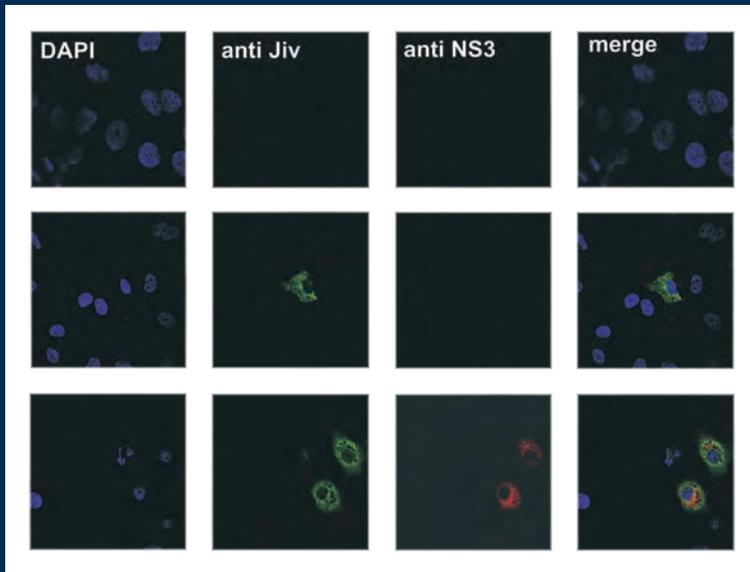


Funktionelle Untersuchung zur Wirtsfaktorabhängigkeit pestiviraler Replikation

Deborah Basso



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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 2009

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 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Norbert Tautz

Funktionelle Untersuchung zur Wirtsfaktorabhängigkeit pestiviraler Replikation

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

eingereicht von

Deborah Basso
Tierärztin aus Dortmund

Gießen 2009

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Tautz
Prof. Dr. Manfred Reinacher

Tag der Disputation: 19.02.2009

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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.



Sonderforschungsbereich 535

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden präsentiert/ Abstracts:

Third European Congress of Virology, Nürnberg, 2007 (Poster)

Deborah Basso, Heinz-Jürgen Thiel, Nobert Tautz

„Essential role of a host factor for the replication of certain pestivirus strains”

The Eighth International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses,

Washington D.C., 2007 (Poster)

Norbert Tautz, Deborah Basso, Heinz-Jürgen Thiel

„A Cellular Chaperone is Essential for RNA Replication of Certain Noncytopathogenic Pestivirus Strains”

18th Annual Meeting, Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 2008 (Vortrag)

Deborah Basso, Heinz-Jürgen Thiel, Nobert Tautz

„Correlation between host factor dependency and pestiviral persistence”

Meiner Familie und Tim

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	1
	Abbildungsverzeichnis	6
	Tabellenverzeichnis	9
	Abkürzungsverzeichnis	10
1	Einleitung und Zielsetzung	15
2	Literaturübersicht	17
2.1	Die Familie der Flaviviridae	17
2.2	Das Genus <i>Pestivirus</i>	18
2.2.1	Taxonomie und Wirtsspektrum	18
2.2.2	Aufbau und Genomorganisation	18
2.2.3	Die pestiviralen Proteine	20
2.2.4	Zytopathogenität der Pestiviren	23
2.2.4.1	Molekulare Grundlage der NS2-3 Spaltung	25
2.2.4.1.1	Zytopathogene Pestiviren mit Insertionen oberhalb des NS3	25
2.2.4.1.2	Jiv-Insertionen im Genom von zytopathogenen Pestiviren	26
2.2.4.1.3	Zytopathogene Pestiviren mit Mutationen im NS2	27
2.3	Durch Pestiviren verursachte Erkrankungen	28
2.3.1	Bovine Virus Diarrhoe/ Mucosal Disease	28
2.3.1.1	Pathogenese und Klinik	28
2.3.2	Border Disease der Schafe (BDV)	30
2.3.3	Klassische Schweinepest (KSP)	31
2.4	Jiv	32
2.4.1	Interaktion zwischen Jiv und BVDV	34
3	Material und Methoden	39
3.1	Material	39
3.1.1	Geräte	39
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	40
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	41
3.1.4	Lösungen und Puffer	43
3.1.5	Enzyme	45
3.1.6	Vorgefertigte Medien und Systeme („Kits“)	45
3.1.7	Basis-Plasmide	46

Inhaltsverzeichnis

3.1.8	Hergestellte Jiv-Expressionsplasmide.....	47
3.1.9	Gesamtklone.....	49
3.1.10	Real-Time PCR-Primer	49
3.1.11	Real-Time PCR-Sonden	50
3.1.12	Primer für RT-PCR, PCR, gerichtete Mutation und Klonierung.....	50
3.1.13	Sequenzierprimer 5' → 3'	51
3.1.14	siRNA.....	51
3.1.15	Eurkaryontische Zellen.....	52
3.1.16	Viren.....	53
3.1.17	<i>E. coli</i> K12-Stämme	54
3.1.18	Antikörper und Seren	54
3.2	Methoden	55
3.2.1	Arbeiten mit DNA	55
3.2.1.1	Präparation kompetenter Bakterien	55
3.2.1.2	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	56
3.2.1.3	Midi-Präparation von Plasmid-DNA und Konzentrationsbestimmung	56
3.2.1.4	Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken	57
3.2.1.5	Agarosegel-Elektrophorese von DNA und Isolation von DNA-Fragmenten.....	59
3.2.1.6	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i>	60
3.2.1.7	PCR, RT-PCR und Klonierung in pGEM-T.....	61
3.2.1.8	Gerichtete Mutagenese.....	63
3.2.1.9	Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen	64
3.2.2	Arbeiten mit RNA	66
3.2.2.1	<i>In vitro</i> -Transkription	66
3.2.2.2	RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	67
3.2.2.3	Isolierung von mRNA aus Gesamtzell-RNA.....	68
3.2.2.4	Real-Time RT-PCR	68
3.2.3	Arbeiten mit Proteinen.....	69
3.2.3.1	Immunpräzipitation.....	69
3.2.3.2	SDS-PAGE	70
3.2.3.3	Western Blot („ <i>semi-dry</i> “ Verfahren)	70
3.2.3.4	T7-Vacciniavirus Expressionssystem.....	71
3.2.4	Zellkulturtechniken	73

3.2.4.1	Allgemeine Zellkulturtechnik	73
3.2.4.2	Bestimmung der Zellzahl	73
3.2.4.3	Kryokonservierung von Zellen	74
3.2.4.4	Transiente Transfektion von Zelllinien	74
3.2.4.4.1	Transfektion von DNA in Huh7 Zellen mittels Lipofektion	74
3.2.4.4.2	Elektroporation von cRNA-Transkript in Huh7 Zellen	75
3.2.4.4.3	Transfektion von siRNA in Huh7 Zellen	75
3.2.4.5	Infektion von Zellen	75
3.2.4.5.1	Zur Durchführung einer Immunpräzipitation	75
3.2.4.6	Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen	76
3.2.4.6.1	Bestimmung der spezifischen Infektiosität von synthetischen RNA Transkripten und isolierter Gesamtzell-RNA aus infizierten Zellen	77
3.2.4.7	Immunfluoreszenz	78
3.2.4.7.1	Direkte Markierung eines monoklonalen Antikörpers	79
3.2.4.7.2	Färbung von Zellkernen mit DAPI	79
3.2.4.7.3	Einbetten von Präparaten	79
4	Ergebnisse	81
4.1	Replikation von BVDV in Huh7 Zellen	81
4.1.1	Transfektion von Huh7 Zellen mit zp BVDV-1 Gesamtklonen	83
4.1.2	Transiente Expression von Jiv erlaubt die Replikation von nzp BVDV-1 in Huh7 Zellen	85
4.1.3	Essentielle Bereiche des Jiv-Proteins, die für die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen benötigt werden	88
4.1.4	Einfluss von Jiv Tetra-Alaninmutanten auf die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen	93
4.1.5	Einfluss von Jiv90-Verkürzung auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen	97
4.2	Jiv-Abhängigkeit verschiedener Pestiviren	99
4.2.1	Replikation von verschiedenen Pestiviren in Huh7 Zellen	99
4.2.1.1	Gesamtkon: nzp BVDV-1 NCP7 393	100
4.2.1.2	Gesamtklon: CSFV Alfort Tübingen	101
4.2.1.3	Gesamtklon: CSFV Riems	101
4.2.1.4	Gesamtklon: CSFV Alfort/Riems Chimäre	102

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Untersuchung der Replikation weiterer Pestivirusstämme in Huh7 Zellen	104
4.2.2.1	Bovines Virusdiarrhoe Virus-1	105
4.2.2.2	Bovines Virusdiarrhoe Virus-2.....	107
4.2.2.3	Border Disease Virus	107
4.2.2.4	Classical Swine Fever Virus.....	108
4.2.3	NS2-3 Prozessierung verschiedener Pestiviren in bovinen Wirtszellen (MDBK)	109
4.2.3.1	Nzp BVDV-1.....	109
4.2.3.1.1	NS2-3 Prozessierung von aus dem Überstand elektroporierter Huh7 Zellen isolierten Viren.....	111
4.2.3.2	Zp BVDV-1	112
4.2.3.3	BVDV-2	112
4.2.3.4	BDV	113
4.2.3.5	CSFV	114
4.3	Untersuchung zu den molekularen Grundlagen des geringen Jiv-Spiegels in Huh7 Zellen	115
4.3.1	Untersuchungen auf mRNA-Ebene.....	115
4.3.1.1	Quantifizierung des Jiv-mRNA-Gehaltes von Huh7 Zellen.....	115
4.3.1.2	Sequenzanalyse der Jiv-mRNA in Huh7 Zellen	116
4.3.1.2.1	Funktionalität der Jiv-mRNA-Sequenz von Huh7-Zellen	121
4.3.2	Untersuchungen auf Protein-Ebene	123
4.3.2.1	Degradation des Jiv-Proteins in Huh7 Zellen	123
4.3.2.2	Ausdifferenzierung von Huh7 Zellen	124
4.3.2.2.1	Behandlung von Huh7-Zellen mit DMSO	124
4.3.2.3	Mögliche Mechanismen für die Translationsrepression von Jiv in Huh7 Zellen	125
4.3.2.3.1	Unterdrückung der Translationshemmung durch RNA-Interferenz	127
4.3.2.3.2	Auswahl der Zielsequenz zur Unterdrückung der Expression von RCK/54.....	127
4.3.2.3.3	Erstellung einer Positivkontrolle	129
4.3.2.3.4	siRNA induzierter Knockdown des RCK/p54-Proteins führt zur Disruption der P-bodies.....	130

4.3.2.3.5	Effekt der Translationsrepression des Proteins RCK/p54 auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A.....	131
5	Diskussion	133
5.1	Korrelation zwischen regulierter NS2-3 Prozessierung und Persistenz	133
5.2	Einfluss des zellulären J-Domänen Proteins Jiv auf die Replikation von nzp BVDV-1	135
5.3	Pestivirale Replikation in Huh7 Zellen	136
5.4	Wirtsfaktor-Mangel in Huh7 Zellen	137
5.4.1	Bereiche im Jiv90 mit Bedeutung für die NS2-3 Spaltung	137
5.4.2	Bereiche im Jiv90 mit Bedeutung für die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A	138
5.4.2.1	Jiv90-Varianten mit Alanin-Austauschen an den Positionen 39 und 59/60 des Jiv90 können die Replikation von nzp BVDV-1 in Huh7 Zellen nicht unterstützen.....	138
5.4.2.2	Tetra-Alanininsertionen in der Nähe des NS2-Bindepeptids von Jiv führen zum Verlust der Fähigkeit, die pestivirale Replikation zu fördern	139
5.4.2.3	Das Minimalfragment Jiv90 unterstützt die Replikation des ..Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen.....	140
5.5	Jiv-Abhängigkeit verschiedener Pestiviren	141
5.6	Molekulare Grundlagen für den Jiv-Mangel in Huh7 Zellen	143
5.7	Ausblick	147
6	Zusammenfassung	149
7	Summary	151
8	Literaturverzeichnis.....	153
	Danksagung	163

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Klassifikation der Pestiviren.....	17
Abb. 2:	Eigenschaften der Mitglieder des Genus <i>Pestivirus</i>	19
Abb. 3:	Genomaufbau und Polyproteinprozessierung bei Pestiviren	20
Abb. 4:	Insertion von Jiv-Sequenzen im NS2 von BVDV- und BDV- Isolaten	27
Abb. 5:	Zeitliche Regulation der NS2-3 Spaltung bei nzp BVDV-1	34
Abb. 6:	Überexpression von Jiv in Wirtszellen führt zu einem Biotypwechsel von nzp zu zp (Rinck et al., 2001)	35
Abb. 7:	Übersichtskarte der Aminosäuren von Jiv90 - modifizierte Abbildung (Lackner et al., 2005).....	37
Abb. 8:	Linearisierte DNA und synthetisches Transkript des Gesamtklons NCP7/Osloss	84
Abb. 9:	Transfektion von Huh7 Zellen mit cRNA Transkripten von nzp und zp BVDV-1 Stämmen	85
Abb.10:	Einfluss des Jiv-Proteins auf die Replikation von nzp BVDV-1 in Huh7 Zellen.....	87
Abb. 11:	Effekte von Alaninsubstitutionen in der Jiv90-Region des Jiv-Proteins auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen.....	91
Abb. 12:	NS2-3 Spaltungsinduktion von Tetra-Alaninmutanten des Jiv90 - Radioimmunpräzipitation	94
Abb. 13:	Einfluss von Tetra-Alaninmutanten des Jiv90 auf die NS2-3 Spaltungseffizienz.....	95
Abb. 14:	Einfluss von Jiv Tetra-Alaninmutanten auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen	96
Abb. 15:	Einfluss von Jiv90 und Jiv90 Verkürzungen auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen.....	98
Abb. 16:	Elektroporation von cRNA-Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7 393 in Huh7 Zellen.....	100
Abb. 17:	Elektroporation von cRNA-Transkript des Gesamtklons CSFV Alfort Tübingen in Huh7 Zellen.....	101
Abb. 18:	Elektroporation von genomischer viraler RNA des Gesamtklons nzp CSFV Riems in Huh7 Zellen	102

Abb. 19: Elektroporation von genomischer viraler RNA der Gesamtklon-Chimäre CSFV Alfort/Riems in Huh7 Zellen	103
Abb. 20: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus nzp BVDV-1 infizierten MDBK Zellen.....	106
Abb. 21: Elektroporation von transient Jiv exprimierenden Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus nzp BVDV-1 infizierten MDBK Zellen.....	106
Abb. 22: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus BVDV-2 infizierten MDBK Zellen.....	107
Abb. 23: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA, aus BDV X818 infizierten MDBK Zellen.....	108
Abb. 24: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus CSFV Brescia infizierten MDBK Zellen.....	108
Abb. 25: NS2-3 Spaltung verschiedener nzp BVDV-1 Stämme in MDBK Zellen...	110
Abb. 26: NS2-3 Prozessierung von selektionierten und passagierten nzp BVDV-1 Stämmen.....	111
Abb. 27: NS2-3 Spaltung des zp BVDV-1 Stamms CP7 zu verschiedenen Zeitpunkten	112
Abb. 28: NS2-3 Spaltung von verschiedenen nzp BVDV-2 Stämmen zu verschiedenen Zeitpunkten	113
Abb. 29: NS2-3 Spaltung in mit nzp BDV X818 infizierten MDBK Zellen.....	113
Abb. 30: NS2-3 Spaltung des nzp CSFV Alfort Tübingen zu verschiedenen Zeitpunkten (elektroporierte MDBK Zellen)	114
Abb. 31: Jiv-mRNA-Gehalt in Huh7 und MDBK Zellen	116
Abb. 32: Sequenzanalyse der Jiv-mRNA in Huh7 Zellen – Klonierungsstrategie ..	117
Abb. 33: Proteinsequenzvergleich von Jiv (Bos taurus, Genbank-Zugangsnummer: AY 027882) und dem Jiv-Protein aus Huh7 Zellen. Die Jiv90-Region ist in roten Lettern dargestellt.	121
Abb. 34: Die Jiv-mRNA von Huh7 Zellen kodiert für funktionales Jiv	122
Abb. 35: Elektroporation von genomischer viraler RNA des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A und des Replikons DI9 in mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelten Huh7 Zellen	124
Abb. 36: DMSO induzierte Ausdifferenzierung von Huh7 Zellen führt nicht zur Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A.....	125

Abbildungsverzeichnis

Abb. 37: Schema der Translationsrepression in humanen Zellen durch RNA-Interferenz, Abb. aus (Chu und Rana, 2006)	126
Abb. 38: Nukleinsäuresequenz des für das humane RCK/p54-Protein kodierenden ORFs – Genbank-Zugangsnummer: NM 004397	128
Abb. 39: Funktionskontrolle der verwendeten siRNAs	129
Abb. 40: Immunfluoreszenz nach Transfektion von Huh7 Zellen mit einer siRNA gegen das Protein RCK/p54	131

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Orthologe des Jiv-Proteins.....	33
Tab. 2: Auswirkungen des intrazellulären Jiv Gehaltes von Wirtszellen auf die Infektion mit nzp BVDV-1 (Lackner et al., 2005)	36
Tab. 3: Transfektion verschiedener Zelllinien mit genomischer viraler RNA des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A und des Replikons DI9	82
Tab. 4: Zur Untersuchung mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie eingesetzte Antikörper.....	86
Tab. 5: Vergleich zwischen der Fähigkeit von Jiv-Alaninmutanten die NS2-3 Spaltung zu induzieren und der Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen.....	92
Tab. 6: Vergleich zwischen der Fähigkeit von Jiv Tetra-Alaninmutanten die NS2-3 Spaltung zu induzieren und der Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen.....	97
Tab. 7: Vergleich zwischen der Fähigkeit von Jiv-Verkürzungen die NS2-3 Spaltung zu induzieren und der Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen	99
Tab. 8: Spezifische Infektiösität der aus infizierten MDBK Zellen isolierten Gesamtzell-RNA	104
Tab. 9: Übersicht über die zur Klonierung der Jiv-mRNA aus Huh7 Zellen verwendeten Primer und die untersuchten Klone.....	118

Abkürzungsverzeichnis

aa	" <i>amino acids</i> ", Aminosäuren
A	Ampere (Einheit der Stromstärke); Adenosin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure(n)
BDV	<i>Border Disease Virus</i>
BHK	" <i>baby hamster kidney</i> "-Zellen, Hamsternierenfibroblasten
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	Virus der Bovinen Virusdiarrhoe
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin; Core (Kapsidprotein)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	" <i>copy-DNA</i> ", zur RNA komplementäre DNA
cINS	zelluläre Insertion (cellular insertion); frühere Bezeichnung für Jiv
Ci	Curie
CIP	" <i>calf intestine phosphatase</i> ", alkalische Phosphatase
CMV	Zytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
CSFV	<i>Classical swine fever virus</i> , Virus der klassischen Schweinepest
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Cyanogen 3
d	Tag(e)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser

DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DMEM	" <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> "
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxyzyklin
dsRNA	" <i>double stranded RNA</i> ", doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E	" <i>Envelope protein</i> "; Hüllprotein in der Virusmembran
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESP	Europäische Schweinepest
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F	Farad, Einheit der elektrischen Kapazität
f	femto (10^{-15})
Fa.	Firma
FCS	" <i>fetal calf serum</i> ", fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanidin
G418	Geneticin
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GKID ₅₀	Gewebekultur-infektiöse Dosis 50%
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HC	„ <i>Hog Cholera</i> “
HCV	Hepatitis C-Virus
Hsp	" <i>heat shock protein</i> ", Hitzeschockprotein
Huh7	humane Hepatomzelllinie

Abkürzungsverzeichnis

HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
ICTV	„ <i>International Committee for Taxonomy of Viruses</i> “
i.d.R.	in der Regel
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IRD800	" <i>Infrared Dye</i> " 800
IRES	" <i>internal ribosome entry site</i> ", interne Ribosomeneintrittsstelle
Jiv	" <i>J-domain protein interacting with viral protein</i> "
Jiv90	90 Aminosäuren-Fragment des zellulären Jiv
Kb	Kilobasen
kDa	kDa, Kilo-Dalton, Einheit der Proteinmasse
KSP	Klassische Schweinepest
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
mAK	monoklonaler Antikörper
MD	Mucosal Disease
MDBK	" <i>Madin Darby Bovine Kidney</i> "-Zellen, Rindernierenfibroblasten
miRNA	„ <i>micro RNA</i> “
min	Minuten
mm	millimeter
MOI	"multiplicity of infection", Anzahl infektiöser Viren pro Zelle
MZI	Mehrzweckinstitut
mRNA	" <i>messenger-RNA</i> "
n	nano (10^{-9})
NADL	" <i>National Animal Disease Laboratory</i> "
NFAR	„ <i>Nuclear factor associated with RNA</i> “
nm	nanometer
N ^{pro}	N-terminale Protease
NS	Nichtstrukturprotein

nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	nicht translatierte Region einer RNA (= UTR, „ <i>untranslated region</i> “)
n.u.	nicht untersucht
nzp	nichtzytopathogen
OD600	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	" <i>open reading frame</i> ", offenes Leseraster
p	pico (10^{-12})
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	" <i>phosphate buffered saline</i> ", phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	" <i>polymerase chain reaction</i> ", Polymerase-Kettenreaktion
p. e.	<i>post electroporation</i> , nach der Elektroporation
PFU	„ <i>plaque forming units</i> “
p. i.	<i>post infectionem</i> , nach der Infektion
PI	persistent infiziert
PNK	Polynukleotidkinase
QC	QuikChange™, Methode zur gerichteten DNA- Mutagenese
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
shRNA	„ <i>short hairpin RNA</i> “
siRNA	„ <i>small interfering RNA</i> “
s.o.	siehe oben
ssRNA	" <i>single-stranded RNA</i> ", Einzelstrang-RNA

Abkürzungsverzeichnis

s.u.	siehe unten
T	Thymin
tRNA	" <i>transfer-RNA</i> "
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TDE	Translation Derepressionselement
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TRE	" <i>tetracyclin responsive element</i> "
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit), Uracil
u.a.	unter anderem
UCH	" <i>ubiquitin-C-terminal hydrolase</i> "
UV	ultraviolette elektromagnetische Strahlung
V	Volt (Einheit der Spannung)
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
W	Watt (Einheit der Leistung)
WB	Westernblot
w/v	Gewichtprozent
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem
zp	zytopathogen
ZPE	zytopathischer Effekt

1 Einleitung und Zielsetzung

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) ist der Erreger der Bovinen Virusdiarrhoe/ Mucosal Disease (BVD/MD), einer weltweit verbreiteten Rinderkrankheit. Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung 1946 im Zusammenhang mit Durchfallsproblematik bei Rindern (Olafson et al., 1946). BVD/MD gilt generell als eine der wirtschaftlich verlustreichsten Infektionskrankheiten des Rindes. Der Nachweis einer Infektion mit BVDV ist in Deutschland seit November 2004 anzeigepflichtig und wird durch die „Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe Virus“ geregelt. Die Verluste in Beständen mit BVDV Problematik sind auf einen schlechten Gesundheitsstatus der Herde zurückzuführen; vermehrt wird das Auftreten von Mastitiden, Klauenleiden, reduzierter Milchleistung und verminderter Fruchtbarkeit beobachtet.

Eine Besonderheit des Virus ist das Vorkommen von zwei Biotypen: aufgrund der Fähigkeit in infizierten Zellen einen zytopathischen Effekt zu induzieren, unterscheidet man nichtzytopathogene (nzp) und zytopathogene (zp) Stämme. Die Bekämpfung der Tierseuche beruht zu einem großen Teil auf der Erkennung und Aussonderung von persistent mit nzp Viren infizierten Rindern (PI-Tieren). Diese PI-Tiere sind zeitlebens Virusausscheider und stellen das Hauptansteckungsreservoir für empfängliche Tiere dar. Durch Rekombinationsereignisse bzw. Mutationen im Genom des persistierenden nzp Virus können im PI-Tier antigenetisch verwandte zp Viren entstehen, die verantwortlich für den Ausbruch der Mucosal Disease sind. Daneben können PI-Tiere auch durch eine Superinfektion mit einem antigenetisch eng verwandten zp Stamm an der stets letal verlaufenden Mucosal Disease erkranken.

BVDV ist ein Vertreter des Genus *Pestivirus*, welches gemeinsam mit den Genera *Hepaci-* und *Flavivirus* die Familie der *Flaviviridae* bildet. Pestiviren besitzen ein etwa 12,3 Kilobasen großes RNA-Genom von positiver Polarität, welches für ein Polyprotein kodiert. Dieses Polyprotein wird ko- und posttranslational durch virale und zelluläre Proteasen in die viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten.

Eine Gemeinsamkeit aller zp Viren ist die vermehrte Freisetzung des viralen Nichtstrukturproteins 3 (NS3), z.B. durch eine gesteigerte Spaltung des Vorläuferproteins NS2-3. Diese Freisetzung wird durch eine im pestiviralen

Nichtstrukturprotein 2 (NS2) lokalisierte Autoprotease katalysiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Autoprotease durch ein zelluläres Protein namens Jiv (*J-domain protein interacting with viral protein*) aktiviert wird. Studien über die NS2-3 Prozessierung ergaben, dass die Prozessierung in mit nsp Viren infizierten Zellen zeitlich reguliert ist (Lackner et al., 2004). Für die NS2-3 Spaltungsinduktion ist auch das Minimalfragment Jiv90 (siehe Kap. 2.4.1) hinreichend. Weitere Verkürzungen des Jiv90 können noch eine ineffiziente Spaltung von NS2-3 induzieren. Durch Mutationsstudien des Kofaktors Jiv konnte eine für die Induktion der NS2-3 Spaltung essentielle Aminosäure im Jiv90 identifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Testsystem zu etablieren, in welchem der Effekt von Aminosäureaustauschen in der relevanten Domäne des Jiv-Proteins sowie von Verkürzungen des Jiv-Proteins auf die Unterstützung der viralen Replikation in der Zellkultur untersucht werden kann. Mit diesem Assay sollte weiterführend abgeklärt werden, ob das Jiv-Protein bei der Replikation von Pestiviren eine essentielle Rolle spielt.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Familie der Flaviviridae

Die gültige Nomenklatur wird durch das *International Committee for Taxonomy of Viruses* (ICTV) festgelegt. Danach umfasst das Genus *Pestivirus* folgende Spezies: (I) Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe Typ 1 (BVDV-1), (II) das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe Typ 2 (BVDV-2), (III) das Virus der klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus* = CSFV), (IV) das Border Disease Virus des Schafes (BDV) und (V) das vor 30 Jahren in Kenia aus einer Giraffe isolierte Virus Giraffe-1, welches zunächst nur als vorläufige Spezies mit in das Genus aufgenommenen worden ist (Heinz et al., 2005). Aufgrund der Ähnlichkeiten u.a. in Hinsicht auf die Genomorganisation wurden die Genera *Hepacivirus*, *Flavivirus* und *Pestivirus* der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet (Heinz et al., 2005). Wichtige Vertreter des Genus *Flavivirus* sind human- und tierpathogene Viren wie z.B. das Gelbfieber-Virus, Dengue-Virus, Frühsommermeningoenzephalitis-Virus (FSME), West-Nil-Virus, Wesselbron Disease-Virus und Louping Ill-Virus. Dem Genus *Hepacivirus* wird das in der Humanmedizin bedeutende Hepatitis C-Virus (HCV) zugeordnet. Zu diesem Genus gehört als vorläufige Spezies das mit dem HCV eng verwandte GB-Virus B (GBV-B), das aus Neuweltaffen und Schimpansen isoliert worden ist (Bukh et al., 2001).

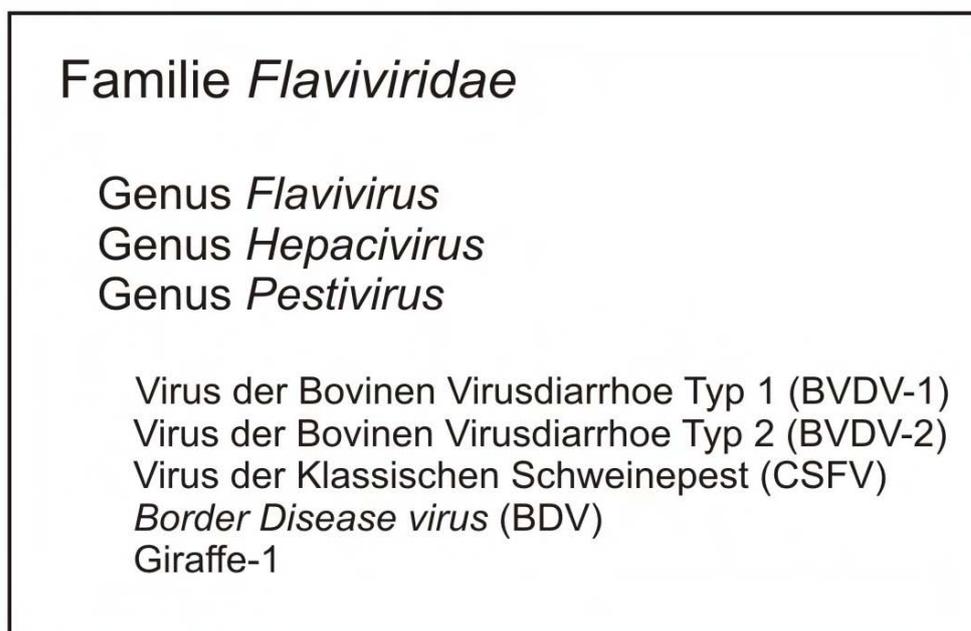


Abb. 1: Klassifikation der Pestiviren

2.2 Das Genus *Pestivirus*

2.2.1 Taxonomie und Wirtsspektrum

Die genetische und antigenetische Verwandtschaft der untersuchten Viren ist wichtiges Kriterium für die Klassifikation der Pestiviren. Die genetische Verwandtschaft wird über phylogenetische Analysen auf der Basis von kompletten Nukleinsäuresequenzen oder auch Teilsequenzen bestimmt (Ridpath und Bolin, 1995; Ridpath und Bolin, 1997; Becher et al., 1998; Avalos-Ramirez et al., 2001). Um Virusisolate einzuordnen, werden häufig die Sequenzen der 5'-NTR, der N^{Pro} oder auch der E2 kodierenden Regionen analysiert. Durch diese Untersuchungen konnten für BVDV-1 mittlerweile 12 Subgruppen gefunden werden (Vilcek, 2001; Vilcek et al., 2004).

Pestiviren infizieren ausschließlich Paarhufer. Die Nomenklatur der Pestiviren resultiert von der Wirtstierspezies, aus der sie zuerst isoliert wurden sowie den dabei beobachteten Krankheitssymptomen. Natürliche Schweinepestinfektionen konnten nur in Wild- und Hausschweinen nachgewiesen werden. Eine geringere Wirtsspezifität weisen die ruminanten Pestiviren BVDV-1, BVDV-2 und BDV auf. So konnte BDV nicht nur aus Schafen, sondern auch aus Schweinen und Rindern isoliert werden (Becher et al., 1997). Mit BVDV können neben Rindern auch kleine Wiederkäuer wie Schaf und Ziege sowie Wildwiederkäuer infiziert werden (Nettleton, 1990; Becher et al., 1997; Becher et al., 1999).

