C. J., Schneider, U., Cattaneo, R., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (1999); Measles virus spread by cell-cell contacts: uncoupling of contact-mediated receptor (CD46) downregulation from virus uptake. *J. Virol.* **73**, 5265-73.
- Flint, M.**, Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. and McKeating, J. A. (1999); Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J. Virol.* **73**, 6235-44.
- Flint, M.**, Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S. and McKeating, J. A. (1999); Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J. Virol.* **73**, 6782-90.
- Flores, E. F.**, Donis, R. O. (1995); Isolation of a mutant cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus infection due to a block in viral entry. *Virology* **208**, 565-575.
- Flores, E. F.**, Kreutz, L. C. and Donis, R. O. (1996); Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. *J. Gen. Virol.* **77**, 1295-303.
- Fray, M. D.**, Supple, E. A., Morrison, W. I. and Charleston, B. (2000); Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. *J. Gen. Virol.* **81**, 1669-73.
- Garry, R. F. and Dash, S.** (2003); Proteomics computational analysis suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* **307**, 255-265.
- Grassmann, C. W.**, Isken, O., Tautz, N. and Behrens, S. E. (2001); Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J. Virol.* **75**, 7791-802.
- Greenstone, H. L.**, Santoro, F., Lusso, P. and Berger, E. A. (2002); Human herpesvirus 6 and measles virus employ distinct CD46 domains for receptor function. *J. Biol. Chem.* **277**, 39112-8.
- Griffin, D. E. and Bellini, W. J.** (1996); Measles Virus, pp. 1267-1312 in Fields, B. N., Kneipe, D. M., Howley, P. M. (Eds). *Fields Virology*, 3. Ausgabe. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Grummer, B.**, Beer, M., Liebler-Tenorio, E. and Greiser-Wilke, I. (2001); Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 2597-605.
- Harada, T.**, Tautz, N., and Thiel, H.-J. (2000); E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* **74**, 9498-9506.
- Harouse, J. M.**, Laughlin, M. A., Pletcher, C., Friedman, H. M., and Gonzalez-Scarano, F. (1991); Entry of human immunodeficiency virus-1 into glial cells proceeds via an alternative, efficient pathway. *J. Leukocyte Biology* **49**, 605-609.

- Harpin, S.**, Hurley, D. J., Mbikay, M., Talbot, B. and Elazhary, Y. (1999); Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *J. Gen. Virol.* **80**, 3137-44.
- Hashimoto, K.**, Ono, N., Tatsuo, H., Minagawa, H., Takeda, M., Takeuchi, K. and Yanagi, Y. (2002); SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* **76**, 6743-9.
- Haywood, A. M.** (1994); Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J. Virol.* **68**, 1-5.
- Heinz, F. X.**, Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M., and Thiel, H.-J. (2000); Family Flaviviridae. In "Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner, Eds.), 859-878. Academic Press, San Diego
- Higginbottom, A.**, Quinn, E. R., Kuo, C. C., Flint, M., Wilson, L. H., Bianchi, E., Nicosia, A., Monk, P. N., McKeating, J. A. and Levy, S. (2000); Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J. Virol.* **74**, 3642-9.
- Hirano, A.**, Yant, S., Iwata, K., Korte-Sarfaty, J., Seya, T., Nagasawa, S. and Wong, T. C. (1996); Human cell receptor CD46 is down regulated through recognition of a membrane-proximal region of the cytoplasmic domain in persistent measles virus infection. *J. Virol.* **70**, 6929-36.
- Horzinek, M.**, Reczko, E., and Petzoldt, K. (1967); On the morphology of hog cholera virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **21**, 475-478.
- Horzinek, M.**, Maess, J., and Laufs, R. (1971); Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **33**, 306-318.
- Horvat, B.**, Rivaller, P., Varior-Krishnan, G., Cardoso, A., Gerlier, D. and Rarourdin-Combe, C. (1996); Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J. Virol.* **70**, 6673-81.
- Hsu, E. C.**, Dorig, R. E., Sarangi, F., Marcil, A., Iorio, C. and Richardson, C. D. (1997); Artificial mutations and natural variations in the CD46 molecules from human and monkey cells define regions important for measles virus binding. *J. Virol.* **71**, 6144-54.
- Hsu, E. C.**, Sabatinos, S., Hoedemaeker, F. J., Rose, D. R. and Richardson, C. D. (1999); Use of site-specific mutagenesis and monoclonal antibodies to map regions of CD46 that interact with measles virus H protein. *Virology* **258**, 314-26.
- Hulst, M. M.**, Westera, D. F., Wensvoort, G., and Moormann, R. J. M. (1993); Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J. Virol.* **67**, 5435-5442.