2.2.2 Aufbau und Genomorganisation

Pestiviren sind behüllte Viren und mit einem Durchmesser von 40 - 60 nm relativ klein. Die Lipidhülle beinhaltet die viralen Glykoproteine und umschließt neben der genomischen RNA das Nukleokapsidprotein Core (C). Das Genom liegt in Form einer einzelsträngigen RNA mit positiver Orientierung vor und besitzt eine Länge von annähernd 12,3 Kilobasen (Kb). Der einzige lange offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) wird am 5'- und 3'- Ende von nicht translatierten Regionen (NTRs) flankiert, deren Länge im 5'- Bereich etwa 380 Nukleotide umfasst und im nicht polyadenylierten 3'- Bereich von 188 - 276 Nukleotiden variieren kann (Becher et al., 1998). Eine besonders gefaltene RNA Struktur, die als interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES, *internal ribosomal entry site*) bezeichnet wird, ist in der 5'-NTR lokalisiert (Poole et al., 1995; Chon et al., 1998; Frolov et al., 1998; Rijnbrand et al., 18

2001). Durch dieses IRES-Element wird die Translation der viralen Gene initiiert. In diesem Punkt unterscheidet sich die pestivirale RNA deutlich von der mRNA eukaryontischer Zellen oder vieler anderer Plusstrang-Viren. Ein IRES-Element initiiert beispielsweise auch die Translation beim Hepatitis C Virus. Die Translationsinitiation der Pesti- und Hepaciviren ist somit von der durch eine 5'-Cap-Struktur initiierten Translation bei den Vertretern des Genus *Flavivirus* abzugrenzen (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Poole et al., 1995). Sequenzelemente und RNA-Strukturen in der 3'NTR haben essentielle Funktionen für die Virusreplikation. Durch Mutagenesestudien konnte der Einfluss von drei „stem-loop“-Strukturen auf die pestivirale Replikation gezeigt und essentielle sowie nicht-essentielle Regionen bestimmt werden (Yu et al., 1999; Isken et al., 2004; Pankraz et al., 2005). Daneben wird beschrieben, dass die vorkommenden Sequenz- und Strukturelemente der 3'NTR auch wichtige koordinative Aufgaben für die Translation übernehmen (Isken et al., 2004). Der ORF kodiert ein Polyprotein von ca. 4000 Aminosäuren; dieses Vorläuferprotein wird während und nach der Translation durch virale und zelluläre Enzyme in zwölf reife Proteine prozessiert (Lindenbach und Rice, 2001).

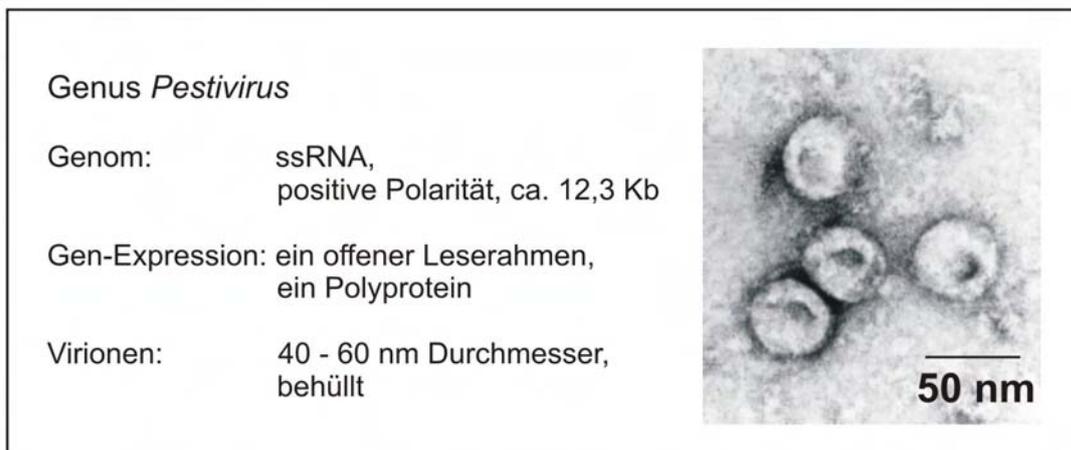


Abb. 2: Eigenschaften der Mitglieder des Genus *Pestivirus*

Pestiviren sind behüllte Viren mit einem Durchmesser von 40 - 60 nm. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität. Es existiert ein offener Leserahmen, der ein Polyprotein kodiert. Dieses Vorläuferprotein wird durch zelluläre und virale Enzyme in die funktionellen viralen Proteine zerlegt. Das elektronenmikroskopische Bild zeigt CSF-Virionen. (Foto: M. König, Institut für Virologie, JLU Gießen).

2.2.3 Die pestiviralen Proteine

Das translatierte Polyprotein wird durch zelluläre und virale Enzyme in die vier Strukturproteine Core (C), E^{rns}, E1 und E2 und in die acht Nichtstrukturproteine N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gespalten (siehe Abb. 3).

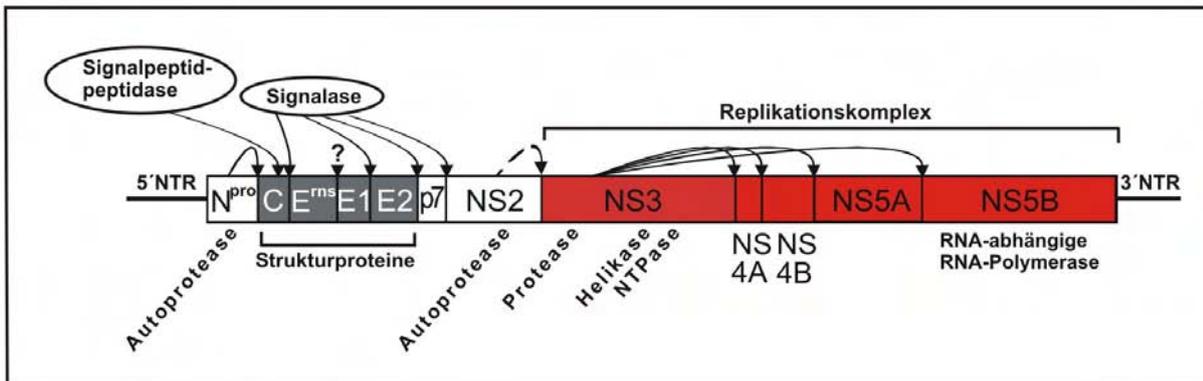


Abb. 3: Genomaufbau und Polyproteinprozessierung bei Pestiviren

Das pestivirale Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität. Die Translation wird durch ein IRES-Element initiiert. Der offene Leserahmen wird von nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert und kodiert ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren. Das Polyprotein wird ko- und posttranslational durch zelluläre und virale Enzyme in die vier Strukturproteine (grau) C, E^{rns}, E1 und E2 und in die acht Nichtstrukturproteine (weiß und rot) N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gespalten. In rot sind die für die virale Replikation wichtigen Proteine dargestellt.

Die N-terminale Protease N^{pro} ist das erste Protein, welches durch den ORF kodiert wird. Es hat Proteaseaktivität und erzeugt durch seine autokatalytische Aktivität den N-Terminus des im Polyprotein folgenden Kapsidproteins Core (Wiskerchen et al., 1991; Stark et al., 1993). Für die Replikation der Viren in der Zellkultur ist N^{pro} nicht erforderlich (Tratschin et al., 1998). Für CSFV wurde beschrieben, dass N^{pro} einen hemmenden Einfluss auf die angeborene Immunität hat (Ruggli et al., 2003). Eine Deletion von N^{pro} zieht bei CSFV eine erniedrigte Wachstumsrate in der Zellkultur und eine Attenuierung im Wirt nach sich (Mayer et al., 2004).

Das Kapsidprotein Core (C) und die glykosylierten Hüllproteine E^{rns}, E1, E2 sind die Strukturproteine des Virions (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1999). Das E in der Bezeichnung der Strukturproteine steht für Hülle (*envelope*). Das aus etwa 90 Aminosäuren bestehende Core-Protein wird C-terminal durch die zelluläre Signalase freigesetzt und durch die Signalpeptidpeptidase nachprozessiert (Heimann et al., 2006). Diese zellulären Proteasen sind im endoplasmatischen Retikulum der Zelle

lokalisiert und entfernen Signalpeptide von den N-terminalen Enden der translatierten Proteine. Aufgrund der basischen Aminosäuren hat das Core-Protein die Eigenschaft RNA zu binden und es wird vermutet, dass dies eine wichtige Rolle bei der RNA-Verpackung und der Virionmorphogenese spielt (Murray et al., 2008). E^{rns}, E1, E2 und p7 werden ebenfalls durch die Signalase freigesetzt, wobei für die Spaltung zwischen E^{rns} und E1 eine noch unbekannt zelluläre Protease verantwortlich gemacht wird (Rümenapf et al., 1993; Lin et al., 1994; Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000). Das E^{rns}-Protein ist ein wichtiger Bestandteil des pestiviralen Partikels, da eine gezielte Deletion des Gens zwar die RNA-Replikation, jedoch nicht die Bildung von infektiösen Partikeln erlaubt. E^{rns} hat eine intrinsische RNase-Aktivität und bildet über Disulfid-Brücken Homodimere aus. Die Abkürzung „rns“ steht für sezernierte Ribonuklease (ribonuclease secreted). E^{rns} kann auch in den extrazellulären Raum sezerniert werden (Rümenapf et al., 1991; Thiel et al., 1991; Rümenapf et al., 1993), wobei der größte Teil in der Zelle verbleibt (Fetzer et al., 2005). Sowohl die membrangebundene als auch die freie Form des E^{rns} besitzt Ribonuklease-Aktivität (Hulst et al., 1993; Schneider et al., 1993; Windisch et al., 1996). Die Membranbindung wird durch einen C-terminal gelegenen ungewöhnlichen Membrananker erreicht. Dieser besteht aus einer Kernregion von 11 Aminosäuren, jedoch werden für die ausreichende Bindung noch zusätzliche Aminosäuren benötigt (Fetzer et al., 2005). Durch die Inaktivierung der RNase-Funktion kommt es zur Attenuierung von CSFV und BVDV (Meyers et al., 1999; Meyer et al., 2002; Meyers et al., 2007). Es können verschiedene Molekulargewichte des Proteins (von 44 kDa bis 60 kDa) nachgewiesen werden, was durch das Vorkommen des Proteins in verschiedenen zellulären Kompartimenten mit unterschiedlichen Glykosylierungsformen begründet wird (Thiel et al., 1991). Es wurde gezeigt, dass eine C-terminal liegende membranaktive Struktur eine energie- und rezeptorunabhängige Aufnahme von E^{rns} in Zellen erlaubt (Langedijk, 2002).

Die Synthese von alpha- und beta-Interferon als Antwort auf das Vorkommen doppelsträngiger RNA (dsRNA), die während des Replikationszyklus von Viren in der Zelle entsteht, ist die erste Abwehr des Wirtes gegenüber der viralen Infektion. Diesen Abwehrmechanismus der „angeborenen Immunität“ (*innate immunity*) kann das virale Glykoprotein E^{rns} unterdrücken. Im Überstand von infizierten Zellen bindet E^{rns} dsRNA und baut diese ab; somit kann die Interferon-Induktion in der Zelle umgangen werden (Iqbal et al., 2004). Die exakte physiologische Rolle des E^{rns} ist

jedoch noch unklar. In E1 und E2 konnten C-terminale hydrophobe Sequenzen identifiziert werden, welche für die Membranverankerung dieser Proteine verantwortlich sind (van Zijl et al., 1991; Rümenapf et al., 1993). Die Strukturproteine sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden; in infizierten Zellen und in den Virionen können E^{ms}-Homodimere, E1/E2-Heterodimere und E2-Homodimere gefunden werden (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991). E2 ist bei Pestiviren für die Bindung der Virionen an den zellulären Rezeptor CD46 verantwortlich (Maurer et al., 2004). Im infizierten Tier können E^{ms} und E2 die Produktion neutralisierender Antikörper induzieren (Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1992) und lösen so eine schützende Immunität aus (Rümenapf et al., 1991; König et al., 1995).

Die Proteine E2 und NS2-3 sind durch das 6 bis 7 kDa große und hydrophobe p7-Protein voneinander getrennt (Elbers et al., 1996). Bisher wurde p7 nicht in Virionen gefunden (Harada et al., 2000) und wird daher zu den Nichtstrukturproteinen gezählt. Die Spaltung zwischen E2 und p7 wird ebenfalls durch die zelluläre Signalpeptidase katalysiert und ist unvollständig; daher kann in infizierten Zellen neben E2 und p7, ein E2/p7-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Harada et al., 2000). Wird die Spaltung zwischen E2 und p7 durch gezielte Mutation unterbunden, werden trotz stattfindender RNA-Replikation keine infektiösen Virionen mehr gebildet. Ungespaltene E2/p7 ist für die Virionmorphogenese hingegen nicht essentiell (Harada et al., 2000).

Auf das p7-Protein folgt das NS2-3; auch hier wird die zwischen p7 und NS2 stattfindende Spaltung durch die zelluläre Signalase realisiert. Die anschließende NS2-3 Prozessierung erfolgt durch eine Cystein-Autoprotease, die im NS2 lokalisiert ist und bei nzp Stämmen nur in der frühen Phase der Infektion von bovinen Wirtszellen aktiv ist (Lackner et al., 2004). Die Effizienz der NS2-3 Spaltung ist für verschiedene Pestiviren sehr unterschiedlich (Meyers und Thiel, 1996; Rice, 1996). Ist die Spaltung des Vorläuferproteins NS2-3 vollständig, so können keine infektiösen Partikel gebildet werden (Agapov et al., 2004). Eine sehr effiziente Spaltung führt zur Akkumulation von NS3 in der Zelle; es ist bekannt, dass dies mit der Zytotoxizität korreliert (siehe Kap. 2.2.4) und zu einem zytopathischen Effekt (ZPE) führt. Das Auslösen eines ZPEs kann jedoch nicht allein durch die hohe Freisetzung von NS3 erklärt werden, denn ein experimentell generiertes zytopathogenes (zp) Virus, welches eine Punktmutation im NS4B besitzt, löst, trotz einer hohen NS3 Expression und einer erhöhten Synthese viraler RNA, keine

Apoptose aus. NS3 besitzt NTPase-, Helikase- und Serinproteaseaktivität, es spaltet sich an seinem C-Terminus vom restlichen Polyprotein ab. Daneben ist die NS3-Protease auch für die weiteren Prozessierungen im Nichtstrukturbereich von NS4A bis NS5B verantwortlich (Collett et al., 1991; Meyers und Thiel, 1996; Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997). NS4A ist ein Kofaktor für die NS3-Protease (Tautz et al., 1997) und wird zusammen mit NS2-3 für die Bildung infektiöser Partikel benötigt (Moulin et al., 2007). Die Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5B bilden den Replikationskomplex (Tautz et al., 1994; Behrens et al., 1998a). Über die Rolle des NS5A im viralen Replikationszyklus ist noch nicht viel bekannt. Für HCV konnte gezeigt werden, dass dieses Phosphoprotein eine wichtige Funktion für das „*Assembly*“ der infektiösen Partikel besitzt (Appel et al., 2008). Das NS5A der Pestiviren ist ebenfalls phosphoryliert (Reed et al., 1998) und enthält wie das NS5A von HCV ein Zink-Bindemotiv. Mutationen im Zink-Bindemotiv führen zum Einbruch der RNA-Replikation, der genaue Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt (Tellinghuisen et al., 2006). NS5B ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus (Zhong et al., 1998; Kao et al., 1999; Steffens et al., 1999).

2.2.4 Zytopathogenität der Pestiviren

Eine Besonderheit bei Pestiviren ist das Auftreten von zwei Biotypen (Baker, 1987; Lindenbach und Rice, 2001). Aufgrund der Fähigkeit, einen zytopathischen Effekt (ZPE) in infizierten Zellen zu verursachen, unterscheidet man nichtzytopathogene (nzp) und zytopathogene (zp) Stämme. Die Infektion mit zp Viren führt zum Absterben der Zellen, vermutlich vermittelt durch Apoptose (Zhang et al., 1996; Hoff und Donis, 1997; Schweizer und Peterhans, 1999; Grummer et al., 2002). Die Veränderungen sind eine Vakuolisierung und Abkuglung der Zellen bis hin zur Ablösung der Zellen vom Zellverband, die sich als deutlicher zytopathischer Effekt zeigt. Die Infektion mit nzp Viren führt zu keinen zu morphologischen Veränderungen in der Zellkultur. Die Infektion eines immuninkompetenten Fetus während der Trächtigkeit (40. – 120. Tag) mit einem nzp Stamm (siehe auch Kap. 2.3.1) kann zur Persistenz des Virus führen. Der Nachweis des nzp Virus gelingt aus unterschiedlichen Organen und Geweben des infizierten Tieres, u.a. in Leukozyten (Bielefeldt Ohmann et al., 1987), im Gastrointestinaltrakt (McClurkin et al., 1985; Liebler et al., 1991), im Zentralen Nervensystem (Linnen et al., 1996) sowie in zahlreichen Zellen der Haut (Njaa et al., 2000; Cornish et al., 2005), jedoch scheint

bemerkenswerterweise immer nur eine begrenzte Anzahl von Zellen betroffen zu sein. Monate oder Jahre nach der Infektion mit dem persistierenden nzp Stamm können im PI-Tier zp Viren entstehen. Durch das Vorkommen des zp Virus steigt die Zahl der infizierten Zellen im Tier an (Liebler et al., 1991). Das betroffene Tier entwickelt die Mucosal Disease und stirbt innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Einsetzen der Krankheitssymptome. Aus dem an MD verendeten Tier werden immer zwei Virustypen (nzp und zp), ein sogenanntes Viruspaar, isoliert (McKercher et al., 1968; Brownlie et al., 1984; McClurkin et al., 1985; Wilhelmsen et al., 1991). Mittlerweile wurden zahlreiche Viruspaare aus an MD gestorbenen Tieren isoliert und sequenziert. Die Genomveränderungen des zp Virus beruhen meist auf RNA-Rekombinationen. Diese führen immer zu einer vermehrten Freisetzung von freiem NS3 (Meyers und Thiel, 1996; Kümmerer et al., 2000; Lindenbach und Rice, 2001). Die Rekombinationsereignisse finden wahrscheinlich häufig und zufällig statt; es treten jedoch nur die in Erscheinung, die zur Erkrankung des Tieres führen.

Die Strategien der NS3-Freisetzung aus dem Polyprotein von zp Viren sind sehr vielfältig. Man unterscheidet zwischen zp Stämmen mit integrierten zellulären Sequenzen und zp Stämmen ohne integrierte zelluläre Sequenzen (Meyers und Thiel, 1996). Die bisher am häufigsten gefundenen zellulären Sequenzen sind Ubiquitin-kodierende Sequenzen, ubiquitin-ähnliche Sequenzen und Sequenzen, welche für das Jiv-Protein kodieren (Meyers und Thiel, 1996). Jiv steht hierbei für „*J-domain-protein interacting with viral protein*“, früher wurde es auch als zelluläre Insertion bezeichnet (cINS, *cellular insertion*) (Rinck et al., 2001), (siehe auch Kap. 2.4.1). Sind keine zellulären Sequenzen beteiligt, so bestehen die Veränderungen im pestiviralen Genom aus Deletionen, Duplikationen oder Punktmutationen (Meyers und Thiel, 1996).

2.2.4.1 Molekulare Grundlage der NS2-3 Spaltung

Die oben beschriebenen Veränderungen im Polyprotein eines *zp* Virus führen zur vermehrten NS3 Freisetzung. Im folgenden sollen die hier aufgeführten Mechanismen genauer erklärt werden:

- eine zelluläre oder virale Insertion direkt oberhalb von NS3 führt zur Generierung des N-Terminus und der Freisetzung von NS3;
- die Integration eines Teils des zellulären Proteins Jiv in das Polyprotein induziert durch Aktivierung der NS2-Autoprotease die NS2-3-Spaltung und damit die Freisetzung von NS3;
- kleine Insertionen oder Punktmutationen im NS2 führen zur effektiven Spaltung von NS2-3 (Aktivierung der NS2-Protease).

2.2.4.1.1 Zytopathogene Pestiviren mit Insertionen oberhalb des NS3

Häufig nachgewiesene zelluläre Insertionstypen sind Ubiquitin und ubiquitin-ähnliche Sequenzen (Meyers und Thiel, 1996). Ubiquitin ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren großes Protein, das u.a. zur Markierung von Proteinen im Zellstoffwechsel dient, die abgebaut werden sollen (Hershko und Ciechanover, 1992). In der Zelle wird es als N-terminaler Anteil von Fusionsproteinen exprimiert (Finley et al., 1987; Finley et al., 1989; Redmann und Rechsteiner, 1989). Durch Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen (UCH), welche den C-Terminus des Ubiquitins generieren, werden die Ubiquitin-Monomere von den Fusionsproteinen abgespalten (Rechsteiner, 1987; Jonnalagadda et al., 1989; Mayer und Wilkinson, 1989; Baker et al., 1992; Jentsch, 1992). Das im viralen Polyprotein enthaltene Ubiquitin stellt ein zusätzliches Prozessierungssignal dar, welches von zellulären Proteasen erkannt wird (Tautz et al., 1993a). Die Ubiquitin-Insertionen in den Genomen von *zp* Pestiviren umfassen jeweils mindestens ein Ubiquitin-Monomer und befinden sich immer direkt oberhalb der NS3-kodierenden Region. Beschrieben wurde diese Ubiquitin-Insertion zum ersten Mal beim *zp* BVDV Stamm Osloss (Renard et al., 1987; Meyers et al., 1989b; de Moerlooze et al., 1993). Die Insertion von 228 Basen Ubiquitin-kodierender Sequenz im Virusgenom führt dazu, dass im Polyprotein des Virus zwischen Aminosäure 1589 und 1590 ein einzelnes Ubiquitin-Monomer eingebaut ist, das im Vergleich zum zellulären Ubiquitin zwei Aminosäure-Austausche trägt (Meyers et al., 1989b). Durch diese Insertion kommt es im

Polyprotein zu einer Prozessierung durch die Ubiquitin-C-terminale Hydrolase (UCH) (Tautz et al., 1993b). Die Generierung des C-Terminus von Ubiquitin führt gleichzeitig zur Entstehung des N-Terminus von NS3 und damit zu dessen Freisetzung, während das Ubiquitin-Monomer als Fusion am C-terminalen Ende des NS2 verbleibt.

2.2.4.1.2 Jiv-Insertionen im Genom von zytopathogenen Pestiviren

Im Genom von zp BVDV und auch von zp BDV Stämmen werden auch häufig RNA-Abschnitte aus der zellulären mRNA, die für das Jiv-Protein kodieren, nachgewiesen (Becher et al., 1996; Meyers und Thiel, 1996; Ridpath und Neill, 2000; Vilcek et al., 2000), siehe Abb. 4. Diese Jiv-Insertionen sind meist oberhalb der NS2-3 Spaltstelle lokalisiert und variieren in ihrer Größe und Position. In Stämmen mit Jiv-Insertionen werden in der Regel keine großen Duplikationen oder Deletionen viraler Sequenzen gefunden, die für die erhöhte Freisetzung des NS3 verantwortlich gemacht werden könnten. Das Genom des zp BVDV Stamms NADL enthält eine Insertion, die für 90 Aminosäuren des Jiv-Proteins kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Fragment in der Lage ist die NS2-3 Spaltung zu induzieren (Vassilev et al., 1997; Mendez et al., 1998). Bis auf wenige Ausnahmen ist dieses 90 Aminosäuren große Fragment des Jiv-Proteins auch Bestandteil aller weiteren Jiv-Insertionen, die in zp BVDV Isolaten gefunden wurden. Es ist eine Art Minimalfragment und wird als „Jiv90“ bezeichnet (Rinck et al., 2001). Zelluläres Jiv sowie auch dessen Fragment Jiv90 sind in der Lage mit NS2 stabil zu interagieren und die NS2-3 Spaltung in trans zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass durch Jiv bzw. Jiv90 eine im pestiviralen NS2 lokalisierte Autoprotease aktiviert wird, die die Prozessierung von NS2-3 katalysiert (Lackner et al., 2005).

BVDV NADL	1536	90 AS
BVDV C86	1532	177 AS
BVDV 2324_94	1538	140 AS
BVDV 5.19516	1538	132 AS
BVDV 5569	1542	116 AS
BVDV Indiana	1537	104 AS
BVDV 869	1538	100 AS
BVDV 7923	1537	104 AS
BVDV 88055	1536	90 AS
BVDV A2146	1538	96 AS
BVDV ND 8799c	1538	100 AS
BVDV Galena 16425c	1538	151 AS
BVDV OkSt 94-050-297c	1538	124 AS
BVDV SD1630c	1538	146 AS
BVDV 5912c	1529	102 AS
BVDV 296c	1533	138 AS
BVDV 6082c	1543	131 AS
BDV Cumnock	1531	129 AS
BDV Moredun	1531	109 AS

Abb. 4: Insertion von Jiv-Sequenzen im NS2 von BVDV- und BDV- Isolaten

Schematisch dargestellt sind Jiv-Insertionen (schwarz), die sich innerhalb des pestiviralen NS2 (weiss) befinden.

Angaben ist die Zahl der letzten Aminosäure (AS) des NS2, auf die die Jiv-Sequenz folgt. Die Insertionsstellen liegen im Bereich AS 1529 und AS 1543 des NS2. Die Länge der Jiv-Fragmente variiert zwischen 90 und 177 AS. Das kleinste Fragment wurde im Stamm NADL gefunden; dieses Minimalfragment wird als „Jiv90“ bezeichnet.

2.2.4.1.3 Zytopathogene Pestiviren mit Mutationen im NS2

Einige zp Stämme erreichen weder durch Insertionen noch durch Deletionen eine hohe Freisetzung von NS3. Der zp BVDV Stamm Oregon besitzt im Vergleich mit nzp Stämmen mehrere Aminosäure-Austausche innerhalb von NS2, die für eine partielle Spaltung von NS2-3 verantwortlich sind (Kümmerer et al., 1998). Eine Rückmutation der Aminosäure an Position 1555 führt zum Verlust der Zytopathogenität des zp Stamms (Kümmerer und Meyers, 2000). Wie die NS2-3 Prozessierung des Stamms Oregon erreicht wird ist bisher ungeklärt. Es könnte sein,

dass die Punktmutationen zu einer über Konformationsänderung bedingten Aktivierung der NS2-Autoprotease führen.

Die Hypothese, dass die NS2-Autoprotease durch eine Konformationsänderung aktiviert wird, wurde bereits für den BVDV-1 Stamm CP7 aufgestellt (Tautz et al., 1996). Der Stamm CP7 enthält eine 27 Basen lange Insertion zentral im NS2-kodierenden Bereich. Es ist die Duplikation einer viralen Sequenz, die etwa 300 Basen unterhalb ihres Ursprungsbereiches in einem anderen Leserahmen erneut eingebaut wurde. Diese 9 Aminosäuren im NS2 sind nicht nur essentiell für die NS2-3 Spaltung bei CP7, sondern sind auch ausreichend für eine NS2-3 Spaltung auf der Basis eines nzp Virus. Die NS3-Serinprotease ist an dieser Prozessierung nachweislich nicht beteiligt (Tautz et al., 1996).

2.3 Durch Pestiviren verursachte Erkrankungen

2.3.1 Bovine Virus Diarrhoe/ Mucosal Disease

2.3.1.1 Pathogenese und Klinik

Mit BVDV infizierte Rinder scheiden über Körpersekrete und mit dem Kot infektiöse Viren aus, die dann über den oronasalen Weg auf andere Tiere übertragen werden können. Die primäre Virusvermehrung findet in den Schleimhäuten und regionalen lymphatischen Geweben, vor allem in den Tonsillen, statt. Die sich anschließende Virämie führt zu einer vorübergehenden Immunsuppression und zur Infektion weiterer Organe und Gewebe, v.a. des Verdauungstraktes, des Respirationstraktes und des lymphatischen Gewebes (Bruschke et al., 1998). In dieser Zeit scheiden die Tiere für mehrere Tage Virus aus, bis das Virus durch die spezifische Immunantwort kontrolliert wird.

BVDV-Infektionen verlaufen bei immunkompetenten Rindern meist subklinisch, können aber abhängig vom Gesundheitszustand des Tieres und der Virulenz des Stamms klinische Symptome wie z.B. Leukopenie, Thrombozytopenie, Fieber, leichten Durchfall, Atembeschwerden und/ oder Immunsuppression verursachen (Liess, 1967; Potgieter et al., 1985; Baker, 1987). Infektionen mit hochvirulenten Stämmen, die zu Erkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität, insbesondere bei Kälbern, führen, sind eher selten. Diese Erkrankungen gehen mit schweren Thrombozytopenien einher, die sich durch Blutungen in Schleimhäuten und diversen inneren Organen bemerkbar machen (Rebhuhn et al., 1989) und werden als

Hämorrhagisches Syndrom bezeichnet. Das Hämorrhagische Syndrom wird fast ausschließlich durch BVDV-2 Infektionen verursacht. BVDV-2 Infektionen wurden zuerst in den USA und in Kanada beschrieben (Corapi et al., 1989; Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994), jedoch innerhalb der letzten Jahre auch vereinzelt in Deutschland beobachtet.

Wird ein trächtiges Tier mit einem nzp BVDV infiziert, so können die Viren die Plazentarschranke überwinden und den Embryo oder Fetus infizieren. Aufgrund des Aufbaus der Plazentarschranke können die maternalen Antikörper diese Barriere nicht überwinden. Je nach Infektionszeitpunkt während der Trächtigkeit kann es zu Fruchtresorptionen, Aborten, Totgeburten und Missbildungen kommen. Auch die Geburt lebensschwacher oder gesunder Tiere ist möglich. Erfolgt die Infektion zwischen dem 40. – 120. Trächtigkeitstag, kann sich im Fetus eine Immuntoleranz entwickeln, da sich dessen Immunsystem noch in der Prägephase befindet. In diesem Fall werden alle gegen das Pestivirus gerichteten T- und B-Zellen eliminiert. Das Virusantigen wird als körpereigenes Antigen angesehen, wodurch das Immunsystem nicht in der Lage ist das persistierende Virus zu eliminieren. Die Immuntoleranz betrifft nur das persistierende Virus und antigenetisch sehr eng verwandte Virusstämme. Diese persistent infizierten Tiere (PI-Tiere) scheiden große Mengen Virus aus und sind damit epidemiologisch von großer Bedeutung, da sie als Hauptvirusreservoir gelten. Die persistente Infektion bei Wiederkäuern kann mit Kümmern der Tiere verbunden oder klinisch unauffällig sein; auch können die Tiere mehrere Jahre alt werden. Eine Sonderform stellt das Erkrankungsbild der Mucosal Disease (MD) dar. Häufig sind Rinder im Alter zwischen sechs Monaten und zwei Jahren betroffen. Die MD der Rinder tritt sporadisch auf und nimmt meist innerhalb von 2 Wochen nach dem Auftreten der ersten Symptome einen tödlichen Verlauf (Baker, 1987). Charakteristisches Bild sind Ulzerationen des Gastrointestinaltraktes (Baker, 1987; Moennig und Plagemann, 1992), die zu blutigem Durchfall und zur Depletion des lymphoretikulären Gewebes, u.a. der Peyerschen Platten, führen. Auffällige Läsionen zeigen sich außerdem an den sichtbaren Schleimhäuten des Kopfes sowie an der Haut des Zwischenklauenbereiches und des Kronsaumes.

Die Pathogenese der MD ist komplex. Für die Entstehung der MD ist die persistente Infektion mit einem nzp BVDV Stamm Voraussetzung. Auffällig ist, dass aus an MD verendeten Tieren immer ein Viruspaar isoliert werden kann. Neben dem persistierenden nzp Virus kann ein antigenetisch eng verwandtes zp Virus

nachgewiesen werden. Diese Verwandtschaft steht in deutlichem Gegensatz zu der großen Variabilität der vorkommenden Feldisolate. Daher nahm man bereits früh an, dass das zp Virus durch Mutationen im infizierten Tier aus dem nzp Virus hervorgeht (Brownlie et al., 1984; Howard et al., 1987; Bolin et al., 1988; Corapi et al., 1988). MD kann auch experimentell durch eine Superinfektion eines PI-Tieres mit einem zp BVDV Stamm ausgelöst werden, wenn eine enge antigenetische Verwandtschaft des zp Stamms zu dem persistierenden nzp vorhanden ist, und das zp Virus vom Immunsystem toleriert wird (Brownlie et al., 1984; Bolin et al., 1985; Moennig et al., 1990).

Ein Sonderfall stellt die sogenannte *late onset*-Form (später Ausbruch) der MD dar. Erst nach einer symptomarmen Phase von mehreren Monaten treten die schweren Symptome in Erscheinung, die schließlich zum Tod führen. Die Ursache der *late onset*-MD ist die Superinfektion von PI-Tieren mit einem zp BVDV Stamm, der antigenetisch weniger mit dem persistierenden nzp Stamm verwandt ist und daher vom Immunsystem nicht vollständig toleriert wird. Das Immunsystem des Tieres reagiert in geringem Maße auf den zp Stamm und zögert auf diese Weise den Verlauf der Erkrankung hinaus. Durch zufällig stattfindende RNA-Rekombinationseignisse zwischen dem zp Stamm und dem persistierenden nzp Stamm entstehen nach einiger Zeit neue zp Viren, die jetzt aufgrund ihrer antigenetischen Ähnlichkeit zum nzp Virus vom Immunsystem vollständig toleriert werden. Auch die *late onset*-Form verursacht die massiven MD-Symptome und führt zum Tod des erkrankten Rindes.

2.3.2 Border Disease der Schafe (BDV)

Das Erkrankungsbild der *Border Disease* wurde erstmal an der Grenze zwischen England und Wales beschrieben (Hughes et al., 1959). In Australien, Neuseeland und den USA wurde die Erkrankung später als *hairy shaker disease* bezeichnet. Das *Border Disease* Virus ist weltweit verbreitet und in Ländern mit intensiver Schafhaltung von wirtschaftlichem Interesse.

Die Pathogenese der *Border Disease* ist der von BVD sehr ähnlich. Die Infektion von adulten Tieren verläuft häufig subklinisch oder verursacht milde Krankheitserscheinungen wie beispielsweise Fieber, Lethargie und Leukopenie. Nach der Infektion werden virusneutralisierende Antikörper gebildet. Intrauterine Infektionen können dagegen zum Abort, Missbildungen, zentralnervösen Störungen,

Veränderungen des Haarkleids, Tremor und Ataxie (*hairy shaker*) und zur Geburt persistent infizierter Tiere (PI-Tiere) führen (Thiel et al., 1996). Aus infizierten Tieren werden meistens nzp BDV Stämme isoliert, jedoch kommen auch zp Viren vor (Nettleton et al., 1992; Becher et al., 1996).

2.3.3 Klassische Schweinepest (KSP)

Die Klassische Schweinepest ist eine Infektionskrankheit der Haus- und Wildschweine und besitzt in Ländern mit intensiver Schweinehaltung große wirtschaftliche Bedeutung. Der Erreger ist das Virus der Klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus*, CSFV). Synonyme der Erkrankung sind Europäische Schweinepest (ESP) oder auch *Hog cholera* (HC). Die KSP trat im 19. Jahrhundert als eine perakut verlaufende Tierseuche mit hoher Mortalitätsrate auf. Es ist möglich, dass durch Bekämpfungsmaßnahmen hochvirulente Stämme zurückgedrängt worden sind, denn CSFV Stämme aus aktuelleren Ausbrüchen in Europa führen eher zu chronischen Formen mit weniger ausgeprägten Symptomen (Wensvoort und Terpstra, 1985; van Oirschot, 1992; Meyers und Thiel, 1996). Man unterscheidet CSFV-Stämme mit hoher, mäßiger, geringer und nicht vorhandener Virulenz (Meyers und Thiel, 1996). In Abhängigkeit von der Virulenz des Virusstamms, der Infektionsdosis und dem Immunstatus der Tiere kann die Erkrankung mit unterschiedlich hoher Morbidität und Mortalität einhergehen. Bei der akuten Form der KSP, die häufig bei Jungtieren auftritt, werden hohes Fieber, Anorexie, Konjunktivitis, vergrößerte Lymphknoten und Diarrhoe beobachtet. In der Finalphase der Erkrankung kommt es zu petechialen und ekchymösen Blutungen der Haut im Bereich der Ohren, des Schwanzes, am Bauch und an den Extremitäten. Nach einer Krankheitsdauer von acht bis zwanzig Tagen tritt der Tod ein. Bei der chronischen Form sind die anfänglichen Symptome denen der akuten Form sehr ähnlich, im Verlauf der Erkrankung können u.a. neben einem Wechsel von Durchfall und Verstopfung, respiratorische Symptome, Abmagerung, Umrauschen und erhöhte Ferkelsterblichkeit beobachtet werden. Die diaplazentare Infektion kann in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt zu Aborten, Totgeburten, Missbildungen oder zur Geburt lebensschwacher Ferkel führen. Persistent infizierte neugeborene Ferkel zeigen häufig keine Symptome, scheiden jedoch lebenslang das Virus aus und sterben letztendlich nach bis zu elf Monaten an der so genannten *late onset*-Form der KSP. Aufgrund der hohen Kontagiösität des Virus kann sich die Seuche schnell

ausbreiten. Die klassische Schweinepest ist eine anzeigepflichtige Tierseuche, ihre Bekämpfung wird durch die Schweinepest-Verordnung geregelt.

2.4 Jiv

Jiv ist ein zelluläres Protein, das eine nur sehr geringe Abundanz besitzt. Die Bezeichnung Jiv steht für „*J-domain-protein interacting with viral protein*“ und wurde früher auch als cINS (*cellular insertion*, zelluläre Insertion) bezeichnet (Rinck et al., 2001). Orthologe des bovinen Jiv-Proteins sind das humane HDJ3-Protein (auch als DnaJ C14 bezeichnet) sowie das DRIP78 der Ratte (siehe Tab. 1).

Die mRNA, die für das Jiv-Protein kodiert, wurde aus bovinen Zellen (MDBK) isoliert. Es gelang der Nachweis von zwei mRNAs, die als cDNA kloniert und sequenziert wurden. Sie unterscheiden sich nur hinsichtlich der Länge der 3'-NTR und entstehen wahrscheinlich durch die Verwendung verschiedener Polyadenylierungssignale. Der Leserahmen der beiden mRNAs ist identisch und kodiert für ein 699 Aminosäuren großes Protein (Rinck et al., 2001).

Jiv gehört in die Familie der J-Domänen Proteine, die neben der Hsp70 Familie (*heat shock protein* = Hitzeschockprotein) typische Vertreter der molekularen Chaperone sind. Molekulare Chaperone (*chaperone* = Anstandsdame, Aufsicht) spielen eine wichtige Rolle für die Entstehung und Erhaltung von Proteinen in der Zelle (Frydman, 2001). Sie haben eine tragende Rolle für die Konformationskontrolle und die möglicherweise daraus resultierenden Reparatur- und Degradationsprozesse. Auch sind sie beteiligt bei der Translokation von neu synthetisierten Proteinen durch Membranen.

Hitzeschockproteine kommen ubiquitär in pro- und eukaryontischen Zellen vor. Das Hsp70 Chaperonsystem ist stark konserviert. Die Aktivität der Hsp70 Chaperone wird durch Kochaperone reguliert, z.B. durch die Mitglieder der Familie der J-Domänen Proteine (Synonym: Hsp40 Familie). Diese stimulieren die ATPase Aktivität von Hsp70. Ein sehr gut untersuchtes J-Domänen Protein ist das DnaJ aus *E. coli* (Cheetham und Caplan, 1998; Kelley, 1998; Agashe und Hartl, 2000). Die Mitglieder dieser Familie sind durch die Präsenz der konservierten J-Domäne charakterisiert (Walsh et al., 2004). Aufgrund von Sequenzanalysen werden die J-Domänen Proteine weiter klassifiziert in die Typen I - III (Cheetham und Caplan, 1998) bzw. A – C. Es gibt multiple Hsp70 und J-Domänen Proteine im Genom von Eukaryonten. Je höher ein Organismus entwickelt ist, desto zahlreicher sind sie vertreten. Es ist

bekannt, dass J-Domänen-Proteine häufig zwei Zinkionen binden; eines der hierfür verwendeten Zink-bindenden Motive existiert auch im Jiv-Protein. Es wird von den Cysteinen an den Positionen 534, 537, 556 und 559 gebildet und befindet sich damit in der Jiv90-Region.

Die cDNA des orthologen Proteins des Menschen, das als HDJ3 bezeichnet wurde (siehe auch Tab.1) wurde aus fetalem Gehirn isoliert. Das entsprechende Gen ist auf dem humanen Chromosom 12q13.1-12q13.2 lokalisiert und beinhaltet 7 Exons. Eine hohe Expression der mRNA konnte im Pankreas, eine selektive Expression in Gehirn, Lunge, Leber, Muskel, Niere und keine Expression im Herz und in der Plazenta nachgewiesen werden (Chen et al., 2003). Das orthologe Protein der Ratte DRIP78 (*dopamine receptor interacting protein 78*) ist beteiligt am Export des G-Protein gekoppelten Dopamin D1-Rezeptors vom endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche (Bermak et al., 2001; Dupre et al., 2007).

Bezeichnung	Herkunft	Literaturangabe
Jiv (J-domain protein interacting with viral protein)	Rind	(Rinck et al., 2001)
HDJ3 (Synonyme: DnaJ C14 LIP6)	Mensch	(Chen et al., 2003)
DRIP78 (dopamine receptor interacting protein 78)	Ratte	(Bermak et al., 2001)

Tab. 1: Orthologe des Jiv-Proteins

2.4.1 Interaktion zwischen Jiv und BVDV

Wie in Kap. 2.2.4 erwähnt ist das Auftreten der Biotypen zp und nzp eine Besonderheit von Pestiviren. Während nzp Viren in der Zellkultur ohne morphologische Veränderungen replizieren, führt bei zp Viren die Induktion von Apoptose zum ZPE. Auf molekularer Ebene findet man in zp BVDV infizierten Zellen eine hohe Expression des viralen Proteins NS3. Die Freisetzung von NS3 aus dem Vorläuferprotein NS2-3 wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt (siehe Kap. 2.2.4) und findet unabhängig von der zellulären Jiv-Expression statt.

Im Fall von nzp BVDV-1 konnte gezeigt werden, dass die NS2-3 Prozessierung zeitlich reguliert wird. Nur bis neun Stunden nach der Infektion ist freies NS3 nachweisbar, zu späteren Zeitpunkten ist nur das ungespaltene Vorläuferprotein nachzuweisen (Lackner et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte der Verbrauch des intrazellulären Jiv Pools in der Zelle sein. Da Jiv nach Aktivierung der Autoprotease im NS2 daran gebunden bleibt, steht Jiv nicht weiter zur Verfügung, um die Prozessierung weitere NS2-3 Moleküle zu induzieren. Dafür spricht auch das geringe RNA Replikationslevel des nzp Virus zu späten Zeitpunkten nach der Infektion (Lackner et al., 2005), (siehe Abb. 5).

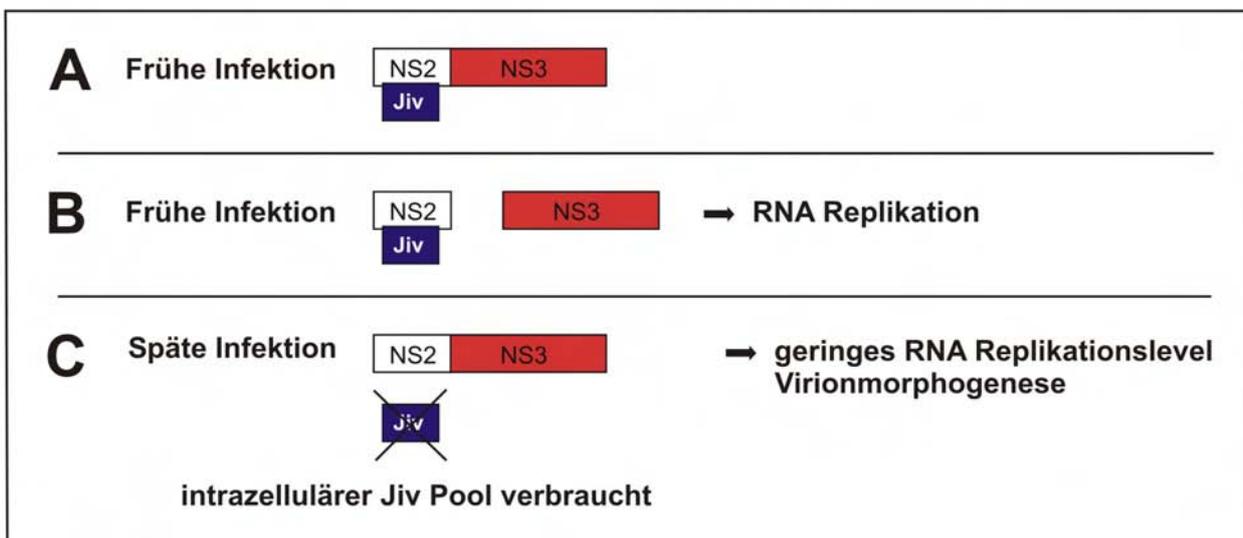


Abb. 5: Zeitliche Regulation der NS2-3 Spaltung bei nzp BVDV-1

Schematisch gezeigt ist in A: Der frühe Zeitpunkt der Infektion; intrazelluläres Jiv bindet an NS2, die aktivierte Autoprotease im NS2 führt zur Prozessierung des NS2-3. B: Das generierte NS3 ist essentieller Bestandteil des Replikationskomplexes. C: In der späten Phase der Infektion ist der intrazelluläre Jiv Pool in der Zelle verbraucht. Da Jiv an NS2 gebunden bleibt, steht es nicht mehr zur Verfügung für weitere Prozessierungen. Nur ungespaltenes NS2-3 ist nachweisbar, welches für die Virionenmorphogenese essentiell ist (Agapov et al., 2004). Das RNA Replikationslevel ist gering.

Um mehr über den Einfluss des Jiv-Proteins auf die Replikation von nzp BVDV-1 zu erfahren, wurden Zelllinien, die sich hinsichtlich ihrer zellulären Jiv-Mengen unterschieden, mit nzp BVDV-1 infiziert und untersucht.

Die Infektion boviner Jiv überexprimierender Zellen ($\text{MDBK}_{\text{tet-onJiv}}$, +Dox) mit einem nzp Stamm führt zu einem Biotypwechsel von nzp nach zp (siehe Abb. 6) sowie zu einem erhöhten NS3 Spiegel (Rinck et al., 2001).

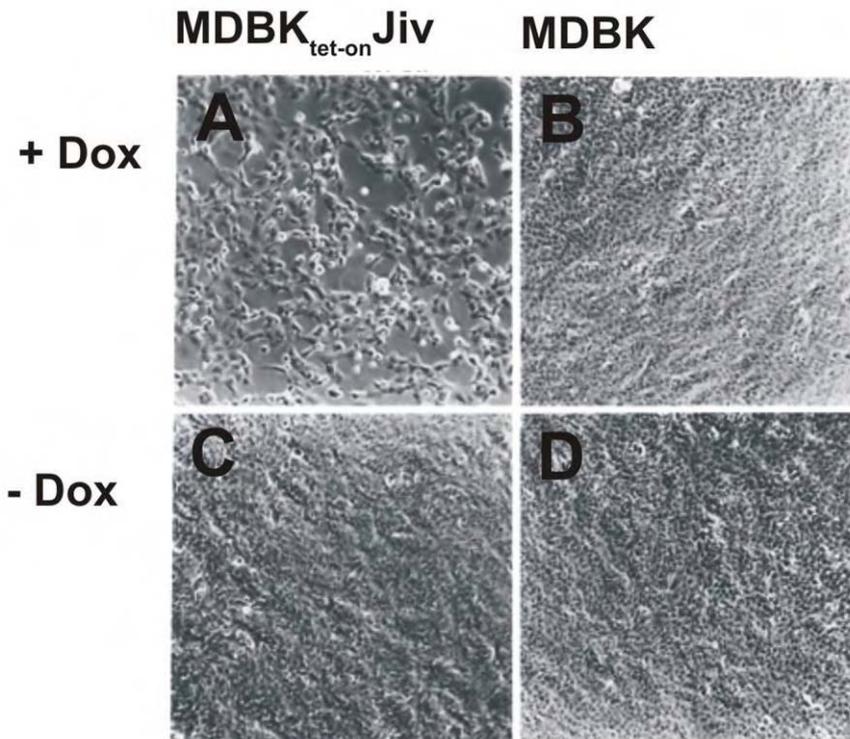


Abb. 6: Überexpression von Jiv in Wirtszellen führt zu einem Biotypwechsel von nzp zu zp (Rinck et al., 2001)

Zellmorphologie:

MDBK Zellen und $\text{MDBK}_{\text{tet-onJiv}}$ Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 10 μM Doxycyclin kultiviert. 18 Stunden nach Induktion wurden die Zellen mit dem nzp BVDV-1 Stamm NCP7 mit einer MOI von 0,5 infiziert und 24 Stunden nach der Infektion mittels Phasenkontrast-Mikroskopie ausgewertet.

Nur die Infektion induzierter Zellen mit einer erhöhten Jiv-Expression führt zu einem Wechsel des Biotyps von nzp zu zp (Bild A).

Daneben wurde in den Jiv überexprimierenden Zellen eine um den Faktor 10 - 14 erhöhte Syntheserate viraler RNA beobachtet (Lackner et al., 2005).

Durch die erhöhte Menge des Jiv-Proteins in den infizierten Zellen, wird die NS2-3 Spaltung durch die im NS2 lokalisierte aktivierte Autoprotease katalysiert. Das generierte freie NS3 ist essentieller Bestandteil des Replikationskomplexes und kann durch das ungespaltene Vorläuferprotein NS2-3 nicht substituiert werden. In Zellen, in denen der Jiv-mRNA-Gehalt über RNA-Interferenz bis zu 80% reduziert wurde, kam die NS2-3 Spaltung zwei Stunden eher zum Erliegen und die Synthese viraler RNA war um den Faktor 10-20 reduziert. Die hier beschriebenen Effekte des zellulären Jivs auf die Infektion mit nzp BVDV-1 sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Literaturübersicht

	<i>Regulärer Jiv Level</i>	<i>Reduzierter Jiv Level</i>	<i>Erhöhter Jiv Level</i>
NS2-3 Spaltung	bis 9 h nach Infektion nachweisbar	bis 7 h nach Infektion nachweisbar	auch zu späten Infektionszeitpunkten nachweisbar
Synthese viraler RNA	= 1	um Faktor 10 – 20 reduziert	um Faktor 10 - 14 erhöht
ZPE in der Zellkultur	nein	nein	ja

Tab. 2: Auswirkungen des intrazellulären Jiv Gehaltes von Wirtszellen auf die Infektion mit nzp BVDV-1 (Lackner et al., 2005)

Um den Effekt eines reduzierten Jiv Gehaltes auf nzp BVDV-1 zu untersuchen, wurden PT-Jiv-kd (knockdown) Zellen, deren Jiv-mRNA Level um 80% reduziert ist, verwendet. Ein erhöhter Jiv Gehalt wurde mittels der Zelllinie MDBK_{tet-on}Jiv, die 16 Stunden vor dem Experiment mit 10 µM Doxyzyklin induziert wurden, untersucht. In normalen infizierten Wirtszellen (MDBK, PT) ist bis zu 9 Stunden nach der Infektion mit nzp BVDV-1 NCP7 freies NS3 nachweisbar, zu späteren Zeitpunkten ist nur ungespaltenes NS2-3 detektierbar. Die Reduktion des intrazellulären Jiv-Gehaltes führt zum Erliegen der NS2-3 Prozessierung nach schon 7 Stunden p. i. . Die Synthese viraler RNA ist im Vergleich zu den unveränderten Wirtszellen deutlich gesenkt. Ein Überangebot von Jiv führt zum Einbruch der Regulation der NS2-3 Spaltung; selbst zu späten Zeitwerten nach der Infektion ist freies NS3 nachweisbar. Die Menge an freiem NS3 ist vergleichbar zu der von zp Viren generierten Menge an NS3. Mittels quantitativer Real-Time RT-PCR kann eine Erhöhung der viralen RNA-Menge gezeigt werden. In der Zellkultur ist ein deutlicher ZPE zu beobachten, siehe Abb. 6.

Das kleinste Jiv-Fragment, das als Insertion im Genom von zp Viren gefunden wurde, ist das Jiv90 im Stamm NADL. Schon früh wurde gezeigt, dass dieses Fragment zur Auslösung der NS2-3 Spaltung ausreichend ist (Vassilev et al., 1997; Mendez et al., 1998; Rinck et al., 2001).

Um die Interaktion von Jiv90 und NS2 näher zu charakterisieren, wurde die NS2-Protease in Form eines Expressionsplasmids, das die Region von NS2 bis NS4A kodiert, zusammen mit dem Kofaktor Jiv90 in Zellen transfiziert. Anschließend wurde die Effizienz der NS2-3 Spaltung ausgewertet.

Durch die Generierung von Alanin-Mutanten des Jiv90, in denen jeweils eine bis zwei Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht waren, war die Eingrenzung wichtiger Bereiche des Jiv90 möglich. Die meisten Alaninsubstitutionen im Bereich von Jiv90 werden

toleriert, haben jedoch häufig eine verminderte Kapazität zur Induktion der NS2-3 Spaltung. Eine Ausnahme bildet die Aminosäure Tryptophan an der Position 39. Jiv90 mit einem Austausch dieser Aminosäure zu Alanin kann trotz nachweisbarer Interaktion mit dem pestiviralen NS2 die NS2-3 Spaltung nicht mehr auslösen. Ein nur 20 Aminosäuren großes Peptid (Position 41 - 60) von Jiv90 ist in der Lage an NS2 zu binden, für die Induktion der Spaltung wird jedoch ein größeres Jiv-Fragment benötigt: nur Verkürzungen bis zehn Aminosäuren im N-terminalen oder fünf Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Jiv90 werden toleriert (Lackner et al., 2005), (siehe Abb. 7).

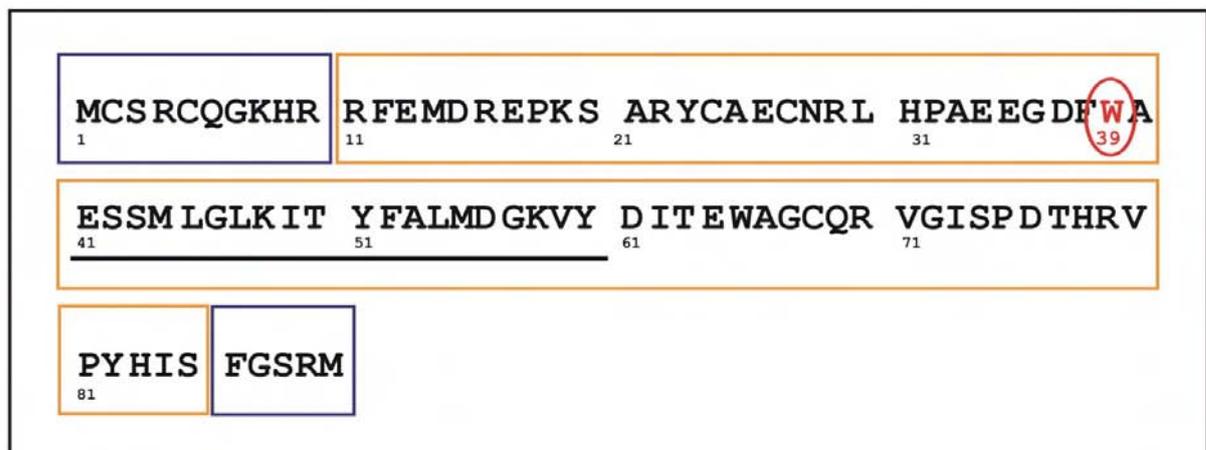


Abb. 7: Übersichtskarte der Aminosäuren von Jiv90 - modifizierte Abbildung (Lackner et al., 2005)

Verkürzungen von 10 Aminosäuren im N-terminalen Bereich oder Verkürzungen von 5 Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Jiv90-Fragments können die Spaltung von NS2-3 noch induzieren (blauer Rahmen). Aminosäure-Austausche zu Alanin werden toleriert und können zu einer reduzierten Spaltungseffizienz führen (gelber Rahmen). Eine Ausnahme bildet die Aminosäure Tryptophan (W) an Position 39, welche für die Spaltungsinduktion von NS2-3 essentiell ist. Schwarz unterstrichen ist das am pestiviralen NS2 bindende Peptid (Pos. 41 – 60).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugereinrichtung	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Bakterienschüttler	Fa. Noctua
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Fa. Forma Scientific; Fa. Labotec
Digitalkamera FView®	Fa. Soft Imaging System
DNA-Sequenzierer: LI-COR 4000 L	Fa. LI-COR
Elektroblot-Apparatur	Fa. BioRad
Elektroporationsgerät: GenePulserII	Fa. BioRad
Fluoreszenz-Mikroskop: Axiovert 35	Fa. Zeiss
Fuchs-Rosenthal-Kammer	Fa. Marienfeld
Gel Print 2000L Dokumentationssystem	Fa. MWG-Biotech
Glaswaren	Fa. Schott
Heizblöcke	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Konfokalmikroskop DMI 6000 CS Trino (Software: TCP SP-5)	Fa. Leica
Kühl- und Gefrierschränke	Fa. Liebherr
Lichtmikroskop: Wilovert S	Fa. Will
Magnetrührer	Fa. IKA-Werke
Multikanalpipette	Fa. Biohit
ODYSSEY®Infrared Imaging System	Fa. LI-COR Biosciences
Photometer: GeneQuant II	Fa. Pharmacia Biotech
pH-Meter	Fa. Knick
Pipetten	Fa. Gilson
Pipettierhilfe PipetBoy	Fa. Integra Biosciences
Proteingel-Elektrophoresekammern	Fa. Hoefer und Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Real-TimePCR-Gerät: AbiPrism7000	Fa. Applied Biosystems
Reinstwasseranlage: Purelab Plus UF	Fa. USF Deutschland GmbH
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Fa. Protec

Material und Methoden

Spannungsquellen	Fa. Biometra
Sterilbank	Fa. Kendro
Thermocycler	Fa. Techne
Thermomixer	Fa. Eppendorf
Tischzentrifuge, gekühlt: Biofuge fresco	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge: Biofuge Pico	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge: Biofuge primo	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415C	Fa. Eppendorf
UV-Crosslinker: UV Stratalinker 2400	Fa. Stratagene
Vortex	Fa. IKA
Waagen	Fa. Mettler-Toledo
Wasserbad	H. Kretschmer, Gießen

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Elektroporationsküvetten (2 und 4 mm Spaltbreite)	Fa. Molecular BioProducts und Fa. Eppendorf
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße und -platten	Fa. Falcon
Handschuhe rotiprotect® LATEX und rotiprotect® NITRIL	Fa. Roth
Kryoröhrchen	Fa. Nalge
Mikrotiterplatten	Fa. Nunc
Nitrozellulose-Membran Bio Trace NT	Fa. Pall Gelman Laboratory
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf und Fa. Falcon BD
Reaktionsgefäße für Real-Time PCR	Fa. Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Fa. Biozym
Pipettenspitzen, nukleasefrei	Fa. Nerbe plus
Plastikspritzen, steril	Fa. Braun
Röntgenfilme Biomax™	Fa. Kodak

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
1 Kb DNA-Leiter	Fa. Invitrogen
[14C]-methylierte Protein-Leiter	Fa. Amersham
[35S]-Methionin und -Cystein (ProMix)	Fa. Amersham
Acridinorange	Fa. Fluka
Acrylamid:N,N'-Methylen-bisacrylamid 29:1, 40%	Fa. AppliChem
Agarose ultraPURE™	Fa. Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Fa. Invitrogen
Ampicillin	Fa. Roth
Bromphenolblau	Fa. BioRad
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Fa. NEB
Chloroform	Fa. Roth
DMEM ohne Methionin, Cystein und Glutamin	Fa. Sigma-Aldrich
DMEM-Pulver	Fa. Invitrogen
Dimethylsulfid (DMSO)	Fa. Serva
dNTPs	Fa. Roche
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA)	Fa. Merck
Essigsäure	Fa. Roth
Ethanol	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. PAA
Ficoll 400	Fa. Sigma-Aldrich
Fluorographie-Lösung „Amplify“	Fa. Amersham
Formaldehyd	Fa. Merck
100xGlutamax-Lösung	Fa. Invitrogen
G418-Sulfat (Neomycin)	Fa. Calbiochem
Glycerin	Fa. Sigma-Aldrich
Harnstoff	Fa. Merck

Material und Methoden

Hygromycin B	Fa. PAA
Isopropanol	Fa. Merck
Lipofectamine 2000	Fa. Invitrogen
Magermilchpulver	Fa. DE-VAU-GE Gesundkostwerk
Metafectene™ Transfektions-Reagenz	Fa. Biontex
Methanol	Fa. Fluka
Minimum Essential Medium Eagle, phosphatfrei	Fa. Sigma-Aldrich
Mouse IgG TrueBlot™Set	Fa. eBioscience
Natriumnitrat	Fa. Merck
Oligonukleotide	Fa. MWG
Orange-G	Fa. Fluka
Paraformaldehyd	Fa. Fluka
Pefablock SC	Fa. Merck
Penicillin	Fa. Sigma-Aldrich
Protein-A-Sepharose	Fa. Sigma-Aldrich
Proteinmarker (Prestained Broad Range) P7708L	Fa. NEB
Puromycin	Fa. Alexis
Roti-Blot® A und Roti-Blot® K Blotting-Puffer	Fa. Roth
Roti-Phenol®	Fa. Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fa. ICN
SequaGel® Complete Buffer für Sequenzgele	Fa. National diagnostics
SequaGel® XR Monomer Solution für Sequenzgele	Fa. National diagnostics
Streptomycin	Fa. Sigma-Aldrich
Superfect Transfektions-Reagenz	Fa. Qiagen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fa. Sigma-Aldrich
Tricin	Fa. ICN
Tris	Fa. Roth
tRNA aus E.coli MRE 600	Fa. Boehringer
Trypanblau	Fa. Serva

Trypsin	Fa. Sigma-Aldrich
Tween-20	Fa. Sigma-Aldrich
Wasser, doppelt destilliert	Fa. Roth
Galactopyranosid (X-Gal)	Fa. ICN
β -Mercaptoethanol	Fa. Merck

3.1.4 Lösungen und Puffer

Lösung	Verwendung	Zusammensetzung (Lösungsmittel ist ddH ₂ O, wenn keine anderen Angaben)
Annealingpuffer	Annealing von Oligonukleotiden	100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH pH 7,4, 2 mM Mg-Acetat
Anodenpuffer	SDS-PAGE	200 mM Tris/HCl pH 8,9
CCM-34	Zellkultur	4,5 g/l DMEM-Pulver, 200 μ M L-Alanin, 225 μ M L-Aspartat, 933 μ M Glycin, 510 μ M L-Glutamat, 217 μ M L-Prolin, 184 μ M Hypoxantin, 0,1 mg/l Biotin, 44 mM NaHCO ₃
Cytomix	Elektroporation von Huh7 Zellen	1 M KCl, 7,5 μ l 1 M CaCl ₂ , 500 μ l 1M K ₂ PO ₄ , 500 μ l 1 M KH ₂ PO ₄ , 1,25 ml 1 M HEPES, 250 μ l MgCl ₂ , 1 ml 0,1 M EGTA
dNTP-Lösung	PCR	jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Gelpuffer	SDS-PAGE	1 M Tris/HCl pH 8,45, 0,1% (w/v) SDS
gesättigtes Phenol	Plasmid-DNA Reinigung	Roti-Phenol, gesättigt mit 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1% (w/v) Hydroxychinolin
Hungermedium	Radioimmunpräzipitation	Dulbecco's modified Eagle's medium ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure (Sigma-Aldrich); 1% (v/v) 100x Glutamax-Lösung (Invitrogen)
Kathodenpuffer	SDS-PAGE	100 mM TrisHCl pH 8,25, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS
LB-Medium	Bakterienkultur	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl; auf pH 7,5 mit NaOH
LB++-Medium	Kompetente Bakterien	20 mM MgSO ₄ und 10 mM KCl in LB- Medium
Low melting point Agarose	Zellkultur	1,5 g LMA ad 50 ml, autoklaviert