- Hulst, M. M.**, Himes, G., Newbigin, E., and Moormann, R. J. M. (1994); Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* **200**, 558-565.
- Hulst, M. M. & Moormann, R. J.** (1997); Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E^{rns} and E2 of classical swine fever virus: E^{rns} and E2 interact with different receptors. *J. Gen. Virol.* **78**, 2779-2787.
- Hulst, M. M.**, Panoto, F. E., Hoekman, H. G. P., van Gennip, H. G. P., and Moormann, R. J. M. (1998); Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{rns} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. *J. Virol.* **72**, 151-157.
- Hulst, M. M.**, van Gennip, H. G. and Moormann, R. J. (2000); Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E^{rns}. *J. Virol.* **74**, 9553-61.
- Hulst, M. M.**, van Gennip, H. G. P., Vlot, A. C., Schooten, E., Smit, A. J., and Moormann, R. J. M. (2001); Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J. Virol.* **75**, 9585-9595.
- Hulst, M. M. & Moormann, R. J.** (2001); E^{rns} protein of pestiviruses, pp. 431-440 in *Methods and Enzymology*, volume 342, Ribonucleases part B, Nicholson, A. W. (Ed), Academic Press, USA.
- Hung, S.-H.**, Lee, P.-L., Chen, H.-W., Chen, L.-K., Kao, C.-L., and King, C.-C. (1999); Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* **257**, 156-167.
- Iqbal, M.**, Flick-Smith, H., and McCauley, J. (2000); Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{rns} with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.* **81**, 451-459.
- Iqbal, M. and McCauley, J. W.** (2002); Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E^{rns} of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J. Gen. Virol.* **83**, 2153-9.
- Iwata, K.**, Seya, T., Yanagi, Y., Pesando, J. M., Johnson, P. M., Okabe, M., Ueda, S., Ariga, H. and Nagasawa, S. (1995); Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46. *J. Biol. Chem.* **270**, 15148-52.
- Jackson, T.**, Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Cortyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W., and Kling, A. M. (1996); Efficient infection of cells in culture by type O foot and mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virology* **70**, 5282-5287.
- Johnston, I. C.**, ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. and Schneider-Schaulies, S. (1999); A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J. Virol.* **73**, 6903-15.
- Katayama, Y.**, Hirano, A. and Wong, T. C. (2000); Human receptor for measles virus (CD46) enhances nitric oxide production and restricts virus replication in mouse macrophages by modulating production of alpha/beta interferon. *J. Virol.* **74**, 1252-7.