Material und Methoden

10x LongRun-Konzentrat	Sequenzierung	162 g Tris, 27,5 g Borsäure, 9,3 g EDTA-Na ₂ ; ad 1 l
Moviol	Zellkultur	6 g Glycerin, 2,4 g Polyvinylalkohol 4-88 (Moviol), lösen in 6 ml H ₂ O und 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5), Zugabe von 0,1 g 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan je 1 ml Moviol
Octyl-Glykosid-Lösung	Immunfluoreszenz	5 g 1-O-N-Octyl-β-D-Glukopyranosid ad 1 l PBS
P1	Plasmid-DNA-Präparation	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA; 100 mg/l RNase A
P2	Plasmid-DNA-Präparation	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3	Plasmid-DNA-Präparation	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
PBS	Zellkultur	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; auf pH 7,4 mit HCl
PBS++	Immunfluoreszenz	0,49 mM MgCl ₂ , 0,68 mM CaCl ₂ in PBS
PBS-Tween	Western-Blot	0,05% (v/v) Tween-20 in PBS
Penicillin/Streptomycin 500x	Zellkultur	50.000 UI/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycin (500x), 200 µl Amphotericin (500x)
Probenpuffer	Agarosegel-Elektrophorese	0,1% (w/v) Orange-G, 30% Glycerin
Protein A-Sepharose-Suspension	Radioimmunpräzipitation	25% (v/v) gequollene Protein A-Sepharose in RIPA-Puffer, 1 mM NaN ₃
Puffer A	RT-PCR	125 mM Tris pH 8,3, 187,5 mM KCl, 7,5 mM MgCl ₂ , 25 mM DTT, 1,25 mM dNTP
Puffer B	RT-PCR	25 mM Tris pH 8,3, 100 mM KCl, 6,5 mM MgCl ₂ , 1,25 mM dNTP, 0,5% Triton X100; 0,1% BSA
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitation	150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Desoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,0
SDS-Lysepuffer	SDS-PAGE	2% (w/v) SDS, 6 M Harnstoff, 10% (v/v) Glycerin, 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Stop-Lösung	Sequenzierung	20 mM EDTA pH 8,0 und 300 mg/l Bromphenolblau in deionisiertem Formamid
TAE-Puffer	Agarosegel-Elektrophorese	20 ml 50x <i>Modified Tris-Acetate-EDTA buffer</i> (Millipore) mit ddH ₂ O auf 1 l; 100 µg/l Ethidiumbromid

TfBI	Kompetente Bakterien	30 mM K-Acetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin; auf pH 5,8 mit Essigsäure; sterilfiltriert
TfBII	Kompetente Bakterien	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin; auf pH 6,5 mit KOH; sterilfiltriert
Trypsin-Lösung	Zellkultur	2,5 g/l Trypsin, 16 mg/l Phenolrot, 3,3 mM EDTA in PBS
Trypanblau-Lösung	Zellkultur	0,25% (w/v) Trypanblau, 0,15 M NaCl in Aqua dd

3.1.5 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Fa. Roche
Biotherm (Taq-Polymerase)	Fa. Natu-Tec
DNaseI (RNase-frei)	Fa. Roche
Klenow-Fragment	Fa. NEB
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fa. Promega
Proofstart DNA-Polymerase	Fa. Qiagen
Restriktionsendonukleasen	Fa. MBI Fermentas; NEB; Promega; TaKaRa
RNase A	Fa. Roche
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Fa. Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Fa. TaKaRa

3.1.6 Vorgefertigte Medien und Systeme („Kits“)

Bezeichnung	Hersteller
A-Addition Kit	Fa. Qiagen
ABsolute™ QPCR Mix	Fa. ABgene
DNA-Sequenzierungskit „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“	Fa. Amersham
MAXIscript™ SP6 und T7-Kits zur <i>in vitro</i> -Transkription von Plasmid-DNA in RNA	Fa. Ambion
Montage™ DNA Gel Extraction-Kit zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Fa. Millipore

Material und Methoden

Montage™ PCR Centifugal Filter Devices zur Aufreinigung von PCR-Produkten und zur DNA-Konzentration und Entfernung von Salzen aus Reaktionsansätzen	Fa. Millipore
Nucleobond® AX100™ Säulen zur DNA-Präparation aus Bakterien	Fa. Macherey-Nagel
NucleoTrap® Extraction Kit zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Fa. Macherey-Nagel
OPTI-MEM® + Glutamax	Fa. GIBCO
p-GEM®-T Vektor System I zur Klonierung von PCR-Produkten	Fa. Promega
RNeasy® Mini Kit zur Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen	Fa. Qiagen
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus zur Auswertung von Western Blots	Fa. PerkinElmer Life Sciences
Zenon® Tricolor Mouse IgG1 Labeling Kit	Fa. Invitrogen

3.1.7 Basis-Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pCITE-2A	Enthält die IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) nach einem T7 RNA-Polymerase-Promotor; die IRES verstärkt die cap-unabhängige Transkription im MVA-T7pol-Vacciniavirus-Expressionssystem, Fa. Novagen.
pCITE-GST	Basiert auf pCITE-2A und kodiert zwischen EMCV-IRES und Polylinker zusätzlich für Glutathion-S-Transferase (Tautz et al., 2000).
pcDNA3	Expressionsplasmid, enthält den Promotor des Zytomegalie-Virus (CMV), Fa. Invitrogen.
pGEM-T	Zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen, Fa. Promega.
pN/E2-NS4A	Basiert auf pCITE-2A und kodiert nach einer fremden Signalsequenz (Harada et al., 2000) für die Aminosäuren 693 bis 2334 des Polyproteins von nzp BVDV NCP7 (NS2-NS4A i-) (Rinck et al., 2001).
pCITE-GST Jiv90	Basiert auf pCITE-GST und kodiert für das Jiv90-Protein.
pcDNA-GST Jiv 90 R11 AAAA	Basiert auf pcDNA3, enthält N-terminal Glutathion-S-Transferase, welche als Fusionsprotein mit Jiv90 exprimiert wird. Vier Alanine sind hinter der Position 11 eingefügt.
pcDNA-GST Jiv 90 D15 AAAA	Basiert auf pcDNA3, enthält N-terminal Glutathion-S-Transferase, welche als Fusionsprotein mit Jiv90 exprimiert wird. Vier Alanine sind hinter der Position 15 eingefügt.
pcDNA-GST Jiv 90 R22	Basiert auf pcDNA3, enthält N-terminal Glutathion-S-Transferase, welche als Fusionsprotein mit Jiv90 exprimiert wird. Vier Alanine

AAAA	sind hinter der Position 22 eingefügt.
pcDNA-GST Jiv 90 A25 AAAA	Basiert auf pcDNA3, enthält N-terminal Glutathion-S-Transferase, welche als Fusionsprotein mit Jiv90 exprimiert wird. Vier Alanine sind hinter der Position 25 eingefügt.
pcDNA-GST Jiv 90 F38 AAAA	Basiert auf pcDNA3, enthält N-terminal Glutathion-S-Transferase, welche als Fusionsprotein mit Jiv90 exprimiert wird. Vier Alanine sind hinter der Position 38 eingefügt.
pcDNA-GST Jiv 90 T63 AAAA	Basiert auf pcDNA3, enthält N-terminal Glutathion-S-Transferase, welche als Fusionsprotein mit Jiv90 exprimiert wird. Vier Alanine sind hinter der Position 63 eingefügt.
pcDNA-GST Jiv 90 E64 AAAA	Basiert auf pcDNA3, enthält N-terminal Glutathion-S-Transferase, welche als Fusionsprotein mit Jiv90 exprimiert wird. Vier Alanine sind hinter der Position 64 eingefügt.

3.1.8 Hergestellte Jiv-Expressionsplasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pcDNA Σ hu Jiv	Basiert auf pcDNA3, expimiert 699 AS großes Jiv-Protein, welches aus humanen Zellen isoliert wurde.
pcDNA Σ hu Jiv R11A/F12A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 11 und 12 des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv C24A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 24 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv C24A/C27A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 24 und 27 des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv C27A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 27 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv L30A/H31A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 30 und 31 des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv G36A/D37A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 36 und 37des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv W39A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 39 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv Y51A/ F52A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 51 und 52 des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv M55A/D56A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 55 und 56 des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv G57A/K58A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 57 und 58 des Jiv90-Fragmentes sind die

Material und Methoden

	Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht
pcDNA Σ hu Jiv V59A/Y60A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 59 und 60 des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv V59A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 59 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv Y60A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 60 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv T63A/E64A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an den Positionen 63 und 64 des Jiv90-Fragmentes sind die Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv W65A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 65 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv Y82A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 82 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv I84A	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 84 des Jiv90-Fragmentes ist die Aminosäure zu Alanin ausgetauscht.
pcDNA Σ hu Jiv R11 AAAA	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 11 des Jiv90-Fragmentes sind vier Alanine eingefügt.
pcDNA Σ hu Jiv D15 AAAA	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 15 des Jiv90-Fragmentes sind vier Alanine eingefügt.
pcDNA Σ hu Jiv R22 AAAA	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 22 des Jiv90-Fragmentes sind vier Alanine eingefügt.
pcDNA Σ hu Jiv A25 AAAA	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 25 des Jiv90-Fragmentes sind vier Alanine eingefügt.
pcDNA Σ hu Jiv F38 AAAA	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 38 des Jiv90-Fragmentes sind vier Alanine eingefügt.
pcDNA Σ hu Jiv T63 AAAA	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 63 des Jiv90-Fragmentes sind vier Alanine eingefügt.
pcDNA Σ hu Jiv E64 AAAA	Basiert auf pcDNA Σ hu Jiv, an der Position 64 des Jiv90-Fragmentes sind vier Alanine eingefügt.
pcDNA Jiv90	Basiert auf pcDNA3, exprimiert Jiv90.
pcDNA Jiv90 Δ N5	Basiert auf pcDNA Jiv90, N-terminal wurden 5 Aminosäuren deletiert.
pcDNA Jiv90 Δ N10	Basiert auf pcDNA Jiv90, N-terminal wurden 10 Aminosäuren deletiert.
pcDNA Jiv90 Δ N15	Basiert auf pcDNA Jiv90, N-terminal wurden 15 Aminosäuren deletiert.
pcDNA Jiv90 Δ C5	Basiert auf pcDNA Jiv90, C-terminal wurden 5 Aminosäuren deletiert.
pcDNA Jiv90 Δ C10	Basiert auf pcDNA Jiv90, C-terminal wurden 10 Aminosäuren deletiert.

3.1.9 Gesamtklone

Bezeichnung	Beschreibung
pNCP7-5A	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von nzp BVDV NCP7-5A. (Baroth et al., 2000; Becher et al., 2000).
pNCP7 393	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von nzp BVDV NCP7 393, enthält die authentische 3'NTR sowie das NS2-Gen des wt nzp BVDV-1 NCP7 Stamms. Zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover (Pankraz et al., 2005).
pCP7-5A	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von zp BVDV CP7-5A (Becher et al., 2000).
pNADL Jiv90 pac	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von nzp BVDV NADL Jiv90 (Mendez et al., 1998; Lee et al., 2005).
pDI9	Zur Herstellung von RNA des Replikons DI9 (Tautz et al., 1999).
pNCP7/Osloss	Zur Herstellung infektiöser RNA genomischer Länge von zp BVDV Chimäre NCP/Osloss. Zur Verfügung gestellt von E. Lattwein, Institut für medizinische Molekularbiologie, Universität zu Lübeck.
pCSFV Alfort Tübingen	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von pCSFV Alfort Tübingen. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Rümenapf, Institut für Virologie, JLU Gießen. Entspricht einer modifizierten Version des Gesamtklons pA/CSFV, (Meyers et al., 1989a).
pRiems	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von CSFV pRiems (zur Verfügung gestellt von Dr. N. Ruggli, Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Schweiz), (Mayer et al., 2003).
pAlfort/Riems	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von CSFV Chimäre Alfort/Riems. Zur Verfügung gestellt von Dr. J. D. Tratschin, Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Schweiz.
pAlfort 187.1	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von CSFV Alfort. Zur Verfügung gestellt von Dr. J. D. Tratschin, Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Schweiz, (Ruggli et al., 1996).

3.1.10 Real-Time PCR-Primer

Name	Sequenz 5' → 3'
Jiv01	GGCGGTTTCTGGTAGGATTG
Jiv02R	GCCAAGAGAAGATCCAGGTGG
hJiv01	GGCGGTTTCTGGTGGGACTA
hJiv02	GTCGGTTCTCTTCTCGGTCCA

3.1.11 Real-Time PCR-Sonden

Name	Sequenz 5' → 3'
JivTaq01	VIC-TGACCGGCTAGGCTGGAGGGATAAA-TAMRA
humJivTaq02	FAM-TGACCGGTTAGGCTGGAGGGATAAGG-TAMRA

3.1.12 Primer für RT-PCR, PCR, gerichtete Mutation und Klonierung

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
5' UTR HDJ 3	CTTCCTTAGGACCGCCTCCTTG
huci180	AAGCACACACAGCACCCAAACCC
huci600	GTGGACGTAGGGATCCCAGG
huci700rev	CCCACAATCCCAGGCCTTTGC
huci1050	CAGTTGGGATGGCGGTTTCTGG
huci1600rev	CACATCATAGTATTCATTGCCTCC
HDJ3 2258 rev	GCTACAGCCCTTTTGACTCCCTG
<i>Xho</i> I QC s	GCAATGAATACTATGATGTGCTCGAGATGCCAAGGAAAGC
<i>Xho</i> I QC as	GCTTTCCTTGGCATCTCGAGCACATCATAGTATTCATTGC
HindIII QC Jiv 90 s	GAGTCCCCTATCACATAAGCTTTGGTTCTCGGATTC
HindIII QC Jiv 90 as	GAATCCGAGAACCAAAGCTTATGTGATAGGGGACTC
<i>Xho</i> I bov Jiv90 s	ATGTGCTCGAGATGCCAGGGAAAGCATAGGAGGTTTG
HindIII bov Jiv90 as	ACCAAAGCTTATGTGATAAGGGACTCTGTGGGTATC
QC C27A s	CAGATACTGTGCCGAGGCTAATAGGCTGCATCCTGCTGAG
QC C27A as	CTCAGCAGGATGCAGCCTATTAGCCTCGGCACAGTATCTG
QC Y59A s	GATGGATGGAAAGGCGTATGACATCACAG
QC Y59A as	CTGTGATGTCATACGCCTTTCCATCCATC
QC V60A s	GATGGATGGAAAGGTGGCTGACATCACAG
QC V60A as	CTGTGATGTCAGCCACCTTTCCATCCATC
QC Y82A s	GATACCCACAGAGTCCCCGCTCACATCTCATTG
QC Y82A as	CAAATGAGATGTGAGCGGGGACTCTGTGGGTATC

QC I84A s	CAGAGTCCCCTATCACGCCTCATTTGGTTCTCG
QC I84A as	CGAGAACCAAATGAGGCGTGATAGGGGACTCTG
5' HindIII Jiv90	AAGCTTATGTGTAGCCGATGCCAAGGAAAG
3' Jiv90 <i>XhoI</i>	CTCGAGCTACATCCGAGAACCAAATGAGATGTGA
<i>BamHI</i> 5' DDX6	GGATCCATGGGTCTGTCCAGTCAAATGGTCAGCTGAG
3' DDX6 <i>NotI</i>	GCGGCCGCTTAAGGTTTCTCATCTTCTACAGGCTC
3' DDX6 RT-PCR	TCACAGATCCAAACGAGCCTTTTG
Jiv90 ΔN5	AAGCTTATGCAAGGAAAGCATAGG
Jiv90 ΔN10	AAGCTTATGAGGTTTGAAATGGACCGG
Jiv90 ΔN15	AAGCTTATGCGGGAACCTAAGAGTGCC
Jiv90 ΔC5	CTCGAGCTATGAGATGTGATAGGGGAC
Jiv90 ΔC10	CTCGAGCTAGACTCTGTGGGTATCTGGGGA

3.1.13 Sequenzierprimer 5' → 3'

Fluoreszenzfarbstoff (IRD-800, infrared dye-800) markierte Oligonukleotide für die Sequenzierung:

Name	Sequenz
M13 IR	ACGTTGTAAAACGACGGCCAG
M13 IR rev	TTCACAGGAAACAGCTATGAC
T7 IR	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG
Sp6 IR rev	ACGATTTAGGTGACACTATAG

3.1.14 siRNA

Name	Sequenz (sense sequence)	Modifikation	Firma
siRNA FITC	nicht angegeben	Konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein	Qiagen
siRNA RCK/p54	GCAGAAACCCUAUGAGAUUdTdT	-	Qiagen
siRNA Kontrolle	GCAGCACGACUUCUUCAAGdTdT	-	Qiagen
siGenome SMART	GCAGAAACCCUAUGAGAUUUU	-	Dharma con

Material und Methoden

pool, Human DDX6	GGAAAUGAGUUUGAAGAUUUU		
	GAAGAAGGACAAUUAUACAAU		
	GAACAUCGAAAUCGUGUAUUU		

3.1.15 Eukaryontische Zellen

Bezeichnung	Beschreibung
BHK	" <i>Baby Hamster Kidney</i> "-Zellen, Klon BSR, von J. Cox, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tübingen.
MDBK	" <i>Madin Darby Bovine Kidney</i> "-Zellen, von der American Type Culture Collection, Rockville, USA (ATCC CCL-22).
HEK/293T	Humane embryonale Nierenzellen, von D. Glebe, Institut für Medizinische Virologie, JLU Gießen.
HepG2	Humane Hepatomzellen, von D. Glebe, Institut für Medizinische Virologie, JLU Gießen.
Hela	Humane Zervixkarzinomzellen, von D. Glebe, Institut für Medizinische Virologie, JLU Gießen.
Huh7	Humane Hepatomzellen, S. Behrens, Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität, Wittenberg-Halle.
PT	Ovine Nierenfibroblasten, von R. Riebe, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald / Insel Riems.

3.1.16 Viren

Bezeichnung	Beschreibung
BVDV-1:	
NCP7	Nzp BVDV-1 Stamm NCP7, zur Verfügung gestellt von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA; (Corapi et al., 1988).
019	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
519	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
721/328	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
871	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
878	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
1115	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
V171	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
4584	Nzp BVDV-1 Stamm, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover.
CP7	Zp BVDV-1 Stamm CP7, von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA; (Corapi et al., 1988).
BVDV-2:	
BVDV-2 890	Nzp BVDV-2 Stamm 890, von J. F. Ridpath, National Animal Disease Center, Ames, USA (Ridpath und Bolin, 1995).
BVDV -2 Hi916	Nzp BVDV-2 Stamm Hi916, zur Verfügung gestellt von M. Beer, FLI, Insel Riems.
BVDV-2 CS8644	Nzp BVDV-2 Stamm CS8644, zur Verfügung gestellt von M. Beer, FLI, Insel Riems.
BDV:	
BDV nzp X818	Nzp BDV Stamm X818, zur Verfügung gestellt von P. Becher, Tierärztliche Hochschule Hannover (Becher et al., 1998).
CSFV:	
Alfort Tübingen	Nzp CSFV Stamm Alfort Tübingen, zur Verfügung gestellt von M. König, JLU Gießen.
Brescia	Nzp CSFV Stamm Brescia, zur Verfügung gestellt von M. König, JLU Gießen.

Material und Methoden

MVA	Rekombinantes Vacciniavirus MVA (Modified Virus Ankara)-T7pol, von G. Sutter, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Oberschleißheim (Sutter et al., 1995); Vermehrung am Institut für Virologie, Gießen durch K. Müller und B. Schmidt.
-----	---

3.1.17 *E. coli* K12-Stämme

E. coli Stämme	Anwendung/Beschreibung
DH5 α	für Klonierungen in den Vektor pGEM-T; dieser Stamm erlaubt eine β -Galaktosidase-blau/weiß-Selektion.
GM33	Dam- und Dcm-methylierungs-negativ
HB101	für Standard-Klonierungen.

3.1.18 Antikörper und Seren

Name	Eigenschaften	Verdünnung	
		IF	WB
Code 4 (mAK 8.12.7)	Monoklonaler Antikörper gegen NS3; erkennt ein Epitop im viralen NS3 und NS2-3 Protein bei allen bisher untersuchten Spezies aus dem Genus Pestivirus; zur Verfügung gestellt von E. J. Dubovi (New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA, (Corapi et al., 1990)).	1:40	1:1.000
a18 (mAK)	Monoklonaler Antikörper gegen das Strukturprotein E2 von KSPV (Weiland et al., 1990).	1:5	-
anti-Jiv (mAK 9.4EI)	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen die Jiv90-Domäne des Jiv-Proteins; zur Verfügung gestellt von E. Lattwein (Universität Lübeck).	1:10	1:10
N3-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das Jiv-Protein gerichtet.	1:500	1:10.000
anti-DDX6	Polyklonales Kaninchenserum gegen die ATP abhängige RNA Helikase DDX6 (=RCK/p54) gerichtet, Fa. Aviva Systems Biology.	-	1:1500
Ge-1-Serum	Polyklonales Humanserum gegen das Ge-1 Protein von P-bodies gerichtet; zur Verfügung gestellt von Dr. Donald B. Bloch (Harvard Medical School, (Yu et al., 2005)).	1:200	-
Cy3-konjugierter Anti-Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanogen3 konjugiert (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA).	1:500	-

Cy3-konjugierter Anti- Kaninchen-IgG	Polyklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG des Kaninchens, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanogen3 konjugiert (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA).	1:500	-
FITC-konjugierter α - Human-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG des Menschen, mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugiert (Fa. Dianova).	1:500	-
Peroxidase-konjugierter α -Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Fa. Dianova).	-	1:10.000
Peroxidase-konjugierter α -Kaninchen-IgG	Polyklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG des Kaninchens, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Fa. Dianova).	-	1:10.000
IRDye®-680 konjugierter α -Kaninchen-IgG	Polyklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG des Kaninchens, mit dem Farbstoff IRDye®-680 konjugiert (Fa. LI-COR, Biosciences).	-	1:10.000

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit DNA

Die unter Kap 3.1.7 aufgeführten Basisplasmide waren aus vorherigen Arbeiten vorhanden und wurden freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.2.1.1 Präparation kompetenter Bakterien

Entsprechend der Methode nach Hanahan wurden kompetente *E. coli*-Bakterien der Stämme HB101, GM33 und DH5 α hergestellt (Hanahan, 1983). 10 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie des jeweiligen Stamms angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB++-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis die optische Dichte OD₆₀₀ einen Wert zwischen 0,4 und 0,55 erreichte. Die Bakteriensuspension wurde dann unter gelegentlichem Schwenken etwa 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 3.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml kaltem TfBI resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet in 4 ml

TfBII aufgenommen. Die Suspension der kompetenten Bakterien wurde in 50 µl- und 200 µl- Aliquots bei -70°C gelagert.

3.2.1.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen und anschließender Präzipitation der Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979) erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab zu analytischen Zwecken. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide vermitteln eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin. Mit einer einzelnen Bakterienkolonie, gewachsen auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte (1,5% Agar-Agar in LB-Medium; 50 mg/l Ampicillin), wurden 3 ml eines Ampicillin-haltigen (100 mg/l) LB-Mediums beimpft. Anschließend folgte die Inkubation der Kultur bei 37°C für mindestens sechs Stunden oder über Nacht in einem Bakterienrührer. 1,5 ml dieser Kultur wurden bei 13.000 g für 2 min abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl eiskaltem P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2 wurde das Reaktionsgefäß über Kopf geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl P3 zugegeben. Nach Vortexen der Probe erfolgte die Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C für 10 min. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt und bei 16.000 g und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 100 µl 70%igen (v/v) Ethanol auf einem Heizblock bei 37°C getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

3.2.1.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA und Konzentrationsbestimmung

Zur Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurden die Anionen-Austauscher-Säulen Nucleobond®AX 100 und die mitgelieferten Puffer (Fa. Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA-Präparation erfolgte in der Regel ausgehend von einem Flüssigkulturvolumen von 50 ml; bei der Präparation von Gesamtklon-DNA wurde das Volumen der Flüssigkultur sowie aller Pufferlösungen verdoppelt.

Die Bakterien wurden in 4 ml S1 resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml S2 und vorsichtigem Mischen für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 4 ml S3, vorsichtigem Mischen und 5 min Inkubation auf Eis ließ man die filtrierte Lösung über eine mit 2,5 ml N2 äquilibrierte Säule laufen. Die Säule wurde anschließend einmal mit 10 ml N3 gewaschen und schließlich die Plasmid-DNA mit 2,7 ml N5 eluiert. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 2,3 ml Isopropanol und Zentrifugation

bei 16.000 g und 4°C für mindestens 30 min. Nach dem Waschen mit 200 µl 70%igen (v/v) Ethanol und Trocknen der Pellets auf dem Heizblock bei 37°C wurde die DNA in 150 µl ddH₂O aufgenommen. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Plasmid-Präparation wurde die UV-Licht-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Fa. Pharmacia-Biotech) gemessen. Dazu wurden 1 µl der DNA-Lösung mit 99 µl ddH₂O verdünnt und die Absorption bestimmt. Als Referenz wurde reines ddH₂O verwendet. Bei einer Schichtdicke von 1 cm ergibt doppelsträngige DNA in einer Konzentration von 50 µg/ml einen Absorptionswert von 1. Davon ausgehend ergab sich die DNA-Konzentration nach Einberechnen des Verdünnungsfaktors von 100 in µg/µl durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 5.

3.2.1.4 Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken

Die für die spezifische Spaltung von DNA-Molekülen eingesetzten Restriktionsendonukleasen der Klasse II dienen der bakteriellen Zelle in vivo zum Schutz vor fremder DNA. Unerwünschte Fremd-DNA wird durch die Restriktionsenzyme fragmentiert und dadurch unschädlich gemacht; zelleigene DNA ist durch entsprechende DNA-Modifikationen (Methylierungen) vor dem Abbau geschützt. Zur Analyse von DNA und für Klonierungen wurden in dieser Arbeit Restriktionsenzym-Verdaue durchgeführt. Die hierfür verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsschnitte richteten sich bezüglich der Auswahl des Puffers und der Inkubationstemperatur nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers und eigenen Erfahrungen. Die Inkubationsdauer betrug für analytische Restriktionsenzym-Verdaue 30 bis 60 min, für Klonierungen oder Linearisierungen im Allgemeinen 1 bis 2 h. Der Enzymanteil im Ansatz sollte 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Enzyme in glycerolhaltigen Puffern aufbewahrt werden und zu hohe Glycerolkonzentrationen die Reaktion negativ beeinflussen können. In einigen Fällen führen zu hohe Enzymkonzentrationen oder ungeeignete Puffer auch zu einem teilweisen Verlust der Spezifität des Enzyms (Stern-Aktivität).

Zur Analyse von Plasmid-DNA (analytischer Verdau) wurden 100 bis 200 ng DNA aus Midi-Präparation oder 1 µl der Lösung aus Mini-Präparationen mit ausgewählten

Restriktionsenzymen verdaut. Die Auswahl des Enzyms oder der Enzyme richtete sich nach dem analytischen Zweck (z.B. Überprüfen der Intaktheit von Schnittstellen nach Klonierung über diese Schnittstellen; Überprüfen auf Vorhandensein einer Marker-Schnittstelle nach Mutagenese usw.). Die analytischen Verdauungen wurden im 10 µl-Maßstab durchgeführt; hierzu wurde die DNA unter Zugabe von 1 µl eines passenden Puffers (meist NEB 10x Puffer 1, 2, 3 oder 4) und gegebenenfalls 1% (v/v) BSA (Fa. NEB) durch Zugabe von 0,05 bis 0,25 µl Restriktionsenzym (je nach Konzentration und Restriktionsaktivität des Enzyms) für etwa 30 min bei der für die verwendeten Enzyme optimalen Temperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte im 0,8%- bzw. 1,5%igen Agarosegel (je nach erwarteten Fragmentgrößen) unter UV-Durchleuchtung (s.u.).

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur weiteren Klonierung (präparativer Verdau) wurde mit 3 bis 5 µg Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen in 50 µl-Ansätzen nach dem gleichen Schema verfahren. Wenn möglich wurden Klonierungstechniken mit Restriktionsenzymen angewandt, bei denen auf beiden Seiten der DNA-Fragmente kompatible 5'- oder 3'-Überhänge erhalten blieben (*sticky-sticky* Klonierungen). Auf diese Weise konnten intramolekulare Rück-Ligationen der Vektor-DNA reduziert und der erfolgreiche Einbau des Fragmentes in der gewünschten Orientierung mit intakten Übergängen sichergestellt werden. In einigen Fällen, z.B. wenn kompatible Schnittstellen der beiden Klonierungspartner fehlten, wurde auch mit glatten DNA-Enden (*blunt ends*) gearbeitet. Hierzu wurden Enzyme verwendet, die selbsttätig ein solches Ende ohne Überhang erzeugen (z.B. *EcoRV*), oder der 3'-Überhang wurde mittels Zugabe von 0,5 µl Klenow-Fragment (DNA Polymerase I, großes Fragment; 50 U/µl; Fa. NEB) nach dem Verdau mit dem ersten Enzym abgebaut; hierzu wurde die Reaktion 5 min bei 37°C und nach Zugabe von 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM) für weitere 10 min inkubiert. Alternativ wurde das Klenow-Fragment auch dazu genutzt, 5'-Überhänge der geschnittenen DNA in 5'→3'-Richtung aufzufüllen, um auf diese Weise ein glattes DNA-Ende zu erhalten. In diesem Fall wurde die Reaktion nach gleichzeitiger Zugabe von 0,5 µl Klenow-Fragment und 1 µl dNTPs für 15 min bei 37°C inkubiert.

Vor dem Schnitt mit einem zweiten Enzym musste das Klenow-Fragment durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt werden. Hierzu wurde der Reaktionsansatz mit dem gleichen Volumen gesättigtem Phenol (Roti-Phenol, gesättigt mit 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; 0,1% (w/v) Hydroxychinolin, Fa. Roth) gründlich

vermischt. Nach Zentrifugation bei 16.000 g für 5 min wurden Phenol-Reste durch die Zugabe von einem Volumen Chloroform zur wässrigen Phase entfernt und das Gemisch erneut zentrifugiert (s.o.). Aus dem wässrigen Überstand wurde die DNA nach Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol und 1/10 Volumen 4 M Lithiumchlorid für mindestens 30 min bei -20°C gefällt und anschließend bei 16.000 g und 4°C 30 min abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70%igen (v/v) Ethanol und erneuter Zentrifugation (16.000 g; 5 min) wurde das Pellet getrocknet und in ddH₂O resuspendiert. Mit diesem Verfahren wurde auch die zur stabilen Transfektion von eukaryontischen Zellen (s. u.) bestimmte Plasmid-DNA nach Linearisierung mittels Restriktionsenzymverdau aufgereinigt.

Um im Rahmen einer Klonierung die intramolekulare Ligation der Moleküle eines geschnittenen Vektors ohne Einbau des Fragmentes zu verhindern, wurde bei Bedarf, vor allem aber bei Arbeiten mit einem glatten DNA-Ende und bei gleichen 5`- und 3`-Enden, das geschnittene Vektor-Plasmid dephosphoryliert. Hierzu wurden nach dem Restriktionsverdau der DNA 10% (v/v) Dephosphorylierungs-Puffer (Fa. Roche) und 1 U Alkalische Phosphatase (CIP, *calf intestine phosphatase*; 1 U/μl; Fa. Roche) zugegeben und die Reaktion 5 min bei 37°C inkubiert.

Die geschnittene DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese im 0,8%- bzw. 1,5%igen Agarosegel (je nach Fragmentgrößen) aufgetrennt und die entsprechende Bande unter UV-Durchleuchtung (312 nm) aus dem Gel ausgeschnitten (s.u.).

3.2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese von DNA und Isolation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von TAE-Puffer diente modifiziertes TAE-Puffer-Konzentrat (50x *Modified Tris-Acetate-EDTA buffer*, Fa. Millipore), das mit Wasser auf einfache Konzentration verdünnt und mit 100 μg/l Ethidiumbromid versetzt wurde. Das enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert anschließend bei Anregung durch UV-Licht (254 oder 312 nm Wellenlänge). Meist wurden Gele mit 0,8% (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet; bei kleinen DNA-Fragmenten (<500 Bp) lag die Agarosekonzentration bei 1,5% (w/v). Die Agaroselösung wurde nach dem Aufkochen in der Mikrowelle bei 60°C im Wasserbad gelagert. Vor dem Auftragen der DNA-Proben auf das Gel wurden diese im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer (0,1% (w/v) Orange-G; 30% Glycerin) vermischt. Parallel zu den Proben wurde auf jedem Gel auch ein 1 Kb-DNA-Leiter (Fa.

Invitrogen) als Größenstandard aufgetragen. Die Gel-Apparaturen aus der Werkstatt des Mehrzweckinstitutes (MZI) Gießen hatten einen Elektrodenabstand von 15 cm. Die Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer elektrischen Gleichspannung von 120 V für etwa 25 min. Die Fluoreszenz der Proben auf analytischen Gelen wurde im UV-Durchlicht (254 nm Wellenlänge) betrachtet und computergestützt mittels des Systems GelPrint 2000i (MWG) durch Thermodruck dokumentiert.

Präparative Gele wurden zur Vermeidung von Strangbrüchen der DNA im UV-Durchlicht bei 312 nm Wellenlänge betrachtet, die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur weiteren Verwendung aus dem Gelfragment isoliert. Hierzu dienten die Filter des *DNA Agarose Gel Extraction Kit* (Ultrafree DA), die nach Vorschrift des Herstellers (Fa. Millipore) eingesetzt wurden; nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 3.500 g, bei der die festen Gelbestandteile zurückgehalten werden, befindet sich die extrahierte DNA im Filtrat und kann direkt weiter verwendet werden.

DNA-Fragmente aus Gesamtklonen wurden ohne direkte UV-Durchleuchtung aus präparativen Gelen isoliert. Hierzu diente ein Aliquot der parallel im analytischen Gel aufgetrennten DNA als Größenmarker; erst nach dem „blinden“ Ausschneiden des Fragmentes auf gleicher Höhe im präparativen Gel wurde der Erfolg im UV-Durchlicht begutachtet.

3.2.1.6 Ligation und Transformation in *E. coli*

Die isolierten Vektoren und Fragmente (s.o.) wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (350 U/μl; Fa. TaKaRa) neu verbunden. Dieses Enzym 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.

In der Regel wurden 3 μl Vektor-DNA-Lösung und 5,5 μl Fragment-DNA-Lösung zusammen mit 1 μl 10x Ligase-Puffer (TaKaRa) und 0,5 μl T4-DNA-Ligase (Fa. TaKaRa) vermischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Falle einer Ligation eines Vektors mit zwei Fragmenten („Drei-Fragment-Ligation“) wurden 1,5 μl Vektor- und jeweils 3,5 μl Fragment-DNA-Lösung eingesetzt. Zu jeder Ligation wurde parallel auch eine Religationskontrolle angesetzt. Diese bestand aus den gleichen Komponenten wie der Ligationsansatz, jedoch wurde anstelle der Fragment-DNA-Lösung ddH₂O zugegeben. Diese Kontrolle diente später zur Abschätzung der

Effizienz des Fragment-Einbaus im Vergleich zur intramolekularen Rückligation des Vektors.

Zur Transformation wurden jeweils 50 µl transformationskompetenter *E. coli* K12 HB101-Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend zum Ligations- und Religationsansatz pipettiert. Nach 25 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Die Bakterienzellen wurden danach 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 200 µl LB-Medium für 25 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden die Bakterien auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte (Ampicillin 50 mg/l) ausplattiert, wo man nach Inkubation bei 37°C über Nacht die herangewachsenen Kolonien beurteilen konnte.

Die Retransformation bereits isolierter Plasmide (z.B. zur Vermehrung der DNA aus einer Mini-Präparation im Midi-Maßstab) erfolgte nach dem gleichen Prinzip, allerdings genügten hierfür 1 µl Plasmid-Lösung bzw. 100 ng DNA; die (re)transformierten Bakterien dienen dann sowohl zur direkten Animpfung einer Flüssigkultur als auch dem Ausplattieren auf einer Agarplatte.

3.2.1.7 PCR, RT-PCR und Klonierung in pGEM-T

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA, bei der sehr geringe DNA-Mengen vervielfältigt werden können. Die Selektivität beruht auf der Bindung zweier Oligonukleotide, die zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNA komplementär sind, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen. Das als kodierender Primer bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNA, während das als reverser Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach der Auftrennung des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen (Denaturierung, „Schmelzen“) lagern sich beide Primer bei Absenken der Temperatur an die komplementäre DNA-Sequenz an (Annealing, Hybridisierung). Im nächsten Schritt dienen sie der hitzebeständigen Taq-DNA-Polymerase als Startmoleküle für die DNA-Synthese (Elongation, Synthese). Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird etwa 30 mal wiederholt, was zur exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Abschnittes in der Reaktion führt. Durch Verlängerungen an den 5'-Enden der verwendeten Primer können an den Enden des PCR-Produktes auch kurze Sequenzen eingebaut werden, die nicht zur Matrize homolog sind; meist handelt es sich dabei um Erkennungssequenzen für

Material und Methoden

Restriktionsenzyme, die zur späteren Klonierung des DNA-Abschnittes benötigt werden.

In der Regel wurden PCRs zur späteren Klonierung der Produkte im 50 µl Ansatz durchgeführt. 30 - 50 ng des als Matrize (Template) dienenden Ausgangs-Plasmides wurden hierzu mit jeweils 2 µl beider Primerlösungen (10 pmol/µl), 1 µl dNTP-Lösung (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 µl Puffer (10x Biotherm™-Puffer), ddH₂O und 0,5 µl Biotherm™-DNA-Polymerase (5 U/µl) gemischt und im Thermocycler inkubiert. Eine zweiminütige Inkubation bei 40°C vermied während der Aufheizphase der oberen Heizplatte Kondensationen am Deckel der PCR Gefäße. Anschließend erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 2 min und dann 30 Zyklen aus Denaturierung (94°C, 30 sec), Hybridisierung (50 - 56°C, 45 sec) und Synthese (72°C, 1 min je 1 Kb). Es folgte eine abschließende Elongation von 5 min und die Abkühlung der Reaktion auf 4°C.

Die Sequenz der benötigten Oligonukleotide wurde mit Hilfe des GCG-Programm Paketes (*Genetics Computer Group*, Madison, Wisconsin, USA) im HUSAR-System (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) bestimmt. Hierbei fanden vorwiegend die Befehle „*seqed*“ (Festlegung der Primersequenz), „*map*“ (Auffinden der Restriktionsenzym-Schnittstellen sowie von Mutationen, die zur Generierung neuer Restriktionsenzym-Schnittstellen dienen) und „*gap*“ (Überprüfung der Homologie zur Matrize) Anwendung.

Zur Durchführung einer RT-PCR wurde zunächst ein Startmix (20 pmol reverser Primer; 1 µg Gesamtzell-RNA; ad 11 µl mit RNase-freiem ddH₂O) für 2 min auf 92°C erhitzt und anschließend wieder auf 4°C gekühlt, um die Bindung des reversen Primers an die RNA zu erreichen. Nach Zugabe des RT-Mixes aus 8 µl Puffer A, 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor und 0,5 µl reverser Transkriptase (Superscript II RT; 200 U/µl) wurde die reverse Transkription 45 min bei 37°C durchgeführt, dann 2 min bei 80°C denaturiert und wieder auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe des PCR-Mixes aus 10 µl Puffer B, 20 pmol des kodierenden Primers, 1 µl Biotherm Polymerase und 18,5 µl ddH₂O wurde ein PCR-Programm mit 30 Zyklen gestartet.

Jeder (RT-)PCR-Ansatz wurde durch Agarosegel-Elektrophorese auf Größe und Reinheit des Produktes hin untersucht. Die amplifizierte DNA wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Durchlicht-Kontrolle (312 nm Wellenlänge) aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des „*DNA Agarose Gel Extraction Kit*“ (Ultrafree DA) isoliert. 3 µl dieser DNA-Lösung wurden mit 1 µl pGEM-

T-Vektor (54 ng/μl), 5 μl des mitgelieferten 2x Ligase-Puffers und 1 μl (35 U) der mitgelieferten T4-DNA-Ligase gemischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde zur Transformation von 50 μl einer Suspension kompetenter *E. coli* DH5α-Bakterien verwendet, die eine β-Galaktosidase-vermittelte Blau-weiß-Selektion erlauben. Das Gemisch aus Bakterien und Ligations-Ansatz wurde 25 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min bei 42°C), dem anschließenden Abkühlen auf Eis (2 min) und der Zugabe von 200 μl LB-Medium wurden die Zellen für 25 min bei 37°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren auf einer Ampicillin-haltigen (50 mg/l) Agarplatte erfolgte die Zugabe von 20 μl einer 4%igen (w/v) X-Gal-Lösung.

3.2.1.8 Gerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden über die QuikChange™-Methode (Fa. Stratagene) nach den Angaben des Herstellers in die entsprechenden Plasmide eingeführt. Zur Generierung einer Mutation wurden zwei Oligonukleotide benutzt, die im identischen Bereich an beide Stränge der DNA-Matrize binden und die gewünschte Mutation tragen. Diese Primer sind in der Regel 30 - 40 Bp lang, da sich zu beiden Seiten der Mutation noch eine etwa 15 Basen Matrizen-homologe Sequenz befinden sollte; der GC-Gehalt sollte über 40% und die Schmelztemperatur (T_m) oberhalb von 78°C liegen. Zusätzlich zur eigentlichen Mutation enthielten die Primer noch eine zusätzliche Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, deren Einbau keine Auswirkungen auf die kodierte Aminosäuresequenz hatte (stille Mutation). Diese Schnittstelle erleichterte später die Analyse auf das Vorhandensein der Mutation vor der Durchführung weiterer Klonierungsschritte.

Die beiden Primer wurden in einer PCR-Reaktion mit dem wt-Plasmid als Matrize eingesetzt, in deren Verlauf das gesamte Plasmid mit der gewünschten Mutation amplifiziert werden konnte. Hierzu wurden im 50 μl-Ansatz 10 - 50 ng wt-Plasmid, 100 pmol beider Primer, 1 μl dNTP-Mix (jeweils 10 mM), 5 μl 10x Puffer (für Pfu-Polymerase) und 1 μl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/μl; Promega) gegeben. Im Thermocycler erfolgten 20 Zyklen mit 30 sec Denaturierung (95°C), 1 min Hybridisierung (55°C) und 2 min Synthese (68°C) je Kb Plasmidlänge. Nach der Reaktion wurden 5 μl des Ansatzes zur späteren Analyse abgenommen und der Rest nach Zugabe von 1 μl *DpnI* (10 U/μl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur methylierte, d.h. aus Bakterien (*E. coli*) stammende DNA, nicht aber

die während der PCR *in vitro* entstandene unmethylierte DNA; auf diese Weise wird die Wildtyp-Matrize zerstört. Nach dem Verdau mit *DpnI* wurde erneut eine 5 µl-Probe aus dem Reaktionsansatz entnommen und zusammen mit der ersten Probe über Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Eine nicht sichtbare oder nur schwache Reduktion der Signalstärke durch den *DpnI*-Verdau war ein Hinweis auf eine erfolgte DNA-Synthese. Die neu synthetisierte DNA ist wie die Ausgangs-DNA doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche an den Enden der jeweiligen eingebauten Primer auf. Erst nach Transformation der neu synthetisierten DNA in Bakterien erfolgt die „Reparatur“ dieser Brüche durch zelleigene Ligations-Mechanismen, was zur Entstehung eines intakten Plasmids führt.

1 µl der Reaktion wurde in 50 µl kompetente *E. coli* HB101 transformiert, die Plasmid-DNA einzelner Kolonien gewonnen und der entsprechende Abschnitt des Plasmids sequenziert. Ein Abschnitt des sequenzierten Bereiches, der die gewünschte Mutation enthält, wurde über singuläre Restriktionsenzym-Schnittstellen in das endgültige Plasmid überführt.

3.2.1.9 Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen

Die enzymatische Methode zur Ermittlung von DNA-Sequenzen durch Kettenabbruch wurde 1977 entwickelt (Sanger et al., 1977). Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wird hierbei, ausgehend von einem Oligonukleotid als Primer, durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase in vier getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert. Jeder dieser Reaktionsansätze enthält sowohl ddH₂O, Puffer, DNA-Polymerase, den Sequenzier-Primer sowie alle vier dNTPs. In jedem der vier Reaktionsansätze befindet sich neben diesen regulären dNTPs auch jeweils eine Sorte deren 2'3'-Dideoxy-Derivate (ddCTP, ddATP, ddTTP oder ddGTP) in einem bestimmten Verhältnis zu den regulären dNTPs. Die ddNTPs werden im Laufe der Reaktion von der Polymerase ebenso in die entstehende DNA eingebaut wie die dNTPs, allerdings bricht die Kettenverlängerung nach einem ddNTP ab, da keine 3'-OH-Gruppe mehr zur Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbindung vorhanden ist. Da diese Kettenabbrüche statistisch verteilt erfolgen, werden DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge synthetisiert. In einem ersten Reaktionsansatz sammeln sich alle Fragmente, die mit einem G enden, im zweiten diejenigen mit A, in einem weiteren diejenigen mit T und im letzten Reaktionsansatz alle Fragmente mit einem C am Ende. Die

Auftrennung der DNA aus den einzelnen Ansätzen in vier benachbarten Spuren eines hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgels erlaubt einen Nachweis der entstandenen Fragmente, auch wenn der Größenunterschied nur ein Nukleotid beträgt. Da der Sequenzier-Primer an einen Fluoreszenzfarbstoff (IRD-800, *infrared dye-800*, Fa. MWG-Biotech) gekoppelt ist, können die Fragmente durch Anregung über einen Laser und Detektion des emittierten Lichtes sichtbar gemacht und die Sequenzen computergestützt ausgelesen werden.

Für Sequenzierungen wurde Plasmid-DNA aus Mini- oder Midipräparationen verwendet. Pro Plasmid kamen etwa 0,2 µg Midi-DNA je Kb Plasmidlänge bzw. 12-15 µl Mini-DNA zum Einsatz. Nach Zugabe von 2 pmol des passenden IRD-800-gekoppelten Sequenzier-Primers und Auffüllen mit ddH₂O auf insgesamt 25 µl wurde das Gemisch zu je 6 µl auf vier PCR-Gefäße verteilt, in denen sich jeweils 2 µl G-, A-, T- oder C-Mix aus dem „*Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTP™*“ (Fa. Amersham) befanden, und nach Mischen im Thermocycler inkubiert (2 min 40°C; 2 min 95°C; dann 30 Zyklen mit 30 sec 94°C, 30 sec 50°C und 45 sec 70°C; gefolgt von 5 min 70°C und anschließend Abkühlen auf 4°C). Die Reaktionen wurden anschließend mit 4 µl Stop-Lösung versetzt und 2 min bei 70°C denaturiert.

Das Auftrennen der Proben in 0,2 mm dicken Polyacrylamidgelen und die Detektion der Sequenzmuster erfolgte mit dem LI-COR 4000 L™ DNA-Sequenzierer (Fa. LI-COR). Lange Gele (66 cm) wurden für das Lesen von bis zu 1.200 Basen verwendet; kurze Gele (40 cm) für die Sequenzierung von Fragmenten bis zu 800 Basen Länge. Nach Reinigung, Entfettung und Zusammenbau der Glasplatten wurde die Polyacrylamid-Lösung mittels 50 ml Spritze durch einen 0,45 µm-Filter zwischen die Platten gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente eine 1:10 Verdünnung des 10x LongRun-Konzentrates. Die Polyacrylamid-Lösung für lange Gele (4%) bestand aus 32 ml Sequagel® XR, 8 ml Sequagel-Puffer, 2 ml 10x LongRun-Puffer, 15 ml H₂O, 8 g Harnstoff, 400 µl 10%igem APS und 20 µl TEMED; für ein kurzes Gel kamen 30 ml Sequagel® XR, 7,5 ml Sequagel-Puffer, 300 µl 10%iges APS und 400 µl DMSO zum Einsatz. Die Gelsubstanz polymerisierte nach dem Gießen mindestens 1 h lang; danach wurden die Glasplatten von außen erneut gereinigt und zwischen die Elektroden des Sequenzierers montiert. Dem Auffüllen der Puffer-Tanks mit LongRun-Puffer folgte ein 30-minütiger Vorlauf (lange Gele: 2000 V, 37 mA, 50 W, 45°C; kurze Gele: 1500 V, 37 mA, 50 W, 50°C). Anschließend wurde ein 48er-

Haifischzahn-Kamm eingesteckt, in jede Aussparung 1 µl der entsprechenden Proben aufgetragen und die Hochspannung mit den gleichen Bedingungen wie beim Vorlauf wieder eingeschaltet. Durch die Software-Funktionen des Programms DataCollection „Autofocus“ und „Autogain“ wurde eine korrekte Justierung der Optik von Laser und Scanner sowie eine optimale Signal-Verstärkung sichergestellt und anschließend der Scanner eingeschaltet. Das virtuelle Gelbild konnte schon während des Laufes betrachtet und später mit Hilfe der zugehörigen Software (Programm „ImageAnalysis“) automatisch oder manuell ausgewertet werden.

Die Sequenzdateien wurden zusammen mit den zur Auswertung benötigten Sequenzen über eine FTP-Verbindung auf einen Server des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg übertragen; hier stand das GCG-Programm-Paket (*Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA*) im HUSAR-System (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*) zur Analyse der Daten zur Verfügung. Zum Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den gesuchten Sequenzen wurde das Programm „gap“ verwendet; die Ergebnisse wurden manuell überprüft und durch einen Ausdruck dokumentiert.

3.2.2 Arbeiten mit RNA

3.2.2.1 *In vitro*-Transkription

Auf der Grundlage gereinigter und linearisierter Plasmid-DNA erfolgte eine *in vitro*-Transkription von RNA mit Hilfe des Kits MAXIscript™ der Firma Ambion nach den Vorgaben des Herstellers unter Verwendung der SP6- oder T7-DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Die doppelsträngige DNA-Vorlage beinhaltet einen SP6- bzw. T7-Promotor oberhalb der zu transkribierenden Region und wurde unterhalb dieses Bereiches durch einen Restriktionsenzym-Verdau mit einem singularär schneidenden Enzym (i.d.R. *SmaI*) linearisiert. Die vollständige Linearisierung von 2 µg Plasmid-DNA wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10% (v/v) 3 M Natriumacetat-Lösung und zwei Volumen Ethanol gestoppt; die Fällung der linearen DNA erfolgte bei -20°C über Nacht, bevor sie am folgenden Tag bei 16.000 g und 4°C für 30 min abzentrifugiert wurde. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde die DNA in 13 µl ddH₂O resuspendiert und in die Transkriptions-Reaktion eingesetzt. Hierzu wurden 2 µl Transkriptionspuffer, jeweils 1 µl ATP, CTP, GTP und UTP (je 10 mM) und 2 µl SP6 bzw. T7-Enzym-Mix zugemischt. Die Transkriptionsreaktion fand für 1 h bei 37°C statt. Die Konzentration

der RNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt oder durch UV-Absorptionsmessung (s.u.) bestimmt. Die Infektiösität der transkribierten RNA wurde in einem Plaque Assay ermittelt (siehe Kap. 3.2.4.6.1). Die RNAs wurden bei -70°C gelagert.

Bezeichnung	Enzym zur Linearisierung	Verwendeter Promotor für <i>in vitro</i> -Transkription
pDI9	<i>SmaI</i>	SP6
pNCP7/Osloss	<i>SmaI</i>	SP6
pNCP7-5A	<i>SmaI</i>	SP6
pNCP7 auth. 3'NTR	<i>SmaI</i>	SP6
pCP7-5A	<i>SmaI</i>	SP6
pNADL ⁻ Jiv90 pac	<i>SbfI</i>	T7
pCSFV Alfort Tübingen	<i>SmaI</i>	SP6
pRiems	<i>SrfI</i>	T7
pAlfort/Riems	<i>SrfI</i>	T7
pAlfort 187	<i>SrfI</i>	T7

3.2.2.2 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

RNA-Präparationen aus Zellen wurden mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit (Fa. Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor der Präparation wurde der benötigte Puffer RPE (Zugabe von 220 ml Ethanol zu 275 ml Pufferkonzentrat) angesetzt. Etwa 2×10^6 Zellen wurden nach Abnahme des Zellkulturüberstandes und Waschen mit PBS durch Zugabe von 350 µl RLT und 3,5 µl β-Mercaptoethanol in der Zellkulturschale lysiert. Zur Scherung der chromosomalen DNA und der Reduktion der Viskosität diente die Filtration durch eine QIAshredder® Filtereinheit mittels Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min in einer Tischzentrifuge. Um in der homogenisierten Lösung die benötigten RNA-Bindungs-Konditionen einzustellen, erfolgte die Zugabe von 350 µl 70% (v/v) Ethanol, bevor die Mischung auf eine RNeasy Mini Spin Säule pipettiert und für 30 sec bei 8.000 g zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte das Waschen der Silikamembran durch Zugabe von 700 µl RW1 und Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min. Durch Zugabe von 500 µl RPE wurde die Säule zwei weitere Mal gewaschen. Die gereinigte RNA konnte anschließend

durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem ddH₂O und Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g eluiert werden.

Um den RNA-Gehalt der Lösungen zu bestimmen, wurde die UV-Licht-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglas-Küvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Fa. Pharmacia Biotech) gemessen. 1 µl der RNA-Lösung wurde hierzu mit 99 µl ddH₂O verdünnt und die Absorption dieser Lösung, gegen reines Wasser als Referenz bestimmt. Einzelsträngige RNA in einer Konzentration von etwa 40 µg/ml ergibt bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Absorptionswert von 1. Ausgehend von diesen Werten ergab sich mit einem Verdünnungsfaktor von 100 die RNA-Konzentration in µg/µl durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 4.

3.2.2.3 Isolierung von mRNA aus Gesamtzell-RNA

Die wie oben beschrieben isolierte RNA wurde mit Hilfe des Oligotex® Kits nach Angaben des Herstellers weiterbearbeitet. Das Gesamtvolumen wurde von 50 µl auf 250 µl mit RNase freien H₂O erhöht. Anschließend wurden weitere 250 µl des Puffers OBB sowie 15 µl Oligotex Suspension zugegeben und bei 70°C für 3 min inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Es schließt sich eine 10-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur an. Dieser Schritt ist erforderlich, um die Hybridisierung der OligodT30 der Oligotex Suspension und dem Poly-A-Schwanz der mRNA zu ermöglichen. Nach Zentrifugation für 2 min bei 10.000 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl OW2 resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 µl erhitzten OEB (70°C) resuspendiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 11.000 g wurde die eluierte mRNA in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der RNA erfolgte für längere Zeiträume bei -70°C.

3.2.2.4 Real-Time RT-PCR

Um die zelluläre Jiv-mRNA-Menge boviner und humaner Zelllinien vergleichen zu können, wurde Gesamtzell-RNA mittels quantitativer Real-Time RT-PCR analysiert. Nach der reversen Transkription mit dem reversen Primer und der reversen Transkriptase Superscript II (Fa. Invitrogen) wurde die quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Dazu wurde das Gerät AbiPrism7000 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems) im „Absolute Quantification“-Modus verwendet. Mit dem

Primerpaar Jiv01/Jiv02R bzw. hJiv01/hJiv02R sowie ABsolute™QPCR Mix (Fa. ABgene) und der Jiv-spezifischen TaqMan®-Sonde JivTaq01 bzw. humJivTaq02 wurde das Real-Time Programm mit einem Zyklus (2 min 50°C, 15 min 95°C) gefolgt von 40 Zyklen (15 sec 95°C, 1 min 60°C) durchgeführt.

TaqMan®-Sonden sind am 5´-Ende und am 3´-Ende mit Fluorochromen (Reporter und Quencher) markiert, so dass nur die an amplifizierte DNA gebundene Sonde ein Signal erzeugt. Somit ist die gemessene Signalstärke des Reporter-Fluorochroms proportional zur Menge gebundener Sonde und zur Menge des Amplifikats. Die Auswertung erfolgt, indem derjenige PCR-Zyklus bestimmt wird, in welchem die Signalstärke einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet; dies ist der Ct-Wert (cyclus terminalis).

3.2.3 Arbeiten mit Proteinen

3.2.3.1 Immunpräzipitation

Durch Inkubation eines Zell-Lysates mit einem spezifischen Antikörper entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe, die durch Zugabe einer Affinitätsmatrix aus der Lösung durch Zentrifugation gereinigt werden können (Harlow und Lane, 1998). Nach Denaturierung und Auftrennung über SDS-PAGE können die präzipitierten Proteine in einem Western Blot nachgewiesen werden.

Zellen wurden im 6-Well-Format kultiviert und mit 350 µl RIPA Puffer lysiert. Das durch Zentrifugation (2 min, 16.000 g) von unlöslichen Bestandteilen gereinigte Zell-Lysat wurde für 1 h bei 4°C auf einem vertikalen Drehrad gemeinsam mit dem Antikörper inkubiert. Zum Einsatz kam der gereinigte monoklonale Antikörper Code 4, der gegen das pestivirale NS3 Protein gerichtet ist. Nach der Bindung des Antikörpers wurden 50 µl Anti-Maus IgG Beads („Mouse IgG TrueBlot™Set“, Fa. eBioscience) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad wurde die Suspension 5 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet nach Aufnahme in 100 µl SDS-Lysepuffer mit 5% (v/v) β-Mercaptoethanol 10 min bei 95°C inkubiert, anschließend abgekühlt und kurz zentrifugiert. Der komplette Überstand wurde zur Beladung einer Tasche eines großen Polyacrylamidgels (13 x 15 cm) verwendet.

3.2.3.2 SDS-PAGE

Für die Durchführung von Natriumdodecylsulfat (SDS) - Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen in Tracingelen wurden für kleine Gele (8,5 x 6,0 cm) Gelapparaturen aus der Werkstatt des MZI Gießen und für große Gele (13 x 15 cm) Gelapparaturen der Firma Hoefer benutzt. Die Trenngele hatten je nach Größe der gesuchten Proteine einen Acrylamid-Anteil von 8 bis 12% (w/v) in Gelpuffer. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von jeweils 0,05% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% (v/v) TEMED gestartet. Die Sammelgele bestanden aus 4% (w/v) Acrylamid in Gelpuffer mit 0,08% (w/v) APS und 0,1% (v/v) TEMED. Die verwendete Acrylamid-Lösung (Fa. AppliChem) hatte eine Konzentration von 40% (w/v) und enthielt Acrylamid und N, N'-Methylen-Bisacrylamid im Verhältnis 29:1. Die Proben wurden in SDS-Lysepuffer mit 5% (v/v) β -Mercaptoethanol zur Denaturierung 10 min auf 95°C erhitzt. Als Molekulargewicht-Standard diente ein auf jedes Gel aufgetragener gefärbter Protein-Marker (*Prestained Protein Marker Broad Range*, Fa. NEB). Falls eine weitere Analyse über Autoradiographie vorgesehen war, wurden zusätzlich noch 2 μ l eines durch [¹⁴C]-Methylierung radioaktiv markierten Molekulargewicht-Standards (Fa. Amersham) auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer zur Elektrophorese dienten Anoden- und Kathodenpuffer; die angelegte elektrische Spannung betrug bei kleinen Gelen 120 V für etwa 90 min; große Gele liefen über Nacht bei Spannungen zwischen 45 und 60 V, je nach der Konzentration des Acrylamids im Trenngel und der gewünschten Laufweite. Die Elektrophorese wurde i.d.R. abgebrochen, sobald die Bromphenolblau-Front an der Anoden-Seite des Gels ausgetreten war. Nach der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel wurde abgetrennt. Das Trenngel wurde zur Durchführung eines Western Blots verwendet.

3.2.3.3 Western Blot („*semi-dry*“ Verfahren)

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose-Membran Bio Trace NT (Fa. Pall Gelman Laboratory) im elektrischen Feld (Western Blot) wurde mit Hilfe der Elektroblot-Apparatur Trans-Blot® SD (BioRad) in einem halbtrockenen Verfahren („*semi-dry*“) durchgeführt. Die Puffer Roti-Blot® A und K (Fa. Roth) wurden dazu nach den Angaben des Herstellers eingesetzt: 10% (v/v) Pufferkonzentrat und 20% (v/v) Methanol in Wasser.

Die Gele wurden 5 min im Kathodenpuffer geschwenkt, während die Membran mit Anodenpuffer befeuchtet wurde. Anschließend wurden auf der Anode der Blot-Apparatur drei mit Anodenpuffer befeuchtete Filterpapiere (Fa. Whatman) passender Größe und die Membran übereinander platziert. Auf die Membran wurde das Gel, darüber weitere drei mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. Nach dem Entfernen von Luftblasen zwischen den Schichten und dem Anbringen der Kathode wurde eine elektrische Gleichspannung (maximal 13 V) angelegt. Für den Proteintransfer aus kleinen Gelen wurde der Stromfluss auf 5 mA/cm^2 , bei großen auf 3 mA/cm^2 begrenzt. Die Transferdauer lag für kleine Gele bei 30 min, für große Gele bei 60 min. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach dem Proteintransfer für mindestens 1 h in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-Tween (0,05% (v/v) Tween-20 in PBS) unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert; anschließend erfolgte i.d.R. eine Inkubation bei 4°C über Nacht, wodurch die Hintergrundsignale deutlich verringert werden konnten. Nach kurzem Waschen der Membran mit PBS-Tween erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (monoklonaler Antikörper oder Kaninchen-Immunsereum, verdünnt mit PBS-Tween in unterschiedlichem Verhältnis abhängig vom Antikörper). Nach Inkubation für 1 h und dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit PBS-Tween wurde der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus-IgG bzw. gegen Kaninchen-IgG zugegeben (verdünnt mit PBS-Tween im Verhältnis 1:10.000) und die Membran unter Schwenken 1 h mit dieser Lösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschvorgängen mit PBS-Tween wurde die Membran mit frisch angesetzter Chemilumineszenz-Lösung (Fa. Perkin-Elmer) nach Vorschrift des Herstellers befeuchtet. Nach einer zweiminütigen Inkubation wurde überschüssige Lösung abgetupft und die Membran mit einer Klarsichtfolie abgedeckt. Biomax®-Röntgenfilme (Fa. Kodak) passender Größe wurden durch direkte Exposition zunächst für 30 sec belichtet und sofort entwickelt. Je nach Intensität des erhaltenen Signals wurden anschließend längere oder kürzere Belichtungszeiten gewählt.