- Källström, H.**, Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and Jonsson, A. B., (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *neisseria*. *Mol. Microbiol.* **25**,639-647.
- Källström, H.**, Gill, D. B., Albiger, B., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and Jonsson, A. B., (2001). Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol.* **3**, 133-143.
- Khor, I. W.**, Lin, T., Langedijk, J. P., Johnson, J. E. and Manchester, M. (2002); Novel strategy for inhibiting viral entry by use of a cellular receptor-plant virus chimera. *J. Virol.* **76**, 4412-9.
- Klatzmann, D.**, Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, and J.-C., Montagnier, L. (1994); T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768.
- Klimstra, W. B.**, Ryman, K. D., and Johnston, R. E. (1998); Adaptation of sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* **72**, 7357-7366.
- Knipe, D. M.** (1996); Virus-host cell interactions. In: Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*, 3. Ausgabe. Lippincott-Raven, Philadelphia, 274-292.
- König, M.**, Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R., and Thiel, H.-J. (1995); Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J. Virol.* **69**, 6479-6486.
- Koike, S.**, Horie, H., Ise, I., Okitsu, A., Yoshida, M., Iizuka, N., Takeuchi, K., Tategami, T., and Nomoto, A. (1990); The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J.* **9**, 3217-3222.
- Kouomou, D. W. and Wild, T. F.** (2002); Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture. *J. Virol.* **76**, 1505-9.
- Kurita-Taniguchi, M.**, Fukui, A., Hazeki, K., Hirano, A., Tsuji, S., Matsumoto, M., Watanabe, M., Ueda, S. and Seya, T. (2000); Functional modulation of human macrophages through CD46 (measles virus receptor): production of IL-12 p40 and nitric oxide in association with recruitment of protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to CD46. *J. Immunol.* **165**, 5143-52.
- Kurita-Taniguchi, M.**, Hazeki, K., Murabayashi, N., Fukui, A., Tsuji, S., Matsumoto, M., Toyoshima, K. and Seya, T. (2002); Molecular assembly of CD46 with CD9, alpha3-beta1 integrin and protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human macrophages through differentiation by GM-CSF. *Mol. Immunol.* **38**, 689-700.
- Lin, M.**, Lin, F., Mallory, M. and Clavijo, A. (2000); Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J. Virol.* **74**, 11619-25.

- Liszewski, M. K. and Atkinson, J. P.** (1992); Membrane cofactor protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **178**, 45-60.
- Liszewski, M. K.**, Leung, M., Cui, W., Subramanian, V. B., Parkinson, J., Barlow, P. N., Manchester, M. and Atkinson, J. P. (2000); Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *J. Biol. Chem.* **275**, 37692-701.
- Ludford-Menting, M. J.**, Thomas, S. J., Crimeen, B., Harris, L. J., Loveland, B. E., Bills, M., Ellis, S. and Russell, S. M. (2002); A functional interaction between CD46 and DLG4: a role for DLG4 in epithelial polarization. *J. Biol. Chem.* **277**, 4477-84.
- Lusso, P.**, Secciero, P., Crowley, R. W., Garzino-Demo, A., Bernemann, Z. N. and Gallo, R. C. (1994). CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: Interference with human immunodeficiency virus. *PNAS* **91**, 3872-3876.
- Maisner, A.**, Alvarez, J., Liszewski, M. K., Atkinson, D. J., Atkinson, J. P. and Herrler, G. (1996); The N-glycan of the SCR 2 region is essential for membrane cofactor protein (CD46) to function as a measles virus receptor. *J. Virol.* **70**, 4973-7.
- Maisner, A. and Herrler, G.** (1995); Membrane cofactor protein with different types of N-glycans can serve as measles virus receptor. *Virology* **210**, 479-81.
- Maisner, A.**, Schneider-Schaulies, J., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P. and Herrler, G. (1994); Binding of measles virus to membrane cofactor protein (CD46): importance of disulfide bonds and N-glycans for the receptor function. *J. Virol.* **68**, 6299-304.
- Maisner, A.**, Zimmer, G., Liszewski, M. K., Lublin, D. M., Atkinson, J. P. and Herrler, G. (1997); Membrane cofactor protein (CD46) is a basolateral protein that is not endocytosed. Importance of the tetrapeptide FTSL at the carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **272**, 20793-9.
- Manchester, M.**, Gairin, J. E., Patterson, J. B., Alvarez, J., Liszewski, M. K., Eto, D. S., Atkinson, J. P. and Oldstone, M. B. (1997); Measles virus recognizes its receptor, CD46, via two distinct binding domains within SCR1-2. *Virology* **233**, 174-84.
- Manchester, M.**, Eto, D. S., Valsamakis, A., Liton, P. B., Fernandez-Munoz, R., Rota, P. A., Bellini, W. J., Forthal, D. N. and Oldstone, M. B. (2000); Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* **74**, 3967-74.
- Manchester, M.**, Nanche, D. and Stehle, T. (2000); CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology* **274**, 5-10.
- Marsh, M. and Helenius, A.** (1989); Virus entry into animal cells. *Adv. Virus. Res.* **36**, 107-151
- Maurer, K.** (2002); Identifizierung eines zellulären Rezeptors für das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV): Reinigung, Klonierung und Expression des bovinen CD46 (MCP). Dissertation.