3.2.3.4 T7-Vacciniavirus Expressionssystem

Die Infektion von BHK-Zellen mit rekombinantem Vacciniavirus MVA-T7pol führt zur Expression der T7-DNA-abhängigen RNA-Polymerase im Zytoplasma dieser Zellen. Durch die anschließende Transfektion von Plasmiden, die unter Kontrolle des T7-Polymerase Promotors stehen, werden mRNAs transkribiert (Sutter et al., 1995). Da

die so entstehenden Transkripte an den 5'-Enden nur uneffizient mit Cap-Strukturen versehen werden, wurden in dieser Arbeit zur T7-Vaccinia-Expression Plasmide verwendet, die auf dem Vektor pCITE basieren. Die in dieser Transkriptionskassette enthaltene IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) verbessert die Effizienz der Translation der entstehenden mRNAs deutlich, da die Initiation der Translation cap-unabhängig erfolgt.

Die zur Expression eingesetzten BHK-Zellen wurden am Vortag im 6-Well-Format so ausgesät, dass am nächsten Tag ein optisch lückenloser Zellrasen vorlag. Die Infektion mit dem Vacciniavirus MVA-T7pol erfolgte in 1 ml serumfreiem Medium für 1 h im Brutschrank mit einer MOI von 3. Zur Transfektion der Expressionsplasmide wurde das Transfektions-Reagenz Superfect® nach der Vorschrift des Herstellers (Fa. Qiagen) verwendet. Bei dieser Transfektionsmethode handelt es sich um eine Lipofektion (Felgner et al., 1987) mit einer kationischen Trägersubstanz, die eine endosomale Aufnahme von DNA ermöglicht und den pH-Wert im Lysosom abpuffert, sobald die Fusion von Endosom und Lysosom stattgefunden hat. Dadurch wird ein Transport der auf diese Weise stabilisierten DNA in die Zelle ermöglicht. Zur Transfektion wurden 2 µg Plasmid-DNA (bei Doppeltransfektionen pro Plasmid 1,5 µg DNA) mit 70 µl Medium ohne FCS und Antibiotika vermischt. Diese Lösung wurde mit 10 µl Superfect® versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Vacciniavirus-Infektion wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und nach Waschen mit PBS durch 1 ml Zellkulturmedium mit FCS und Penicillin/ Streptomycin ersetzt. Die Transfektionsansätze wurden dazugegeben und durch Schwenken der Platte auf den Zellen verteilt.

Zur weiteren Analyse mittels Western Blot wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in jeweils 600 µl SDS-Lysepuffer unter Zusatz von 5% (v/v) β-Mercaptoethanol lysiert und das Lysat bei -20°C gelagert.

Zur radioaktiven Proteinmarkierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Überstand durch 1 ml Methionin- und Cystein-freies DMEM-Hungermedium ersetzt (*Dulbecco's modified Eagle's Medium* ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure mit Zusatz von 1% (v/v) Glutamax-Lösung). Die Inkubation im Hungermedium für 1 h führt zur Entleerung der intrazellulären Speicher der schwefelhaltigen Aminosäuren und erhöht die Effizienz der nachfolgenden metabolischen Markierung der Proteine. Nach erneutem Austausch des Mediums mit Methionin- und Cystein-freiem Hungermedium erfolgte die Zugabe von 50 µCi [³⁵S]-markiertem Methionin und

Cystein (ProMix, Fa. Amersham). Die radioaktiv markierten Aminosäuren wurden durch Schwenken der Platte verteilt, die Zellen für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 600 µl RIPA-Puffer unter Zusatz von 0,5% (v/v) des Proteinase-Inhibitors Pefabloc-SC (Fa. Merck) unter Schwenken lysiert. Die Lysate wurden für 30 min bei 4°C auf einem vertikalen Drehrad inkubiert, um eine vollständige Lyse zu erreichen. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C, um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert, bis er zur Immunpräzipitation eingesetzt wurde.

3.2.4 Zellkulturtechniken

3.2.4.1 Allgemeine Zellkulturtechnik

Die Zellkultur-Arbeiten fanden unter einer Sterilbank (Holten Laminar Air Flow, Safe 2000, Fa. Kendro) statt. Alle Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bei 37°C, 5% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Steri-Cult 200 von Fa. Forma Scientific Inc.) inkubiert; als Zellkulturmedium diente CCM-34, dem 10% (v/v) fetales Kälberserum (FCS), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin zugesetzt wurden.

Die Zellen wurden im Abstand von drei bis vier Tagen passagiert. Hierzu wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit 2 ml Trypsin-Lösung kurz abgespült. Nach Inkubation mit 1 ml Trypsin für 2 - 10 min bei 37°C konnten die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Schale gelöst und vereinzelt werden. Die Zellen wurden in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert, anschließend ein Teil (in Abhängigkeit von der entsprechenden Zelllinie) dieser Suspension in eine neue Schale mit 10 ml Medium gemischt und wieder unter den oben genannten Bedingungen kultiviert.

3.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Um Zellen der gewünschten Konfluenz für Experimente zur Verfügung zu haben, wurden diese nach der Trypsinbehandlung dichter ausgesät. Wurden für bestimmte Experimente exakte Zellmengen benötigt, wurden die Zellen nach der Trypsinierung in 20 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl 0,025% (w/v) Trypanblau (in 0,15 M NaCl) gemischt und mit der Mischung eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Kleinquadrat-Fläche = 0,0625 mm²; Höhe = 0,2 mm) befüllt. Nach Auszählung der Zellen in vier Großquadraten (n

= Gesamtzahl der Zellen in 4 Großquadraten) konnte die Zellzahl mit der nachstehenden Formel berechnet werden.

$$\text{Zellen/ml} = n \times 4 \times V \times (1000/3,2)$$

(V=Verdünnungsfaktor=10)

3.2.4.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden von jeder Zelllinie mehrere Kryokulturen angelegt, die in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut wurden. Nach dem Ablösen der Zellen einer 10 cm-Schale mittels Trypsin wurden diese mit 5 ml Medium in ein 15 ml-Gewebekulturröhrchen überführt und für 2 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1,8 ml FCS und 200 µl DMSO resuspendiert. In zwei Kryoröhrchen wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension zugegeben. Die Kryoröhrchen wurden in eine nach Vorschrift des Herstellers mit Isopropanol befüllte Kryobox (Fa. Nalgene) gestellt und anschließend bei -70°C eingefroren. In dieser Box werden die Zellen schonend um 1°C pro Minute bis auf -70°C abgekühlt, bevor sie schließlich in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden können.

3.2.4.4 Transiente Transfektion von Zelllinien

3.2.4.4.1 Transfektion von DNA in Huh7 Zellen mittels Lipofektion

5×10^5 Zellen wurden am Vortag in einem 6-Well-Format ausgesät, die Zellen sollten am Tag der Transfektion etwa 60-80% konfluent sein. Zur Transfektion wurde 2 µg Plasmid mit 50 µl Optimem-Medium gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 10 µl Lipofectamine 2000 und 240 µl Optimem-Medium vorgelegt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurde die DNA zum Transfektionsmix gegeben und vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Raumtemperatur. Während dieser Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Medium versetzt mit 10% FCS aufgefüllt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.4.4.2 Elektroporation von cRNA-Transkript in Huh7 Zellen

Für jeden Transfektionsansatz wurden 4×10^6 Zellen verwendet. Nach dem Abtrypsinieren wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (400 g für 2 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (400 g für 2 min) wurde das Pellet in 400 μ l Cytomix (Zugabe von 50 μ l Glutathion und 20 μ l ATP je 1ml Cytomix) resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette (4 mm) überführt. Nach Zugabe von 1 μ g des jeweilig verwendeten synthetischen Transkriptes wurde bei 270 V und 975 μ F mit einem Genepulser (Fa. Biorad) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 1 ml Medium aus der Küvette herausgespült und 5 ml Medium zugegeben, davon wurden 2 ml auf eine neue Zellkulturschale (6-Well-Format) ausgesät.

Wurden die Zellen zuvor mittels Lipofektion transfiziert, so wurde das Protokoll modifiziert: vier Wells mit Lipofectamine 2000 transfizierter Huh7 Zellen wurden gepoolt. Die Elektroporation erfolgte wie oben beschrieben, die Zellen wurden mit 1 ml Medium aus der Küvette gespült und in ein 6-Well gegeben. Abschließend wurde 1 ml Medium zugegeben.

3.2.4.4.3 Transfektion von siRNA in Huh7 Zellen

Für die Transfektion von siRNA in Huh7 Zellen wurden 5×10^5 Zellen am Vortag in einem 6-Well-Format ausgesät. Zur Transfektion wurden 3 μ l Oligofectamine und 15 μ l Optimem-Medium vorgelegt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurden 1,5 μ g siRNA mit 175 μ l Optimem gemischt, zum vorher angesetzten Transfektionsmix gegeben und vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation. Während dieser Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Medium (versetzt mit 10% FCS) aufgefüllt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.4.5 Infektion von Zellen

3.2.4.5.1 Zur Durchführung einer Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von NS2-3/NS3 aus infizierten Zellen wurden MDBK Zellen ausgezählt und 5×10^5 Zellen je 6-Well ausgesät. Zum Zeitpunkt der Infektion waren die Zellen etwa 70 – 80% konfluent. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, nach Waschen mit PBS durch serumfreies Medium ersetzt und die

Zellen mit einer MOI von 10 infiziert. Nach einer Stunde wurde der infektiöse Überstand abgenommen und nach dreimaligem Waschen 2 ml FCS-haltiges Medium zugegeben. Zur weiteren Analyse wurden die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten mit 350 µl RIPA-Puffer lysiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.4.6 Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte nach dem Verfahren der Endpunktverdünnung. Dazu wurden MDBK-Zellen mit seriellen Verdünnungen des virushaltigen Überstandes in 96-Well-Mikrotiterplatten inkubiert und die Etablierung einer Infektion später in der Immunfluoreszenz beurteilt.

Beginnend mit einer Vorverdünnung des Überstandes in Zellkulturmedium von 1:10 oder 1:100 wurde der Verdünnungsfaktor in 12 Stufen von Well zu Well jeweils um den Faktor 3 erhöht. In jedes Well der 96-Well-Mikrotiterplatten wurde 100 µl Zellkulturmedium vorgelegt, jeweils 50 µl von einer Stufe zur nächsten übertragen und 50 µl aus der letzten Stufe verworfen. Für jede Titerbestimmung wurde diese Verdünnungsreihe im Vierfachansatz durchgeführt.

Anschließend wurden MDBK-Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm- Zellkulturschale durch Trypsinbehandlung vereinzelt und in 30 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 10 µl dieser Suspension mit 90 µl einer 0,025% (w/v) Trypanblau-Lösung vermischt und in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellzahl bestimmt (siehe Kap. 3.2.4.2). Die Suspension wurde anschließend durch entsprechende Verdünnung mit Medium auf eine Zellkonzentration von 2×10^5 Zellen je ml eingestellt.

100 µl der verdünnten Zellen (2×10^4 Zellen) wurden in jedes Well der Virus-Verdünnungsreihe zugegeben. Nach Inkubation im Brutschrank (37°C; 5% CO₂; 96% relative Luftfeuchtigkeit) für drei Tage wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz-Analyse (s.u.) auf das Vorhandensein des viralen Proteins NS3 und damit auf eine Virusinfektion untersucht. Dazu wurde als Primärantikörper der monoklonale Antikörper Code 4 in der Verdünnung 1:40 in PBS++ eingesetzt, als Sekundärantikörper diente ein Cy3-konjugierter anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:500 in PBS++.

Titerberechnungen bei Endpunktverdünnungsverfahren erfolgen stets mit Hilfe statistischer Schätzverfahren. Hier wurde die Formel nach Spaermann und Kärber

benutzt:

$$m = x_i + \frac{d}{2} - d \sum R_i$$

m = negativer dekadischer Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen, d.h. der Titer des Testvolumens ergibt sich aus 10^{-m} . Da als Testvolumen 50 μ l eingesetzt wurden, muss dieser Wert mit 20 multipliziert werden, um die Anzahl gewebekultur-infektiöser Viren je ml zu erhalten (GKID₅₀/ml).

x_i = Logarithmus der kleinsten Verdünnung, die zur Infektion aller vier Replikate einer Verdünnungsstufe führt (z.B. wäre in Stufe 6: $x_i = \lg(1/72.900) = -4,86$).

d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors (hier: $d = \lg 3 = 0,477$).

$\sum R_i$ = Summe der Reaktionsraten; in diese Summe werden alle positiven Reaktionen ab der höchsten Verdünnungsstufe, in der alle Replikate positiv sind, einbezogen und durch die Anzahl der Replikate dividiert (wenn in der nächsten Verdünnungsstufe also noch 3 von 4 Replikaten positiv reagieren ist $\sum R_i = 1 + \frac{3}{4} = 1,75$).

3.2.4.6.1 Bestimmung der spezifischen Infektiösität von synthetischen RNA Transkripten und isolierter Gesamtzell-RNA aus infizierten Zellen

Für die verwendeten synthetischen RNA Transkripte und die isolierte Gesamtzell-RNA aus infizierten Zellen wurde die spezifische Infektiösität mittels Plaque Assay ermittelt. Angegeben wird die spezifische Infektiösität in *plaque forming units* (Plaque bildende Einheiten) pro μ g RNA (PFU/ μ g RNA).

Hierzu wurden MDBK Zellen mit einer definierten Menge RNA elektroporiert, 1/40 dieser transfizierten Zellen wurden fortlaufend auf einer 6-Well-Platte 1 zu 10 verdünnt. Zu den transfizierten Zellen wurde je well $1,5 \times 10^6$ nicht transfizierte Zellen zugegeben. Nach 2 - 3 Stunden war der größte Teil der Zellen am Boden der Zellkulturplatte adhärent und das Medium konnte durch 0,6% *low melting point* – Agarose ersetzt werden. Nach etwa 15 min bei 4°C erstarrt die Agarose. Die Platten wurden für weitere 6 Tage im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Zum Fixieren wurden die Zellen mit 2 ml Paraformaldehyd (2%) beschichtet und für mindestens 45 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS-Tween gewaschen. Durch Zugabe von 0,5% (w/v) N-octyl- β -D-Glucopyranosid in PBS++ bei 4°C für 5 min wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Nach einem

weiteren Waschschrift wurde für 2 Stunden der Primärantikörper mAK Code 4 auf die Zellen gegeben, die Inkubation erfolgte im Zellkulturbrutschrank. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-Tween wurde als Sekundärantikörper der mit Peroxidase konjugierte Anti-Maus-IgG (1:1000) Antikörper für 1 Stunde bei 37°C zugegeben. Nach 3 Waschschritten mit PBS-Tween wurde das Substrat (4,75 ml Acetatpuffer 50mM, pH 5,0 + 250 µl AEC Lösung + 2,5 µl H₂O₂) auf die Zellen pipettiert und geschwenkt, bis die Färbung erfolgte. Nach einem letzten Waschen mit H₂O wurden die Platten getrocknet und die angefärbten Plaques ausgewertet. Gezählt wurde die Anzahl der Plaques aus einer Verdünnungsstufe, in welcher 10 - 100 überwiegend einzeln liegende Plaques vorlagen. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

Anzahl der Plaques x Verdünnungsstufe des ausgezählten Wells x 40/ eingesetzte µg RNA = PFU/µg

3.2.4.7 Immunfluoreszenz

Für die indirekte immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen wurden diese nach dem Waschen mit PBS++ zunächst durch Zugabe von 2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS++ und Inkubation bei 4°C für 20 min fixiert. Nach dem Waschen mit PBS++ wurden die Zellmembranen durch Zugabe von 0,5% (w/v) N-octyl-β-D-Glucopyranosid in PBS++ und Inkubation bei 4°C für 5 min permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS++ gewaschen. Der Primärantikörper wurde mit PBS++ in einem vom Antikörper abhängigen Mischungsverhältnis verdünnt; diese Lösung wurde für 1 h bei 37°C auf den Zellen belassen, bevor diese zweimal mit PBS++ gewaschen wurden. Um einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe zu ermöglichen, wurden als Sekundärantikörper Cy3-konjugierte Anti-Maus-IgG bzw. Anti-Kaninchen-IgG verwendet. Diese Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:500 in PBS++ verwendet und ebenfalls für 1 h bei 37°C auf den Zellen belassen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS++ konnten die Präparate im Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 35 der Firma Zeiss (Filtersatz für Cy3: BP 546 / FT 580 / LP 590) betrachtet werden.

3.2.4.7.1 Direkte Markierung eines monoklonalen Antikörpers

Zur direkten Markierung des monoklonalen Antikörpers Code 4 mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde das „Zenon Mouse IgG Labeling Kit“ (Fa. Invitrogen) verwendet. Hierbei binden an Fab Fragmenten gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe an das Fc Fragment des zu markierenden Antikörpers. Diese Technik ermöglicht u.a. die Doppelmarkierung von beispielsweise zwei verschiedenen Proteinen in einer Probe. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 1 µg des gereinigten Antikörpers Code 4 wurden mit 5 µl des Fab Fragmentes, das konjugiert an dem Farbstoff Alexa 647 vorlag, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur mit dem „Zenon blocking reagent“. Die auf diese Weise markierten Antikörper wurden anschließend direkt eingesetzt.

3.2.4.7.2 Färbung von Zellkernen mit DAPI

Der Fluoreszenzfarbstoff 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) wird verwendet, um DNA zu markieren und auf diese Weise Zellkerne darzustellen. Die Färbung der Zellkerne wurde im Anschluss an die Färbungen anderer Proteine in einem Präparat angefertigt. Hierfür wurden die Präparate mit einer DAPI-Lösung für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschungen mit PBS und eine Waschung mit ddH₂O.

3.2.4.7.3 Einbetten von Präparaten

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden nach der oben beschriebenen Methoden fixiert und gefärbt. Auf einem Objektträger wurde 1 Tropfen Einbettungsmedium (Moviol) gegeben. Darauf wurden die kurz angetrockneten Deckgläschen gelegt. Nach dem Trocknen konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Zur längeren Aufbewahrung wurde der Rand der Deckgläschen mit einem klaren Nagellack versiegelt.

4 Ergebnisse

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass das zelluläre J-Domänen Protein namens Jiv eine besondere Rolle für den pestiviralen Lebenszyklus besitzt. Werden Jiv überexprimierende Zellen mit nzp BVDV-1 infiziert, so stimuliert Jiv die Spaltung von NS2-3, wodurch der NS3 Spiegel und die virale RNA-Replikationsrate ansteigen. Die vermehrte Synthese viraler RNA kann durch die erhöhte Menge an freiem NS3 erklärt werden, da dies mit einer erhöhten Anzahl von Replikationskomplexen gleichzusetzen ist. In der Zellkultur kann ein Wechsel des Biotyps von nzp zu zp beobachtet werden. In Jiv Knockdown Zellen ist der mRNA-Gehalt um 80% reduziert, auf diesen reduzierten Jiv-Gehalt reagierten nzp BVDV-1 Stämme sensibel: die NS2-3 Spaltung von nzp BVDV-1 sistiert zwei Stunden eher und die RNA-Replikationsrate ist um den Faktor 10 bis 20 reduziert (Lackner et al., 2005). Diese Befunde zeigen den Einfluss des Jiv-Proteins auf die Replikation von nzp BVDV-1 und weisen auf eine essentielle Rolle des Jivs für die virale Replikation hin. Um dies genauer untersuchen zu können, wäre es erforderlich, ein Jiv-freies Zellkultursystem zur Verfügung zu haben. Da ein siRNA-vermittelter Knockdown in Zellen in der Vergangenheit nicht hinreichend war, um eine Jiv-freie Zelle zu erhalten, war es notwendig nach Alternativen zu suchen. Eine Zielstellung dieser Arbeit war die Etablierung eines solchen Zellkultursystems, um mit diesem zu untersuchen, ob das J-Domänen Protein Jiv ein essentieller Wirtsfaktor ist und welche Aminosäuren in der Jiv90-Domäne des Jiv-Proteins erforderlich sind, um die pestivirale Replikation zu unterstützen.

4.1 Replikation von BVDV in Huh7 Zellen

Wie bereits erwähnt lag die Vermutung nahe, dass Jiv ein essentieller Faktor für die Replikation von nzp BVDV-1 ist. Nach dieser Arbeitshypothese wäre ein nzp BVDV-1 Stamm nicht in der Lage in Jiv-freien Zellen zu replizieren. Gelänge es in dieser Jiv-freien Zelle die nzp BVDV-1 Replikation über eine transiente Expression des Jiv-Proteins auszulösen, so wäre dies ein Beleg für die essentielle Rolle des Jiv-Proteins. Um ein geeignetes Testsystem zu finden, wurden zunächst verschiedene Zelllinien mit jeweils mit 1 µg RNA-Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A und des Replikons DI9 elektroporiert. Das Replikon DI9 exprimiert nur die für die Replikation benötigten Proteine NS3 bis NS5B (Tautz et al., 1994; Behrens et al.,

Ergebnisse

1998b), aufgrund des Fehlens der Strukturproteine werden keine infektiösen Partikel gebildet. Durch das kürzere Genom läuft die Replikation des Replikons sehr viel effizienter als die des Gesamtklons ab. Daher wurde das Replikon DI9 als Positivkontrolle in dieser Arbeit verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Immunfluoreszenz: die viralen Proteine NS2-3/NS3 wurden mit dem monoklonalen Antikörper Code 4 markiert und anschließend mit einem anti-Maus Antikörper, der mit dem Farbstoff Cy3 konjugiert ist, inkubiert. Im Folgenden wird dieser Nachweis als NS3-Immunfluoreszenz-Assay bezeichnet. Aufgrund der hohen Replikationsrate und eines damit verbundenden Absterbens der Zellen wurden mit der Replikon-RNA elektroporierte Zellen nach 24 Stunden, mit der RNA des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A elektroporierte Zellen nach 48 Stunden ausgewertet.

Die meisten der getesteten Zelllinien zeigten ein positives Signal für die Replikation des DI9-Replikons sowie des nzp BVDV-1 Gesamtklons (siehe Tab. 3). Im Fall der humanen Hepatomzellen (Huh7) führte die Transfektion mit dem BVDV-Replikon DI9 zu einer effizienten Replikation dieser RNA. Dagegen konnte nach der Transfektion von infektiösem cRNA Transkript des nzp BVDV-1 Gesamtklons NCP7-5A keine Replikation mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay nachgewiesen werden. Dieser Replikationsblock von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen weist auf ein Fehlen von essentiellen Wirtsfaktoren hin.

Getestete Zelllinien	cRNA Transkript nzp BVDV-1 NCP7-5A	cRNA Transkript DI9 Replikon
MDBK	+	+
BHK-21	+	+
HEK 293T	+	+
Hela	+	+
HepG2	+	+
Huh7	-	+

Tab. 3: Transfektion verschiedener Zelllinien mit genomischer viraler RNA des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A und des Replikons DI9

Verschiedene Zelllinien wurden mit jeweils 1 µg genomischer viraler RNA des nzp BVDV-1 NCP7-5A und des Replikons DI9 elektroporiert. Im Fall der Replikon-RNA DI9

erfolgte die Auswertung nach 24 Stunden, für die RNA des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A erfolgte die Analyse nach 48 Stunden. Hierfür wurden die viralen Proteine NS2-3/NS3 mit einem monoklonalen Antikörper markiert und anschließend mit einem anti-Spezies Antikörper gebunden an den Farbstoff Cy3 inkubiert.

Positive Signale in der Immunfluoreszenz sind angegeben mit einem Plus- und negative mit Minuszeichen.

4.1.1 Transfektion von Huh7 Zellen mit zp BVDV-1 Gesamtklonen

Eine Möglichkeit, warum die RNA des nzp BVDV-1 Gesamtklons NCP7-5A im Gegensatz zur RNA des DI9 Replikons nicht in Huh7 replizieren konnte, könnte ein durch die viralen Strukturproteine ausgelöster Replikationsblock sein. Um einen inhibitorischen Effekt der viralen Strukturproteine auf die Replikation auszuschließen, wurden Huh7 Zellen mit der infektiösen cRNA des chimären Gesamtklons zp BVDV NCP7/Osloss (dieser Gesamtklon wurde zur Verfügung gestellt von E. Lattwein, Institut für medizinische Molekularbiologie, Universität zu Lübeck) transfiziert. Diese Chimäre besteht aus dem Genom von nzp BVDV-1 NCP7-5A, dessen NS2 durch das des zp BVDV Stamms Osloss ersetzt wurde. Das NS2 des Stamms Osloss trägt eine Ubiquitin-kodierende Sequenz (Tautz et al., 1993b), so dass es durch zelluläre Proteasen (*ubiquitin C-terminal hydrolases* = UCHs) zur Freisetzung von NS3 und damit zu der Ausbildung eines aktiven Replikationskomplexes kommt (siehe Kap. 2.2.4.1.1). Die infektiöse cRNA der Chimäre zp BVDV NCP7/Osloss wurde wie in Kap. 3.2.2.1 beschrieben hergestellt (siehe Abb. 8).

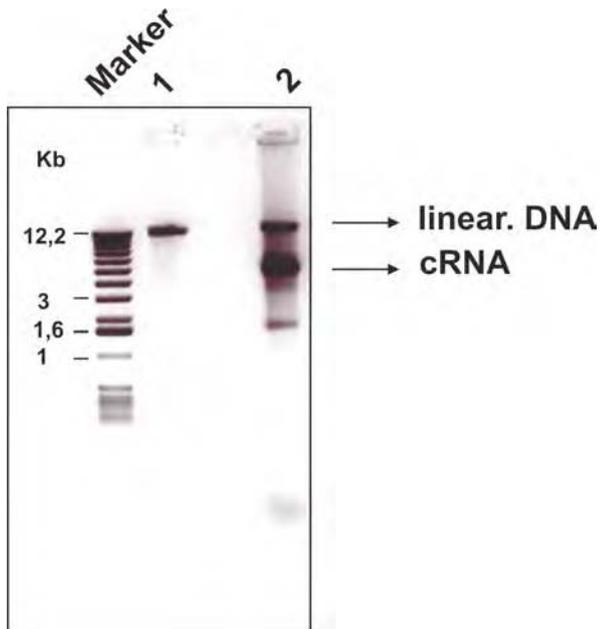


Abb. 8: Linearisierte DNA und synthetisches Transkript des Gesamtklons NCP7/Osloss

Die Positionen nach Gelelektrophorese von linearisierter DNA des Gesamtklons NCP7/Osloss (Spur 1) und der synthetisch hergestellten cRNA (Spur 2) sind rechts durch Pfeile markiert. Die Fragmentlängen des DNA-Markers sind links in Kilobasen (Kb) angegeben.

1 µg des Transkriptes wurden für die Elektroporation von Huh7 Zellen eingesetzt. 24 und 48 Stunden nach der Elektroporation wurde zur Auswertung eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe Kap. 3.2.4.7). Diese zeigte, dass in Huh7 Zellen eine selektive Replikation der zp Chimäre stattfand, während die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A nicht möglich war. Auch die cRNA des Gesamtklons zp BVDV-1 CP7-5A replizierte in Huh7 Zellen (siehe Abb. 9).

Dieses Ergebnis zeigt, dass keine Inhibition der pestiviralen Replikation durch die viralen Strukturproteine vorliegt. Es bestärkt zudem die Theorie, dass in Huh7 Zellen mindestens ein essentieller Wirtsfaktor fehlt. Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob es sich bei dem fehlenden Wirtsfaktor um Jiv handelt.

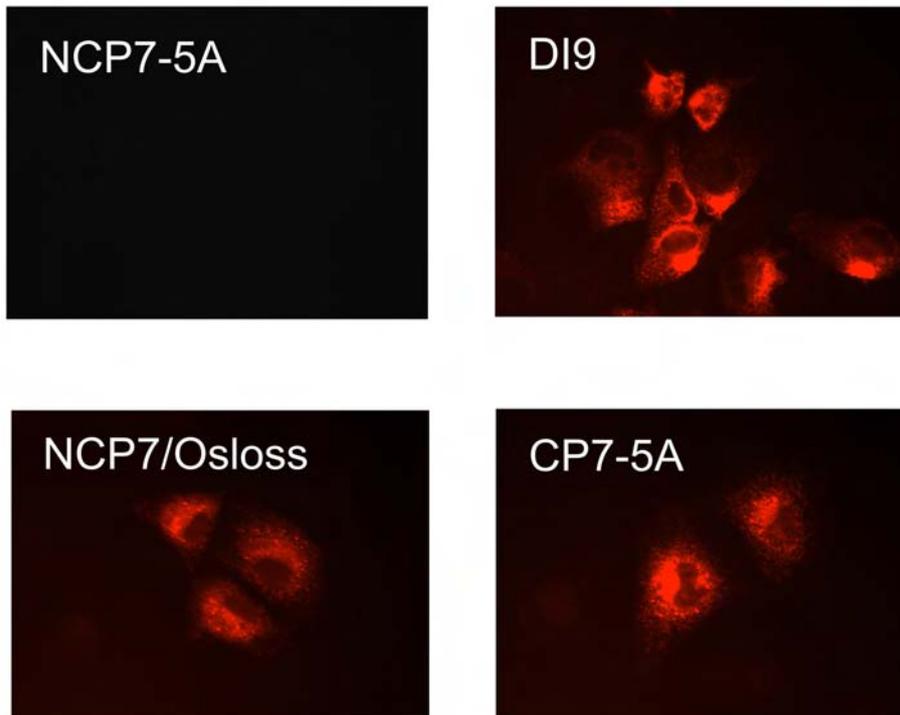


Abb. 9: Transfektion von Huh7 Zellen mit cRNA Transkripten von nzp und zp BVDV-1 Stämmen

Untersuchung von Huh7 Zellen nach der Transfektion mit genomischer viraler RNA mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Mit diesem Assay konnte keine RNA-Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A nachgewiesen werden. Ein Replikon (DI9), welches nur NS3 bis NS5B exprimierte, replizierte sehr effizient in diesen Zellen. Der Nachweis der Replikation von zp BVDV-1 CP7-5A und der zp Chimäre NCP7/Osloss zeigte, dass kein inhibitorischer Effekt der viralen Proteine auf die Replikation in Huh7 Zellen vorlag.

4.1.2 Transiente Expression von Jiv erlaubt die Replikation von nzp BVDV-1 in Huh7 Zellen

Ob den Huh7 Zellen funktionelles Jiv-Protein fehlt, wurde im folgenden Assay überprüft: Huh7 Zellen wurden zunächst mit dem Expressionsplasmid pcDNA Σ hu Jiv transfiziert. Dieses Plasmid enthält unter der Kontrolle des viralen Promotors des Zytomegalie-Virus (CMV) die kodierende Sequenz des humanen Jiv-Proteins. 24 Stunden nach der Transfektion mit diesem Plasmid wurden die transfizierten Huh7 Zellen mit dem Transkript des nzp BVDV-1 Gesamtklons NCP7-5A elektroporiert und auf Deckgläschen im 6-Well-Format ausgesät. 72 Stunden nach der Elektroporation wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Der monoklonale Antikörper gegen das virale Protein NS3 wurde nach direkter Kopplung an den Farbstoff Alexa 647 (siehe Kap. 3.2.4.7.1) neben dem gegen das Jiv-Protein gerichteten polyklonalen Serum N3

Ergebnisse

für die Immunfluoreszenz als Primärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente mit Cy3 markierter anti-Kaninchen IgG. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung dargestellt. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laserscanningmikroskop bei einer 1575-fachen Vergrößerung (Objektiv 63x, Okular 25x).