- Meola, A.**, Sbardellati, A., Bruni Ercole, B., Cerretani, M., Pezzanera, M., Ceccacci, A., Vitelli, A., Levy, S., Nicosia, A., Traboni, C., McKeating, J. and Scarselli, E. (2000); Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J. Virol.* **74**, 5933-8.
- Mendelsohn, C. L.**, Wimmer, E., and Racaniello, V. R. (1989); Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**, 855-862.
- Mendez, E.**, Ruggli, N., Collett, M. S., and Rice, C. M. (1998); Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cythogenicity. *J. Virol.* **72**, 4737-4745.
- Meyers, G.**, Rügenapf, T., and Thiel, H.-J. (1989); Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* **171**, 555-567.
- Meyers, G.**, Thiel, H.-J., and Rügenapf, T. (1996a); Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. *J. Virol.* **70**, 1588-1595.
- Meyers, G.**, Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J., and Kümmerer, B. M. (1996b); Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* **70**, 8606-8613.
- Meyers, G. & Thiel, H.-J.** (1996); Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus. Res.* **47**, 53-118, review.
- Miyagawa, S.**, Mikata, S., Tanaka, H., Ikawa, M., Kominami, K., Seya, T., Nishimune, Y., Shirakura, R. and Okabe, M. (1997); The regulation of membrane cofactor protein (CD46) expression by the 3' untranslated region in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 829-33.
- Moennig, V. & Plagemann, P. G.** (1992); The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* **41**, 53-98, review.
- Moormann, R. J.**, Warmerdam, P. A., van der Meer, B., Hulst, M. M., and van Rijn, P. A. (1996); Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J. Virol.* **70**, 763-770.
- Mori, Y.**, Seya, T., Huang, H. L., Akkapaiboon, P., Dhepakson, P. and Yamanishi, K. (2002); Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* **76**, 6750-61.
- Mumenthaler, C.**, Schneider, U., Buchholz, C. J., Koller, D., Braun, W. and Cattaneo, R. (1997); A 3D model for the measles virus receptor CD46 based on homology modeling, Monte Carlo simulations and hemagglutinin binding studies. *Protein Sci.* **6**, 588-97.
- Naniche, D.**, Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T. F., Rossi, B., Raboutdin-Combe, C. and Gerlier, D. (1993); Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* **67**, 6025-32.

- Naniche, D.**, Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R. M. and Oldstone, M. B. (2000); Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J. Virol.* **74**, 7478-84.
- Nielsen, L.**, Blixenkrone-Moller, M., Thylstrup, M., Hansen, N. J. and Bolt, G. (2001); Adaptation of wild-type measles virus to CD46 receptor usage. *Arch. Virol.* **146**, 197-208.
- Nomoto, A.**, Koike, S., and Aoki, J. (1994); Tissue tropism and species specificity of poliovirus infection. *Trends in Microbiol.* **2**, 47-51.
- Nussbaum, O.**, Broder, C. C., Moss, B., Stern, L. B., Rozenblatt, S. and Berger, E. A. (1995); Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J. Virol.* **69**, 3341-9.
- Okada, N.**, Liszewski, M. K., Atkinson, J. P. and Caparon, M. (1995). Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A *streptococcus*. *PNAS* **92**, 2489-2493.
- Ono, N.**, Tatsuo, H., Hidaka, Y., Aoki, T., Minagawa, H. and Yanagi, Y. (2001); Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* **75**, 4399-401.
- Ono, N.**, Tatsuo, H., Tanaka, K., Minagawa, H. and Yanagi, Y. (2001); V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J. Virol.* **75**, 1594-600.
- Panda, B. R.**, Kingsman, S. M. and Kingsman, A. J. (2000); Mutational analysis of the putative receptor-binding domain of moloney murine leukemia virus glycoprotein gp70. *Virology* **273**, 90-100.
- Patel, A. H.**, Wood, J., Penin, F., Dubuisson, J. and McKeating, J. A. (2000); Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J. Gen. Virol.* **81**, 2873-83.
- Paton, D.**, Gunn, M., Sands, J., Yapp, F., Drew, T., Vilcek, S. and Edwards, S. (1997); Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch. Virol.* **142**, 929-38.
- Pellerin, C.**, van den Hurk, J., Lecomte, J., and Tussen, P. (1994); Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**, 260-268.
- Phinney, B. S.**, Blackburn, K. and Brown, D. T. (2000); The surface conformation of Sindbis virus glycoproteins E1 and E2 at neutral and low pH, as determined by mass spectrometry-based mapping. *J. Virol.* **74**, 5667-78.
- Pileri, P.**, Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. and Abrignani, S. (1998); Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-41.