Detektiertes Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Pestivirales NS3 Protein	Monoklonaler Antikörper Code 4 + Alexa 647	-
Jiv-Protein	Polyklonales Kaninchenserum N3	anti-Kaninchen IgG Cy 3

Tab. 4: Zur Untersuchung mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie eingesetzte Antikörper

Diese Analyse zeigte, dass nur in Jiv exprimierenden Huh7 Zellen der Nachweis der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A gelang (siehe Abb. 10). Ein mit dem nzp BVDV Gesamtklon NADL-Jiv90 pac (zur Verfügung gestellt von C.M. Rice) durchgeführtes Experiment führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Dieses Resultat belegte erstmals, dass das Jiv-Protein nicht nur einen Einfluss auf virale Replikation besitzt, sondern für bestimmte nzp Viren auch essentiell ist.

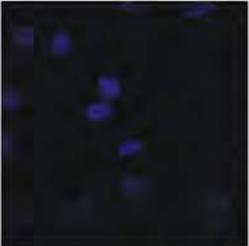
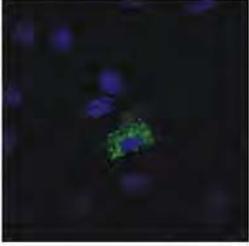
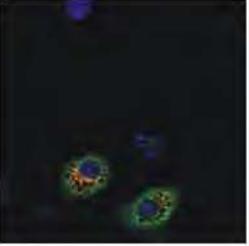
Konfokale Mikroskopie 72 h p. e.				Plasmid basierende Jiv Expression	Elektroporation des cRNA Transkriptes von nzp BVDV NCP7-5A
DAPI	anti Jiv	anti NS3	merge	-	+
					
				+	-
				+	+

Abb. 10: Einfluss des Jiv-Proteins auf die Replikation von nzp BVDV-1 in Huh7 Zellen
 Untersuchung von Huh7 Zellen 72 Stunden nach Elektroporation von genomischer viraler RNA (NCP7-5A) mittels NS3-
 Immunfluoreszenz-Assay. Nur in Zellen, die durch eine vorherige Transfektion Jiv exprimierten, fand die Replikation von
 nzp BVDV-1 NCP7-5A statt (untere Reihe).

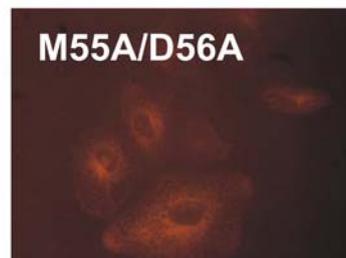
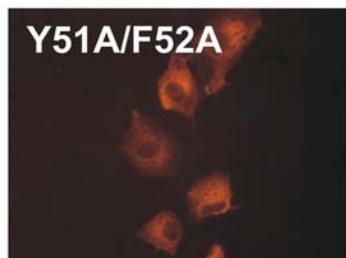
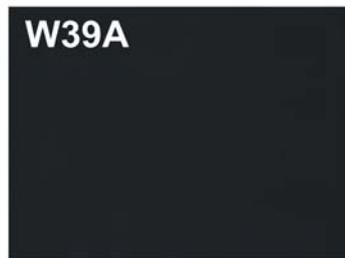
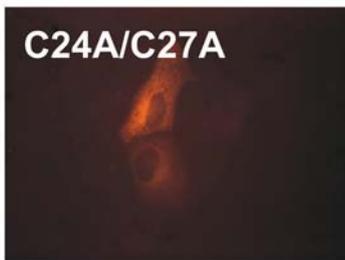
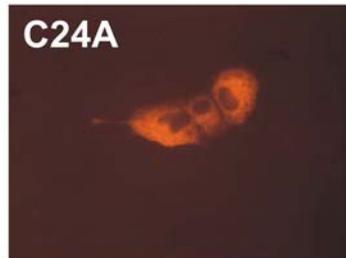
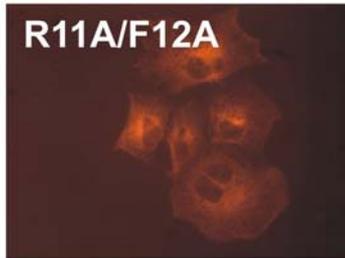
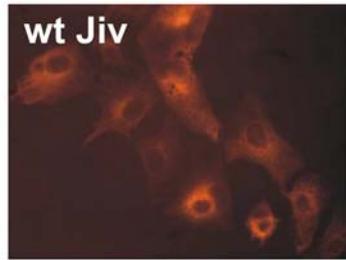
Als weiterer unabhängiger Test wurden der Überstand der transfizierten Zellen sowie die Zellen selbst auf das Vorhandensein von infektiösen Partikeln untersucht. Dafür wurde der Überstand der elektroporierten Huh7 Zellen auf MDBK Zellen (bovine Wirtszelle) gegeben und diese einmal passagiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von viralem NS2-3 und NS3 in der Immunfluoreszenz (siehe Kap. 3.2.4.7). Um den Zellextrakt auf infektiöse Viren zu untersuchen, wurden die elektroporierten Huh7 Zellen 48 Stunden später einem Frier-Tau-Zyklus unterworfen und das Lysat anschließend auf MDBK Zellen gegeben. Der Nachweis der Infektion erfolgte wie zuvor beschrieben. Nur im Überstand und Zellextrakt von mit NCP7-5A-RNA elektroporierten Huh7 Zellen, die zusätzlich das Jiv-Protein durch vorherige Transfektion exprimierten, konnten infektiöse Partikel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass Jiv für die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 essentiell ist.

4.1.3 Essentielle Bereiche des Jiv-Proteins, die für die Replikation von nzp BVDV-1 NCP 7-5A in Huh7 Zellen benötigt werden

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Alaninsubstitutionen im Bereich des Jiv90 Einfluss auf dessen Fähigkeit zur Aktivierung der viralen Autoprotease im NS2-Protein haben (siehe Kap. 2.4.1), (Lackner et al., 2004). Dadurch, dass die im hier etablierten Huh7-Elektroporations-Assay transiente Expression des Jiv-Proteins in Huh7 Zellen für die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A essentiell ist, kann nun mithilfe von Expressionsplasmiden, die für Jiv-Mutanten kodieren, untersucht werden, welche Aminosäuren des Jivs bezüglich der Unterstützung der pestiviralen Replikation wichtig sind. Dieser Assay ermöglicht somit erstmals die Kartierung der für die pestivirale Replikation essentiellen Bereiche des Jivs. Zuvor konnte nur eine Veränderung der Induktion der NS2-3 Spaltung analysiert werden. Im nächsten Schritt wurden Mutationen in der Jiv90-Domäne des Konstruktes pcDNA Σ hu Jiv generiert. Als Basis dienten die in der Arbeit von Lackner et al. 2004 verwendeten Expressionsplasmide. Die entsprechenden Bereiche dieser Alaninmutanten wurden mittels PCR mit den Primern „*XhoI* bovJiv s / *HindIII* bovJiv as“ amplifiziert. Mit diesen Primern wurden am 5'- bzw. 3'- Ende Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* eingefügt. Über TA-Klonierung wurde das PCR-Produkt in den Vektor pGEM-T (Fa. Invitrogen) ligiert und

anschließend mit den Primern M13 IR und M13 IR rev sequenziert. Nach Überprüfung des Vorhandenseins der Mutation wurde das entsprechende Fragment in das Expressionsplasmid pcDNA Σ hu Jiv, dem zuvor über die in Kap. 3.2.1.8 beschriebene Quikchange™-Methode die Schnittstellen für *XhoI* und *HindIII* eingefügt wurden, eingesetzt (Primer: „*XhoI* QCs/as; *HindIII* QCs/as“). Nach der Kontrolle der Proteinexpression im Western Blot (Daten nicht gezeigt) wurden die Jiv-Alaninmutanten in Huh7 Zellen transfiziert und diese anschließend mit nzp BVDV-1 NCP7-5A Transkript elektroporiert. 48 Stunden nach Elektroporation wurden die Zellen mittels des NS3-Immunfluoreszenz-Assay auf BVDV-Replikation untersucht. Die Überstände der elektroporierten Zellen wurde abgenommen und auf bovine Zellen (MDBK) gegeben, um diese auf infektiöses BVDV zu testen.

Die meisten der generierten Jiv-Alaninmutanten waren in der Lage die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A zu unterstützen (siehe Abb. 11). Lackner et al. zeigten, dass die Aminosäure Tryptophan an Position 39 des Jiv90 für die Spaltung von NS2-3 essentiell ist. Im hier durchgeführten Assay zeigte sich, dass die Aminosäure Tryptophan an der Position 39 auch für die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A essentiell ist. Eine Doppelmutante im NS2-Bindepeptid (Position 41 – 60 des Jiv90) an der Position 59 und 60 von Jiv90 ist ebenfalls nicht in der Lage die BVDV-Replikation zu fördern. Im Gegensatz dazu werden Einzelaustausche zu Alanin in diesem Bereich toleriert und führen zu einem positiven Ergebnis in der Immunfluoreszenz.



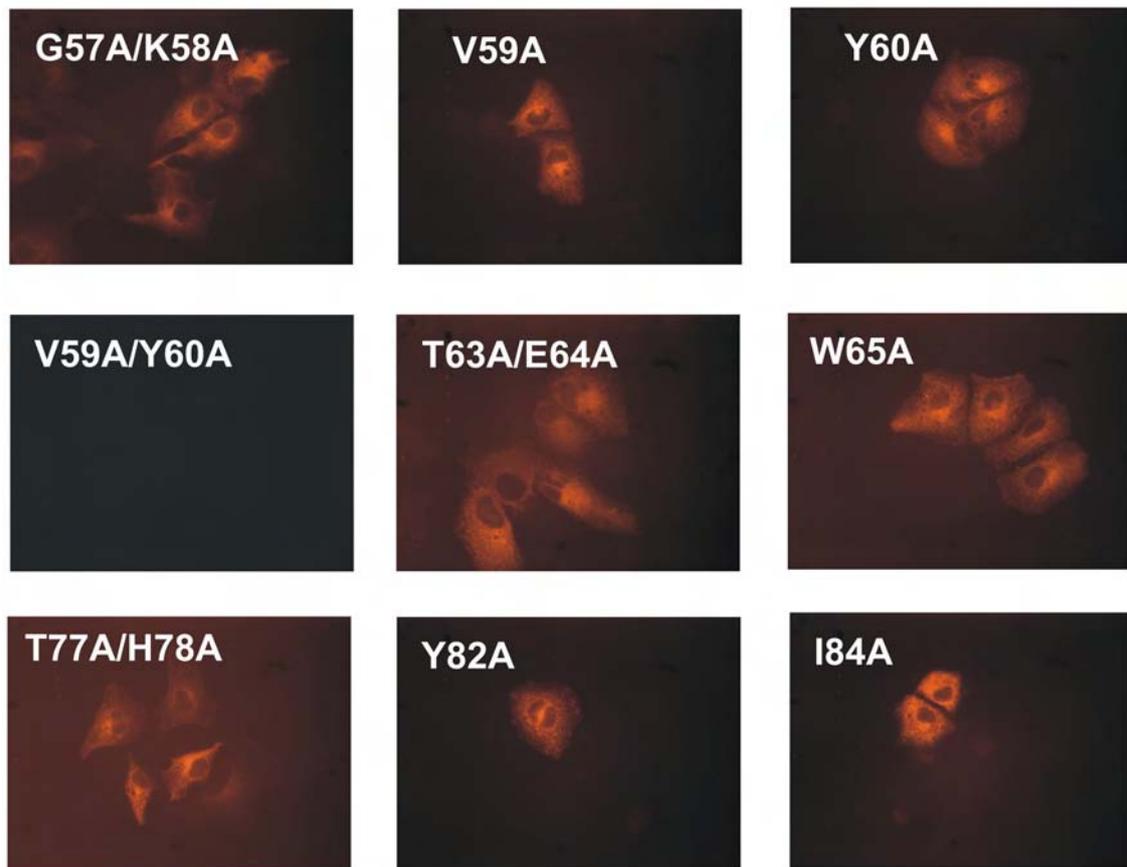


Abb. 11: Effekte von Alaninsubstitutionen in der Jiv90-Region des Jiv-Proteins auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

Nach der Transfektion von Jiv bzw. Jiv-Alaninmutanten in Huh7 Zellen, erfolgte die Elektroporation mit der RNA von nzp BVDV-1 NCP7-5A. 48 Stunden nach Elektroporation wurden die Zellen mittels des NS3-Immunfluoreszenz-Assay auf BVDV-Replikation untersucht. Ausschließlich Jiv-Mutanten mit Aminosäureaustausche zu Alanin an der Jiv90-Position 39 sowie die Doppelmutante an den Positionen 59 und 60 können die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A nicht unterstützen.

Für alle Alaninmutanten, die die Replikation unterstützten, konnten im Überstand infektiöse Partikel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In Tab. 5 sind vergleichend die Ergebnisse von Lackner et al. (Lackner et al., 2005) und dieser Arbeit gegenüber gestellt: eine reduzierte Spaltungseffizienz bedeutet nicht, dass die Fähigkeit der Replikationsunterstützung vollständig ausbleibt. So können selbst Alaninmutanten mit einer schwachen Effizienz der NS2-3 Spaltungsinduktion (z.B. I84A) noch die Replikation des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen unterstützen.

Ergebnisse

Bezeichnung der Jiv-Alaninmutanten	Effizienz der NS2-3 Spaltungsinduktion in %	Nzp BVDV-1 NCP7-5A Replikation in Huh7 Zellen
wt Jiv90	100%	+
R11A/F12A	100%	+
C24A	65%	+
C27A	n.u.	+
C24A/C27A	n.u.	+
L30A/H31A	40%	+
G36A/D37A	84%	+
W39A	0%	-
Y51A/F52A	74%	+
M55A/D56A	83%	+
G57A/K58A	83%	+
V59A	n.u.	+
Y60A	n.u.	+
V59A/V60A	52%	-
T63A/E64A	71%	+
W65A	65%	+
T77A/H78A	86%	+
Y82A	37%	+
I84A	27%	+

Tab. 5: Vergleich zwischen der Fähigkeit von Jiv-Alaninmutanten die NS2-3 Spaltung zu induzieren und der Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

In Spalte 2 ist die Effizienz der Spaltungsinduktion in Prozent angegeben (Daten aus (Lackner et al., 2005)). Als Referenzwert dient die Induktion der NS2-3 Spaltung durch das unveränderte wildtyp Jiv90 (Jiv90 wt), dieser Wert wurde auf 100% gesetzt. Alaninmutanten, die die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen unterstützten, sind mit einem Pluszeichen „+“ markiert (Spalte 3). Der Nachweis der Replikation erfolgte über den NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Mutanten, die nicht in der Lage waren die Virusreplikation zu fördern, sind mit einem Minuszeichen „-“ gekennzeichnet. Nicht untersuchte Jiv-Alaninmutanten sind mit „n.u.“ bezeichnet.

4.1.4 Einfluss von Jiv Tetra-Alaninmutanten auf die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen

In einem weiteren Projekt unserer Arbeitsgruppe wurde versucht eine dominant-negative Jiv-Mutante zu finden, die einen hemmenden Einfluss auf die pestivirale Replikation in infizierten Zellen besitzt. Hierfür wurden Tetra-Alaninmutanten des Jiv90 hergestellt. Vier Alanine wurden über die Quikchange™-Methode in den zuvor genannten Basisplasmiden aus der Arbeit von Lackner et al. hinter bestimmte Aminosäuren eingefügt. Einige dieser Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit zur weiteren Analyse ausgewählt. Zunächst erfolgte eine Untersuchung zur Effizienz der NS2-3 Spaltung der generierten Mutanten. Hierfür wurde eine Radioimmunpräzipitation mit anschließender Quantifizierung mittels Phosphorimager-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 12 und Abb. 13). Das Jiv90-Fragment wurde (wt) als GST-Fusionsprotein (bzw. die zu untersuchenden Tetra-Alaninmutanten) gemeinsam mit einem Teil des Polyproteins des nzp BVDV-1 Stamm NCP7 in BHK Zellen mittels des T7 Vaccinia Virus Systems unter metabolischer Markierung (^{35}S Methionin und Cystein) transient exprimiert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation und Bestimmung der Menge an NS2-3 und NS3. Der Quotient aus freiem NS3 und der Summe dieser beiden Signale wurden berechnet. Die Effizienz der durch GST Jiv90 wt ausgelösten NS2-3 Spaltung diente als Referenzwert (100%). Die erzeugten Tetra-Alaninmutanten sind alle in der Lage die Spaltung zu induzieren. Eine besonders schwache Induktion der NS2-3 Spaltung zeigten die Mutanten mit Insertionen stromabwärts der Positionen R22 (Arginin), F38 (Phenylalanin), T63 (Threonin) und Q64 (Glutamin). Die Insertionen hinter den Positionen R11 (Arginin) und A25 (Alanin) zeigten eine reduzierte Spaltungseffizienz. Im Gegensatz dazu ist die Fähigkeit der Mutante D15 (Aspartat) die NS2-3 Spaltung auszulösen, vergleichbar mit der des unveränderten Jiv90 (Jiv90 wt). Eine Übersicht zu den Ergebnissen ist in Abb. 13 dargestellt.

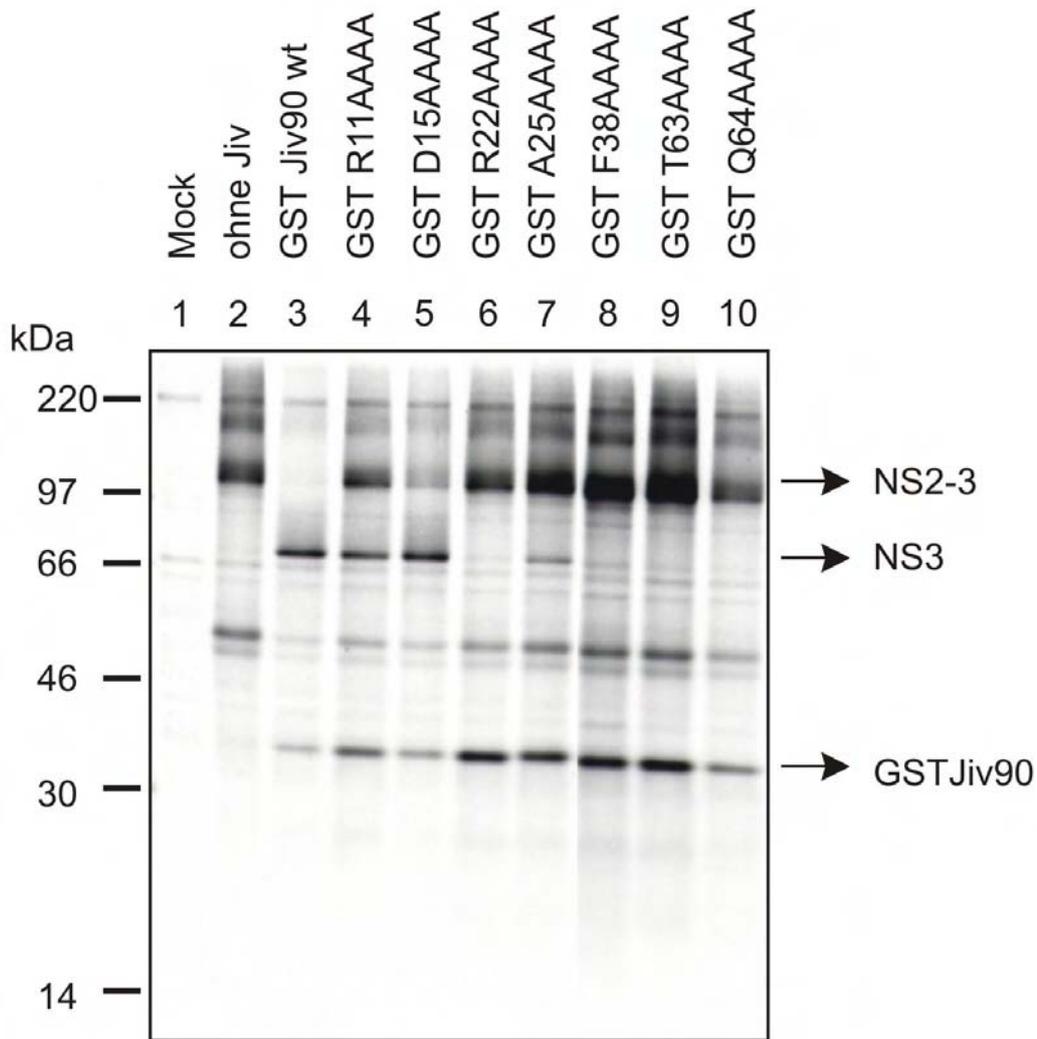


Abb. 12: NS2-3 Spaltungsinduktion von Tetra-Alaninmutanten des Jiv90 - Radioimmunpräzipitation

NS2-4A (NCP7) wurde in BHK Zellen (Spur 2) ohne Jiv, mit GST Jiv90 wt (Spur 3) oder dessen Mutanten (Spuren 4 bis 10) koexprimiert, metabolisch markiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3 immunpräzipitiert. Über den Spuren des SDS-Gels sind die jeweils verwendeten Tetra-Alaninmutanten bezeichnet. Freies NS3 ist Zeichen einer durch die Jiv-Mutanten induzierten Spaltung von NS2-3. Der Nachweis des GST Jiv90 kommt durch die Kopräzipitation mit NS2-3 bzw. NS2 zustande.

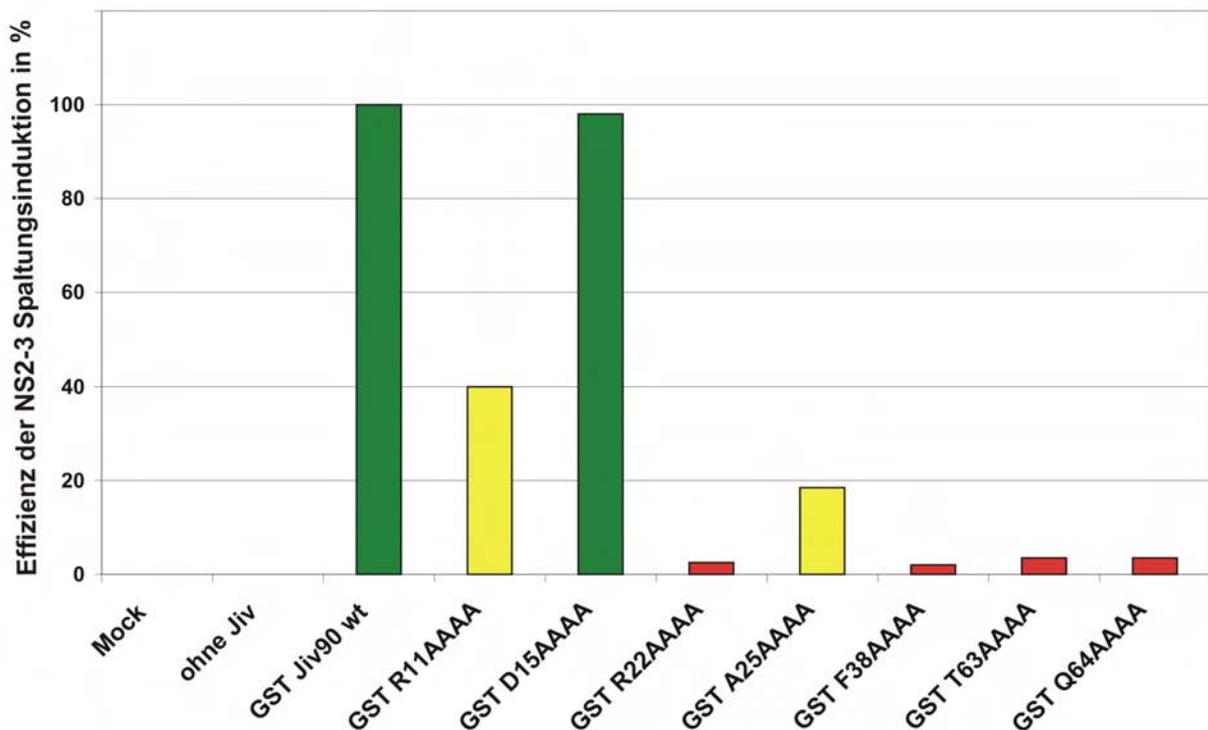


Abb. 13: Einfluss von Tetra-Alaninmutanten des Jiv90 auf die NS2-3 Spaltungseffizienz
 Durch Phosphorimager-Analyse wurde die Menge an NS2-3 und NS3 des Radioimmunpräzitations-Assays bestimmt (vgl. Abb. 12). Der Quotient aus freiem NS3 und der Summe dieser beiden Signale wurde berechnet. Die Effizienz der durch GST Jiv90 wt ausgelösten NS2-3 Spaltung diente als Referenzwert (100%). Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Eine besonders schwache Induktion der NS2-3 Spaltung zeigten die Mutanten an den Positionen R22 (Arginin), F38 (Phenylalanin), T63 (Threonin) und Q64 (Glutamin).

Um den Einfluss dieser Tetra-Alaninmutanten auf die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen zu untersuchen, wurden die entsprechenden Mutationen in das Konstrukt pcDNA Σ hu Jiv eingefügt. Die Klonierung dafür wurde wie in Kap. 4.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Funktionalität der Expressionsplasmide wurde im Western Blot kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Die Expressionsplasmide der Tetra-Alaninmutanten wurden in Huh7 Zellen transfiziert und diese anschließend mit dem RNA-Transkript des Gesamtklons NCP7-5A elektroporiert. Die Auswertung erfolgte nach 48 Stunden in der Immunfluoreszenz nach den zuvor beschriebenen Angaben. Die Tetra-Alaninmutanten mit schwacher NS2-3 Spaltungsinduktion (R22AAAA, F38AAAA, T63AAAA und Q64AAAA) konnten

Ergebnisse

die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen nicht unterstützen. Ebenso konnten im Überstand der elektroporierten Zellen keine infektiösen Partikel nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die anderen Mutanten in der Lage die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen zu unterstützen; hier gelang auch der Nachweis von infektiösen BVDV-Partikeln im Überstand.



Abb. 14: Einfluss von Jiv Tetra-Alaninmutanten auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

Nach transienter Expression der Jiv Tetra-Alaninmutanten wurden Huh7 Zellen mit dem Transkript des Gesamtklons NCP7-5A elektroporiert. Die Auswertung erfolgte nach 48 Stunden in der Immunfluoreszenz. Tetra-Alaninmutanten mit einer sehr schwachen Effizienz der NS2-3 Spaltungsinduktion konnten die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen nicht unterstützen. Im Gegensatz dazu konnte mithilfe der anderen Mutanten in Huh7 Zellen die Replikation von NCP7-5A induziert werden.

Bezeichnung der Alaninmutanten	Effizienz der NS2-3 Spaltungsinduktion in % (Jiv90 wt = 100%)	Nzp BVDV-1 NCP7-5A Replikation in Huh7 Zellen
R11AAAA	40%	+
D15AAAA	98%	+
R22AAAA	3%	-
A25AAAA	19%	+
F38AAAA	2%	-
T63AAAA	4%	-
E64AAAA	4%	-

Tab. 6: Vergleich zwischen der Fähigkeit von Jiv Tetra-Alaninmutanten die NS2-3 Spaltung zu induzieren und der Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

Die Effizienz der Spaltungsinduktion (Spalte 2) ist in Prozent angegeben. Es handelt sich um Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Als Referenzwert dient die Induktion der NS2-3 Spaltung durch das unveränderte Jiv90 (Jiv90 wt), dieser Wert wurde auf 100% gesetzt. In Spalte 3 sind diejenigen Mutanten mit einem Pluszeichen markiert, die die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen unterstützten. Der Nachweis der Replikation erfolgte über den NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Ein Minuszeichen kennzeichnet Mutanten, die nicht in der Lage waren die Virusreplikation zu fördern.

4.1.5 Einfluss von Jiv90-Verkürzung auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

Nachdem gezeigt war, welche Bereiche des Jiv90 für die Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen wichtig sind, sollte im nächsten Schritt getestet werden, ob auch das Minimalfragment Jiv90 bzw. weitere Verkürzungen von Jiv90 ausreichen, um die pestivirale Replikation in Huh7 Zellen zu fördern. Die erforderlichen Fragmente für die Expressionskonstrukte mit den N- und C-terminalen Verkürzungen wurden mithilfe einer PCR amplifiziert. Mithilfe der Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *XhoI* eingefügt. Die PCR-Produkte wurde dann über TA-Klonierung in den pGEM-T Vektor ligiert und durch Sequenzanalysen überprüft. Über einen Restriktionsenzymverdau mit *HindIII* und *XhoI* konnten die Fragmente gewonnen werden und in den ebenfalls mit *HindIII* und *XhoI* verdauten Expressionvektor pcDNA3 ligiert werden. Anschließend wurde

Ergebnisse

die Expression der Konstrukte in Huh7 Zellen mittels Immunfluoreszenz kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Die beschriebenen Expressionsplasmide wurden anschließend in Huh7 Zellen transfiziert. 24 Stunden später wurde die Elektroporation der Huh7 Zellen mit dem Transkript des nzp BVDV-1 Gesamtklons NCP7-5A durchgeführt. Die Auswertung erfolgte 48 Stunden nach der Elektroporation mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Das Minimalfragment Jiv90 unterstützte die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A. Jiv90-Varianten mit N-terminalen Verkürzungen von 5, 10 bzw. 15 Aminosäuren sowie mit C-terminalen Verkürzungen von 5 oder 10 Aminosäuren unterstützten die Replikation nicht.



Abb. 15: Einfluss von Jiv90 und Jiv90 Verkürzungen auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

48 Stunden nach Elektroporation von Huh7 Zellen mit dem RNA-Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A erfolgte die Auswertung im NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Vor der Elektroporation wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für Jiv90 bzw. Jiv90-Verkürzungen transfiziert.

Nur Jiv90 erlaubte die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A. Weitere Verkürzungen des Jiv90-Proteins wurden nicht toleriert.

Bezeichnung der Jiv Verkürzung	NS2-3 Spaltung	Nzp BVDV-1 NCP7-5A Replikation in Huh7 Zellen
Jiv90	+	+
Jiv90 Δ N5	+	-
Jiv90 Δ N10	+	-
Jiv90 Δ N15	+	-
Jiv90 Δ C5	+	-
Jiv90 Δ C10	+	-

Tab. 7: Vergleich zwischen der Fähigkeit von Jiv-Verkürzungen die NS2-3 Spaltung zu induzieren und der Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

In Spalte 2 ist die Fähigkeit der Spaltungsinduktion mit Plus- bzw. Minuszeichen angegeben (Daten von Lackner et al., 2005). Jiv-Verkürzungen, die die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen unterstützen, sind mit einem Pluszeichen gekennzeichnet (siehe Spalte 3). Das Minuszeichen markiert Jiv-Verkürzungen, die nicht in der Lage waren die Virusreplikation zu fördern. Der Nachweis der Replikation erfolgte über den NS3-Immunfluoreszenz-Assay.

4.2 Jiv-Abhängigkeit verschiedener Pestiviren

Die Tatsache, dass allein die Kotransfektion eines Jiv-Expressionsplasmids die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 erlaubt (siehe Kap. 4.1.2), weist auf einen Mangel an funktionellem Jiv-Protein in dieser Zelllinie hin. Daher eignen sich Huh7 Zellen gut, um weitere Pestiviren auf ihre Jiv-Abhängigkeit hin zu untersuchen.