- Poole, T. L.**, Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A., and Collett, M.S. (1995); Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**, 750-754.
- Poranen, M. M.**, Daugelavicius, R. and Bamford, D. H. (2002); Common principles in viral entry. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 521-38.
- Purchio, A. F.**, Larson, R., and Collett, M. S. (1983); Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* **48**, 320-324.
- Putnak, J. R.**, Niranjana, K.-T., and Innis, B. L. (1997); A putative cellular receptor for dengue viruses. *Nature Medicine* **3**, 828-829.
- Rice, C. M.** (1996). Flaviviridae: The viruses and their replication, pp. 931-959; in Fields, B. N., Kneipe, D. M., Howley, P. M. (Eds). *Fields Virology*, 3. Ausgabe. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Ridpath, J. F.**, Bolin, S. R., and Dubovi, E. J. (1994); Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* **205**, 66-74.
- Ridpath, J. F. & Neill J. D.** (2000); Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea viruses. *J. Virol.* **74**, 8771-8774.
- Rinck, G.**, Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Tautz, N., and Thiel, H.-J (2001); A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J. Virol.* **75**, 9470-9482.
- Rijnbrand, R.**, van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J., and Bredenbeek. P. J. (1997); Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.* **71**, 451-457.
- Rodriguez, G.**, Oravacz, T., Yanagishita, m., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H., and Norcross, M. A. (1995); Mediation of human immunodeficiency type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* **69**, 2233-2239.
- Ruggli, N.**, Tratschin, J. D., Mittelholzer, C., and Hofmann, M. A. (1996); Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* **70**, 3478-3487.
- Rümenapf, T.**, Stark, R., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1991); Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *Virology* **65**, 589-597.
- Rümenapf, T.**, Unger, G., Strauss, J. H., and Thiel, H.-J. (1993); Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* **67**, 3288-3294.
- Rümenapf, T.**, Stark, R., Heimann, M., and Thiel, H.-J. (1998); N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.* **72**, 2544-2547.

- Sa-Carvalho, D.**, Rieder, E., Baxt, B., Rodatte, R., Tanure, A., and Mason, P. W. (1997); Tissue culture adaptation of foot and mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**, 5115-5123.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989); *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.**, Nicklen, S., and Coulsen, A. R. (1977); DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santiago, C.**, Bjorling, E., Stehle, T. and Casasnovas, J. M. (2002); Distinct kinetics for binding of the CD46 and SLAM receptors to overlapping sites in the measles virus hemagglutinin protein. *J. Biol. Chem.* **13**, 13.
- Santoro, F.**, Kennedy, P. E., Locatelli, G., Malnati, M. S., Berger, E. A. and Lusso, P. (1999); CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* **99**, 817-27.
- Schelp, C.**, Greiser-Wilke, I., Wolf, G., Beer, M., Moennig, V., and Liess, B. (1995); Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch. Virol.* **140**, 1997-2009.
- Schelp, C.**, Greiser-Wilke, I. and Moennig, V. (2000); An actin-binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells. *Virus Res.* **68**, 1-5.
- Schneider, R.**, Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E., and Thiel, H.-J. (1993); Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**, 1169-1171.
- Schneider, U.**, Von Messling, V., Devaux, P. and Cattaneo, R. (2002); Efficiency of measles virus entry and dissemination through different receptors. *J. Virol.* **76**, 7460-7.
- Schneider-Schaulies, J.** (2000); Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* **81**, 1413-29.
- Schneider-Schaulies, J.**, Schnorr, J. J., Schlender, J., Dunster, L. M., Schneider-Schaulies, S. and ter Meulen, V. (1996); Receptor (CD46) modulation and complement-mediated lysis of uninfected cells after contact with measles virus-infected cells. *J. Virol.* **70**, 255-63.
- Schneider-Schaulies, J.**, Dunster, L. M., Schwartz-Albiez, R., Krohne, G. and ter Meulen, V. (1995); Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus. *J. Virol.* **69**, 2248-56.
- Schweizer, M. and Peterhans, E.** (2001); Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J. Virol.* **75**, 4692-8.
- Sentsui, H.**, Nishimori, T., Kirisawa, R. and Morooka, A. (2001); Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus by antigenically different cytopathic virus. *Arch. Virol.* **146**, 993-1006.

- Seya, T.**, Hirano, A., Matumoto, M., Nomura, M. and Ueda, S. (1999). Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and structures. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1255-1260.
- Shaw, I. G.**, Winkler, C. E., and Terlecki, S. (1967); Experimental reproduction of hypomyelinogenesis congenita of lambs. *Vet. Rec.* **81**, 115-116
- Sieczkarski, S. B. and Whittaker, G. R.** (2002); Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* **83**, 1535-1545.
- Stark, R.**, Meyers, G., Rümenapf, T., and Thiel, H.-J. (1993); Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* **67**, 7088-7095.
- Steffens, S.**, Thiel, H. J., and Behrens, S.-E. (1999), The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J. Gen. Virol.* **80**, 2583-2590.
- Strandström, H.**, Veijalainen, P., Moennig, V., Hunsmann, G., Schwarz, H. and Schäfer, W. (1974); C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. *Virology* **57**, 175-188.
- Tardieu, M.**, Epstein, R. L. and Weiner, H. L. (1982); Interaction of viruses with cell surface receptors. *Int Rev Cyt* **80**, 27-61.
- Tatsuo, H.**, Ono, N., Tanaka, K. and Yanagi, Y. (2000); SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893-7.
- Tautz, N.**, Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E. J., and Thiel, H.-J. (1996); Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27-nucleotide insertion. *J. Virol.* **70**, 7851-7858.
- Tautz, N.**, Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1997); Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* **71**, 5415-5422.
- Tautz, N.**, Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S.-E., and Thiel, H.-J. (1999); Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J. Virol.* **73**, 9422-9432.
- Tautz, N.**, Kaiser, A., and Thiel, H.-J. (2000); NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* **273**, 351-363.
- Thiel H.-J.**, Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T., and Meyers, G. (1991); Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* **65**, 4705-4712.
- Thiel H.-J.**, Plagemann, P. W. G., and Moennig, V. (2001). Pestiviruses, pp. 1016-1022; in Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds). *Fields Virology*, 4. Ausgabe. Lippincott-Raven, Philadelphia.

- Tijssen, P.**, Pellerin, C., Lecomte, J., and van den Hurk, J. (1996); immunodominant E2 (gp53) sequence of highly virulent bovine viral diarrhoea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology* **217**, 356-361.
- Tsujimura, A.**, Nunoue, K., Inoue, N., Shida, K., Kurita-Taniguchi, M., Matsumoto, M., Nomura, M., Takeya, T. and Seya, T. (2001); Three soluble form messages of murine CD46 are produced through alternative mRNA splicing. *J. Biochem. (Tokyo)* **130**, 841-8.
- Tsukiyama-Kohara, K.**, Iizuka, N., Kohara, M. and Nomoto, A. (1992); Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **66**, 1476-1483.
- van Gennip, H. G. P.**, van Rijn, P. A., Widjojoatmodjo, M. N., de Smit, A. J. and Moormann, R. J. (2000); Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E^{rms} or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine* **19**, 447-59.
- van Rijn, P. A.**, van Gennip, H. G. P., de Meijer, E. J. and Moormann, R. J. (1993); Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia. *J. Virol.* **74**, 2053-2060.
- van Rijn, P. A.**, Miedema, G. K. W., Wensvoort, G., van Gennip, H. G. P. and Moormann, R. J. (1994); antigenic structure on envelope glykoprotein E1 of hog cholera virus. *J. Virol.* **68**, 3934-3942.
- van Rijn, P. A.**, Bossers, A., Wensvoort, G. and Moormann, R. J. (1996); Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J. Gen. Virol.* **77**, 2737-45.
- van Rijn, P. A.**, van Gennip, H. G., Leendertse, C. H., Brusckke, C. J., Paton, D. J., Moormann, R. J. and van Oirschot, J. T. (1997); Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* **237**, 337-48.
- Vantsis, V. T.**, Linklater, K. A., Rennie, J. C., and Barlow, R. M. (1979); Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of border disease. *J. Comp. Path.* **89**, 331-339.
- Varior-Krishnan, G.**, Trescol-Biemont, M. C., Nanche, D., Rabourdin-Combe, C. and Gerlier, D. (1994); Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties: virus binding, fusion, and replication; down-regulation by hemagglutinin; and virus uptake and endocytosis for antigen presentation by major histocompatibility complex class II molecules. *J. Virol.* **68**, 7891-9.
- Vassilev, V. B.**, Collett, M. S., and Donis, R. O. (1997); Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhoea virus that yield infectious transcripts. *J. Virol.* **71**, 471-478.
- Weiland, E.**, Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1990); Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* **64**, 3563-3569.

- Weiland, E.,** Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., and Thiel, H.-J. (1992); A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* **66**, 3677-3682.
- Weiland, F.,** Weiland, E., Unger, G., Saalmüller, A., and Thiel, H.-J. (1999); Localization of pestiviral envelope proteins E^{ms} and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J. Gen. Virol.* **80**, 1157-1165.
- White, J. M. and Littman, D. R.** (1989); Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**, 725-728.
- Wengler, G.,** Bradley, D. W., Collett, M. S., Heinz, F.H., Schlesinger, R. W., and Strauss, J. H. (1995) *Flaviviridae*. In F.A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G. P. Martelli, M.A. Mayo, and M.D. Summers (Eds.). *Virus Taxonomy. Sixth Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer Verlag, Wien, New York.
- Wiskerchen, M.,** Belzer, S. K., and Collett, M. S. (1991); Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* **65**, 4508-4514.
- Wiskerchen, M. & Collett, M. S.** (1991); Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus NS3 serine protease: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* **71**, 5312-5322.
- Wunschmann, S.,** Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N. and Stapleton, J. T. (2000); Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J. Virol.* **74**, 10055-62.
- Xu, J.,** Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S., and Rice, C. M. (1997); Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* **71**, 5312-5322.
- Xue, W. & Minocha, C.** (1993); Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* **74**, 73-79.
- Xue, W.,** Zhang, S. and Minocha, H. C. (1997); Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* **57**, 105-18.
- Yanangi, Y.** (2001); The cellular receptor for measles virus - elusive no more. *Rev. Med. Virol.* **11**, 149-156.
- Yant, S.,** Hirano, A. and Wong, T. C. (1997); Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. *J. Virol.* **71**, 766-70.
- Yu, H.,** Grassmann, C. W., and Behrens, S. E. (1999); Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virol.* **73**, 3638-3648.

Yu, M., Wang, L. F., Shiell, B. J., Morrissy, C. J. and Westbury, H. A. (1996); Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses. *Virology* **222**, 289-92.

Zhong, W., Gutshall, L. L. and Del Vecchio, A. M. (1998); Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* **72**, 9365-9369.

Zhou, Y., König, M., Hobom, G. and Neumeier, E. (1998); Membrane-anchored incorporation of a foreign protein in recombinant influenza virions. *Virology* **246**, 83-94.