4.2.1 Replikation von verschiedenen Pestiviren in Huh7 Zellen

Um verschiedene Pestiviren auf ihre Jiv-Abhängigkeit zu untersuchen, wurden von den vorliegenden Gesamtklonen nach der in Kap. 3.2.2.1 beschriebenen Methode synthetische RNA-Transkripte hergestellt. Diese cRNAs wurden in Huh7 Zellen elektroporiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und der vorher beschriebene NS3-Immunfluoreszenz-Assay angeschlossen.

Bei einem negativen Ergebnis wurden Huh7 Zellen mit dem Jiv-Expressionsplasmid pcDNA Σ hu Jiv transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte dann die RNA-Elektroporation. Die weitere Auswertung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode, um die viralen Proteine NS2-3/NS3 nachzuweisen.

4.2.1.1 Gesamtklon: nzp BVDV-1 NCP7 393

Der Gesamtklon nzp BVDV-1 NCP7 393 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. P. Becher (Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Die kodierende Region für die viralen Proteine ist nahezu identisch mit der des zuvor verwendeten Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A (Baroth et al., 2000; Becher et al., 2000). Beide Gesamtklone unterscheiden sich lediglich in ihren 3'NTRs. Aus „historischen“ Gründen stammen die terminalen Enden des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A vom BVDV Stamm Osloss. Dagegen besitzt der Gesamtklon nzp BVDV-1 NCP7 393 die authentischen Enden des wildtyp Virus nzp BVDV-1 NCP7. Nach der Elektroporation von Huh7 Zellen mit synthetisch hergestellter cRNA des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7 393 konnte nach 48 Stunden die virale Replikation durch den oben beschriebenen Assay in vereinzelt Zellen nachgewiesen werden.

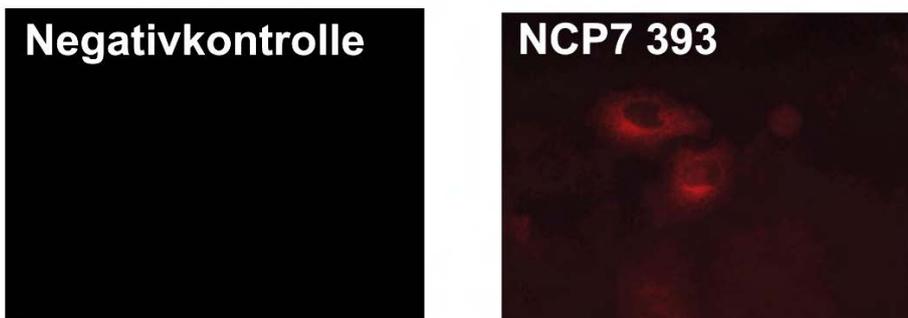


Abb. 16: Elektroporation von cRNA-Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7 393 in Huh7 Zellen

Nach der Elektroporation von Huh7 Zellen mit einem synthetisch hergestellten cRNA-Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7 393 konnte in vereinzelt Zellen nach 48 Stunden mittels des NS3-Immunfluoreszenz-Assays virale Replikation detektiert werden.

4.2.1.2 Gesamtklon: CSFV Alfort Tübingen

Der Gesamtklon CSFV Alfort Tübingen wurde freundlicherweise von Prof. T. Rümenapf (Institut für Virologie, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt (Meyers et al., 1996). Um CSFV Alfort Tübingen zu untersuchen, wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren vorgegangen. Für die Auswertung wurde eine Färbung mit den Antikörpern Code 4 sowie mit a18, der gegen das E2-Protein von CSFV gerichtet ist, durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde ein an Cy3 gekoppelter anti-Maus Antikörper verwendet. Für beide Färbungen konnte nach der Elektroporation genomischer viraler RNA des Gesamtklons CSFV Alfort Tübingen ein Signal in Huh7 detektiert werden (Daten für Färbung mit a18 nicht gezeigt). CSFV Alfort Tübingen ist in der Lage in Huh7 Zellen effizient zu replizieren und scheint bezüglich seiner Replikation nicht abhängig von der zusätzlichen Expression von Jiv zu sein (siehe Abb. 17).



Abb. 17: Elektroporation von cRNA-Transkript des Gesamtklons CSFV Alfort Tübingen in Huh7 Zellen

Untersuchung von Huh7 Zellen 48 Stunden nach Elektroporation von genomischer viraler RNA (CSFV Alfort Tübingen) mittels Immunfluoreszenz. CSFV Alfort Tübingen ist in der Lage in Huh7 Zellen ohne vorherige Transfektion eines Jiv-Expressionsplasmides zu replizieren und scheint damit unabhängig von Jiv zu sein.

4.2.1.3 Gesamtklon: CSFV Riems

Der Gesamtklon wurde freundlicherweise von Dr. Nicolas Ruggli (Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Mittelhäusern, Schweiz) zur Verfügung gestellt (Mayer et al., 2003). Bei nzp CSFV Riems handelt es sich um ein attenuiertes Virus, das als Impfstamm Verwendung findet.

Ergebnisse

Das CSFV Riems Transkript wurde in Huh7 Zellen elektroporiert. 48 Stunden später erfolgte die Auswertung mittels des beschriebenen Immunfluoreszenztests unter Verwendung der monoklonalen Antikörper Code 4 und a18.

CSFV Riems replizierte nicht in Huh7 Zellen. Erfolgte eine vorherige Transfektion mit dem Jiv-Expressionsplasmid pcDNA Σ hu Jiv, so erlaubte die transiente Expression von Jiv die Replikation von CSFV Riems. Somit ist das attenuierte Virus CSFV Riems abhängig vom Jiv-Protein (siehe Abb. 18).

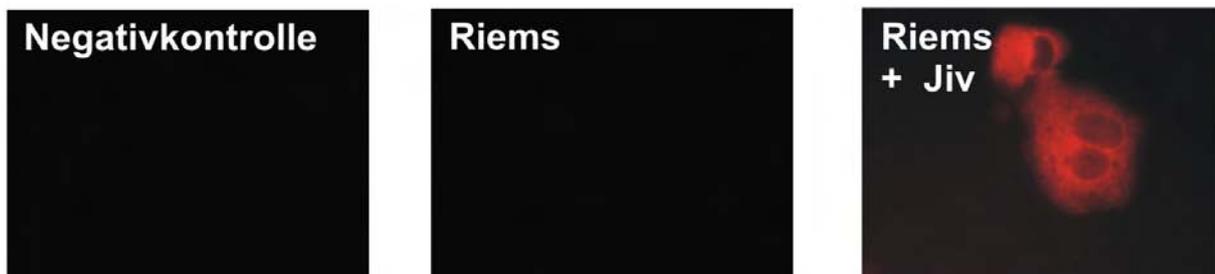


Abb. 18: Elektroporation von genomischer viraler RNA des Gesamtklons nzp CSFV Riems in Huh7 Zellen

Untersuchung von Huh7 Zellen 48 Stunden nach Elektroporation von genomischer viraler RNA (CSFV Riems) mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Dieser Stamm replizierte nur in Huh7 Zellen, wenn die Zellen vorher mit einem Jiv-Expressionsplasmid transfiziert wurden. Somit ist dieser Virusstamm in seiner RNA-Replikation abhängig vom Jiv-Protein.

4.2.1.4 Gesamtklon: CSFV Alfort/Riems Chimäre

Der Gesamtklon wurde freundlicherweise von Dr. J. D. Tratschin (Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, Mittelhäusern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Diese Chimäre umfasst das NS2 und flankierende Sequenzen des attenuierten Stamms Riems im Kontext des Gesamtklons Alfort 187.1 (Ruggli et al., 1996). Mit dieser Chimäre sollte überprüft werden, ob die NS2-Protease von CSFV Riems für die Replikationsunfähigkeit in Huh7 Zellen verantwortlich ist. Die Immunfluoreszenz wurde unter Verwendung der Primärantikörper Code 4 und a18 durchgeführt (s.o.). Die CFSV Chimäre Alfort/Riems replizierte in Huh7 Zellen ohne vorherige Transfektion eines Jiv-Expressionsplasmids (siehe Abb. 19).

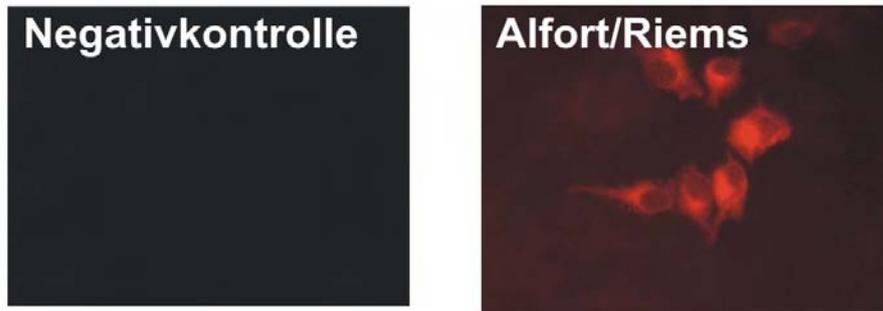


Abb. 19: Elektroporation von genomischer viraler RNA der Gesamtklon-Chimäre CSFV Alfort/Riems in Huh7 Zellen

Untersuchung von Huh7 Zellen 48 Stunden nach Elektroporation genomischer viraler RNA (CSFV Alfort/Riems) mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Die Chimäre kann in Huh7 Zellen replizieren.

4.2.2 Untersuchung der Replikation weiterer Pestivirusstämme in Huh7 Zellen

Da keine weiteren cDNA-Gesamtklone zur Verfügung standen, wurde das Protokoll modifiziert, um weitere Pestivirus Stämme auf ihre Jiv-Abhängigkeit im Huh7-Zellkultur-Assay zu untersuchen. Es wurden zunächst MDBK Zellen (10 cm Schale) mit einem entsprechenden Virusstamm unter Verwendung einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1 infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurde die gesamte RNA aus diesen Zellen isoliert und die Infektiosität der präparierten RNA über einen Plaque Assay bestimmt (siehe Tab. 8). In der Regel wurden 1×10^5 PFU (*plaque forming units*) der Gesamtzell-RNA anschließend in Huh7 Zellen elektroporiert. Die Auswertung erfolgte durch die bereits beschriebene Immunfluoreszenz.

Gesamtzell-RNA aus infizierten MDBK Zellen	Spezifische Infektiösität (PFU / μg RNA)
nzp BVDV-1 519	$4,8 \times 10^4$
nzp BVDV-1 721	$3,2 \times 10^4$
nzp BVDV-1 871	$2,8 \times 10^4$
nzp BVDV-1 878	8×10^4
nzp BVDV-1 1115	$6,4 \times 10^3$
nzp BVDV-1 4584	$8,8 \times 10^3$
nzp BVDV-1 V171	$1,2 \times 10^4$
nzp BVDV-1 019	$1,3 \times 10^4$
BVDV-2 890	9×10^4
BVDV-2 Hi916	4×10^4
BVDV-2 CS8644	$1,6 \times 10^4$
nzp BDV X818	$6,2 \times 10^4$
CSFV Brescia	$3,2 \times 10^4$

Tab. 8: Spezifische Infektiösität der aus infizierten MDBK Zellen isolierten Gesamtzell-RNA

4.2.2.1 Bovines Virusdiarrhoe Virus-1

Untersucht wurden acht verschiedene nzp BVDV-1 Stämme, die freundlicherweise von Prof. Dr. P. Becher zur Verfügung gestellt wurden (Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover). Die Stämme 519, 871, 878 sind aus PI-Tieren ohne klinische Symptome isoliert worden; die Stämme 721, 1115, 4584 und V171 stammen von PI-Tieren, die an Mucosal Disease erkrankt sind. Der Stamm 019 wurde von einem Rind isoliert, das experimentell mit dem nzp BVDV-1 Stamm New York infiziert wurde. Klinisch zeigte dieses Tier nur leichte Störungen im Allgemeinbefinden, daneben konnte eine ungewöhnlich lange Virämie festgestellt werden.

Nach Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA der infizierten MDBK Zellen wurde die virale Replikation mit dem NS3-Immunfluoreszenz-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass die nzp BVDV-1 Stämme 519, 721, 878 und 4584 nicht in Huh7 Zellen replizierten. Im Gegensatz dazu war die Replikation der nzp Stämme 871, 1115, V171 und 019 in Huh7 Zellen nachweisbar (siehe Abb. 20).



Ergebnisse

Abb. 20: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus nzp BVDV-1 infizierten MDBK Zellen

Huh7 Zellen wurden mit Gesamtzell-RNA aus nzp BVDV-1 infizierten MDBK Zellen elektroporiert. Nach 48 Stunden erfolgte die Auswertung mit dem beschriebenen NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Die Stämme 519, 721, 878 und 4584 replizierten nicht in Huh7 Zellen. Dagegen konnte nach der Transfektion der nzp Stämme 871, 1115, V171 und 019 pestivirale Replikation nachgewiesen werden.

Nach der Transfektion der RNAs der nzp BVDV-1 Stämme 519, 721, 878 und 4584 in transient Jiv exprimierende Huh7 Zellen konnte in allen Fällen 48 Stunden nach der Elektroporation die virale Replikation in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (siehe Abb. 21).

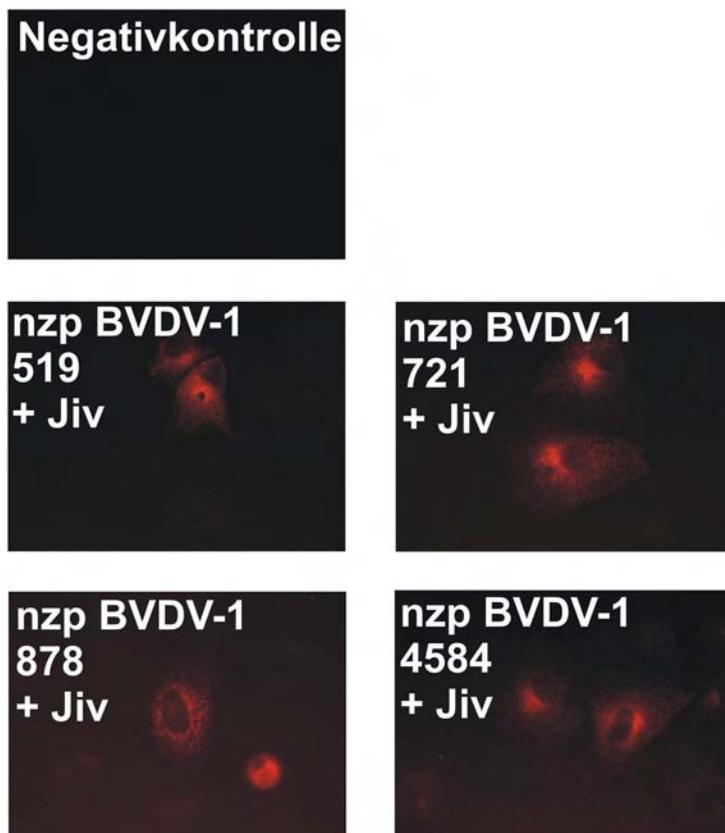


Abb. 21: Elektroporation von transient Jiv exprimierenden Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus nzp BVDV-1 infizierten MDBK Zellen

Transient Jiv exprimierende Huh7 Zellen wurden mit Gesamtzell-RNA, die aus mit nzp BVDV-1 519, 721, 878 und 4584 infizierten MDBK Zellen isoliert wurde, elektroporiert. Die Auswertung erfolgte nach 48 h mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay.

Die Stämme 519, 721, 878 und 4584 konnten in transient Jiv exprimierenden Huh7 Zellen replizieren.

4.2.2.2 Bovines Virusdiarrhoe Virus-2

Untersucht wurden die BVDV-2 Stämme 890, Hi916 und CS8644. Der Stamm 890 wurde von einem Rind aus den USA isoliert, das an den Folgen des Hämorrhagischen Syndroms verstarb (Ridpath und Bolin, 1995). Dieser Stamm stand im Institut zur Verfügung. Der hochvirulente Stamm Hi916 und der avirulente Stamm CS8644 wurden von Dr. M. Beer (Friedrich Löffler Institut, Riems) zur Verfügung gestellt. Alle drei Stämme replizierten in Huh7 Zellen.

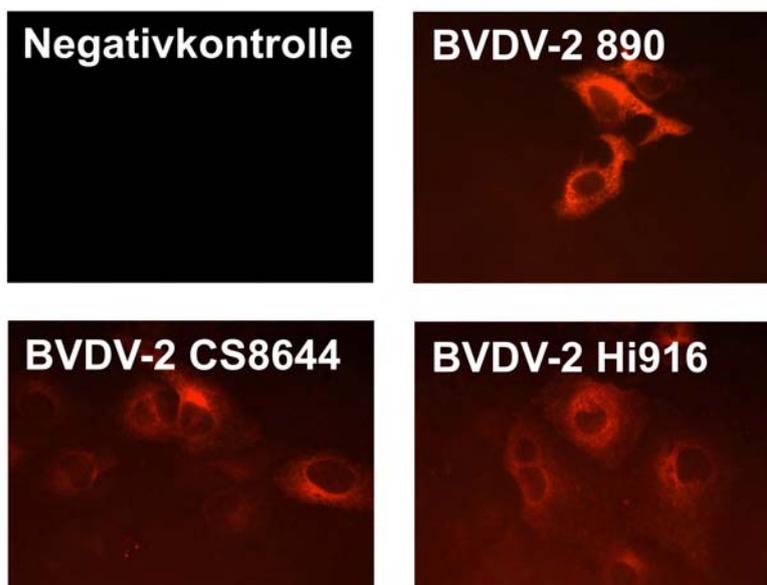


Abb. 22: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus BVDV-2 infizierten MDBK Zellen

Untersuchung von Huh7 Zellen 48 Stunden nach Elektroporation mit Gesamtzell-RNA, die aus BVDV-2 infizierten MDBK Zellen isoliert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay.

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten BVDV-2 Stämme replizierten in Huh7 Zellen.

4.2.2.3 Border Disease Virus

Das australische Pestivirusisolat nzp BDV X818 wurde aus der Lunge eines erkrankten Schafes isoliert (Becher et al., 1994). Dieser Stamm ist nur nach vorangegangener Transfektion des Jiv-Expressionsplasmides in der Lage in den Huh7 Zellen zu replizieren. Dieser Stamm ist bezüglich seiner RNA Replikation auf Jiv angewiesen.

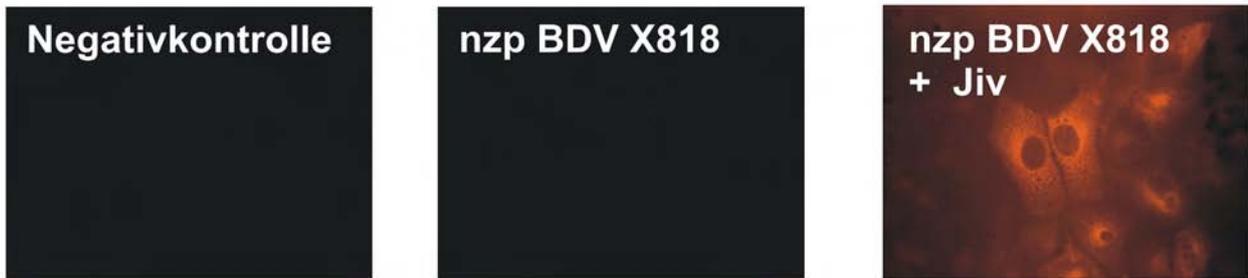


Abb. 23: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA, aus BDV X818 infizierten MDBK Zellen

Untersuchung von Huh7 Zellen 48 Stunden nach Elektroporation mit Gesamtzell-RNA, die aus mit BDV X818 infizierten MDBK Zellen isoliert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels NS3-Immunfluoreszenztest. Dieser Stamm replizierte nur nach vorangegangener Transfektion mit einem Jiv-Expressionsplasmid in Huh7 Zellen.

4.2.2.4 Classical Swine Fever Virus

Bei der Untersuchung des virulenten CSFV Stamms Brescia (freundlicherweise von Dr. M. König, Institut für Virologie, JLU Gießen zur Verfügung gestellt) konnte nach der Transfektion von Huh7 Zellen die Replikation detektiert werden. Somit scheint der CFSV Stamm Brescia unabhängig vom intrazellulären Jiv-Gehalt zu sein.

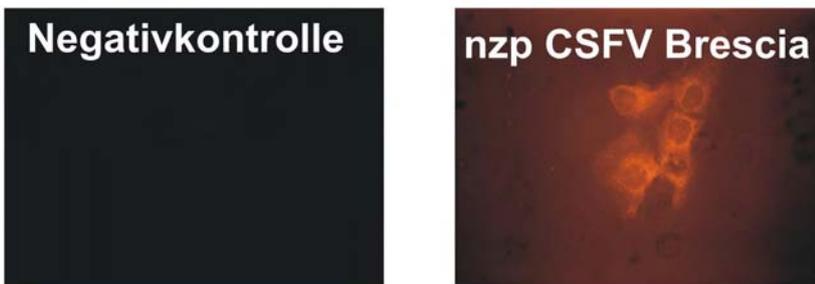


Abb. 24: Elektroporation von Huh7 Zellen mit Gesamtzell-RNA aus CSFV Brescia infizierten MDBK Zellen

Untersuchung von Huh7 Zellen 48 Stunden nach Elektroporation mit Gesamtzell-RNA, die aus mit CSFV Brescia infizierten MDBK Zellen isoliert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels NS3-Immunfluoreszenz-Assay. Dieser Stamm replizierte in Huh7 Zellen und ist daher unabhängig von Jiv.

4.2.3 NS2-3 Prozessierung verschiedener Pestiviren in bovinen Wirtszellen (MDBK)

Nach den Ergebnissen aus den Huh7-Assays konnte für bestimmte Stämme eine Jiv-Abhängigkeit aufgezeigt werden. Im nächsten Schritt wurde die NS2-3 Prozessierung der untersuchten Stämme in bovinen Wirtszellen (MDBK) analysiert. Die Vermutung lag nahe, dass eine Korrelation zwischen der Fähigkeit der Pestivirus-Stämme, zu späten Zeitpunkten nach Infektion NS3 zu generieren, und ihrer Abhängigkeit vom intrazellulären Jiv-Gehalt besteht. Gemäß dieser Arbeitshypothese sollten Pestiviren, die zu späten Infektionszeitpunkten kein NS3 generieren in Huh7 Zellen eine Jiv-abhängige Replikation zeigen.

Zur Untersuchung der NS2-3 Prozessierung der verschiedenen Stämme wurden 5×10^5 MDBK Zellen am Vortag in einem 6-Well ausgesät. Die Infektion am Folgetag wurde mit serumfreiem Medium bei einer MOI von 10 durchgeführt. Nach einer Stunde wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden jeweils zu den Zeitpunkten 6, 8, 10, 12 und 24 Stunden p. i. mit 350 μ l denaturierendem RIPA-Puffer geerntet. Wie in Kap. 3.2.4.5.1 beschrieben wurde eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalem Antikörper Code 4 (gerichtet gegen NS3) durchgeführt. Die so erhaltenen Proben wurden dann mittels SDS-Page und Western Blot weiter bearbeitet. Für die Auswertung im Western Blot wurde als Primärantikörper der Antikörper Code 4 verwendet, als Sekundärantikörper diente ein Anti-Maus Antikörper gekoppelt an Peroxidase.

4.2.3.1 Nzp BVDV-1

Verschiedene nzp BVDV-1 Stämme wurden auf NS2-3 Prozessierung untersucht: die nzp BVDV-1 Stämme 519, 721, 878 und 4584 replizierten in Huh7 Zellen Jiv-abhängig, wohingegen die Stämme 871, 1115, V171 und 019 eine Jiv-unabhängige Replikation in Huh7 Zellen zeigten.

Die Stämme 519, 721, 871, 878, 1115, V171 und 4584 zeigten eine für nzp BVDV-1 typische Spaltungskinetik. Zu frühen Zeitpunkten war freies NS3 nachweisbar, im Laufe der Infektion nahm der Anteil an ungespaltenem NS2-3 zu. Die vermehrte Freisetzung von NS3 zu späten Zeitpunkt war nicht darstellbar. Im Gegensatz zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten nzp BVDV-1 Isolaten zeigte nur der Stamm nzp BVDV-1 019 eine vermehrte NS3 Generierung zu späten Zeitpunkten.

Ergebnisse

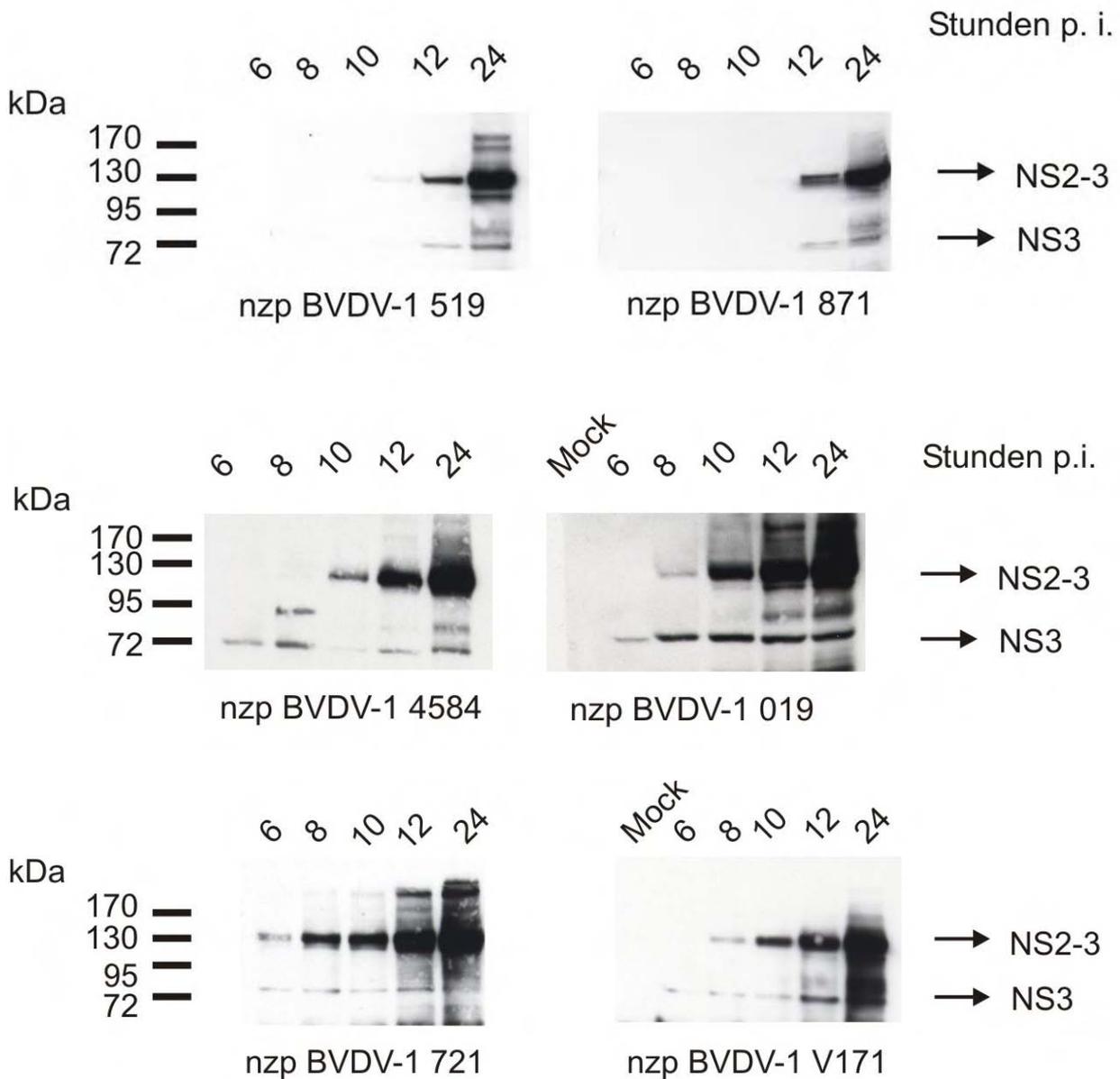


Abb. 25: NS2-3 Spaltung verschiedener nZp BVDV-1 Stämme in MDBK Zellen

5×10^5 MDBK Zellen wurden am Vortag in einem 6-Well ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Infektion bei einer MOI von 10. 6, 8, 10, 12 und 24 Stunden p. i. wurden die Zellen mit 350 μ l RIPA Puffer geerntet. Unter der Verwendung des monoklonalen Antikörpers Code 4 wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die weitere Auswertung erfolgte mithilfe von SDS-Page und Western Blot (Verwendete Antikörper: Primärantikörper anti-NS3 Code 4, Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugierter anti-Maus Antikörper).

4.2.3.1.1 NS2-3 Prozessierung von aus dem Überstand elektroporierter Huh7 Zellen isolierten Viren

Die nzp BVDV-1 Stämme 871, 1115 und V171 zeigten im Western Blot eine für nzp Viren charakteristische NS2-3 Spaltungskinetik. Dennoch konnten diese Viren in Huh7 Zellen replizieren. Eine Erklärung könnte sein, dass es sich bei diesen Viren um Mischungen handelte, bei denen nur eine Subpopulation, die bei der Western Blot Auswertung nicht zum Tragen kam, in Huh7 Zellen replizieren konnte. Um dies zu überprüfen, wurden die Überstände der elektroporierten Huh7 Zellen geerntet und für vier weitere Passagen auf MDBK Zellen kultiviert. Die infizierten MDBK Zellen wurden 1:4 auf eine 10 cm Schale gegeben und nach 24 Stunden wieder umgesetzt. Nach jeder Passage wurde ein Teil der infizierten MDBK Zellen in SDS-Lysepuffer geerntet und anschließend mittels SDS-Page und Western Blot untersucht. In keiner der untersuchten Passagen war eine vermehrte Generierung von NS3 nachweisbar (siehe Abb. 26).

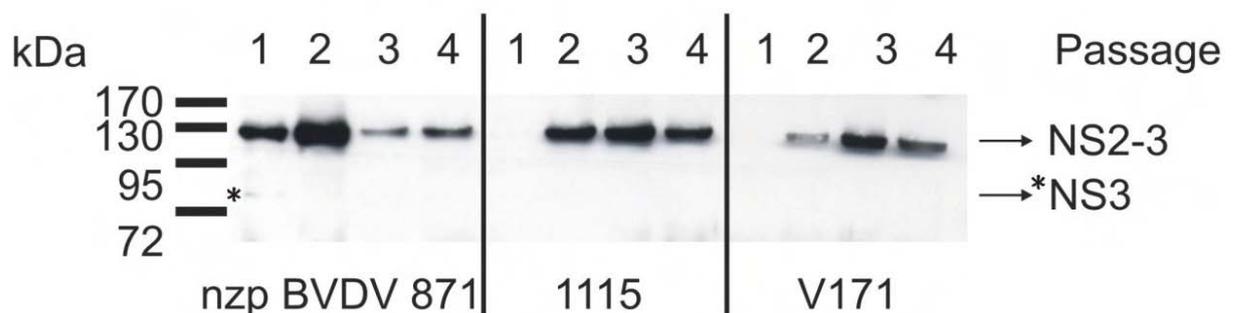


Abb. 26: NS2-3 Prozessierung von selektionierten und passagierten nzp BVDV-1 Stämmen

Huh7 Zellen wurden mit Gesamtzell-RNA infizierter MDBK Zellen (nzp BVDV-1 871, 1115, V171) elektroporiert. Der Überstand dieser elektroporierten Huh7 Zellen wurde geerntet und für vier weitere Passagen auf MDBK Zellen kultiviert. Nach der Infektion wurden die MDBK Zellen jeweils 1:4 auf eine 10 cm Schale gegeben und nach 24 Stunden wieder umgesetzt. Nach jeder Passage wurde ein Teil der infizierten MDBK Zellen in SDS-Lysepuffer geerntet und anschließend mittels SDS-Page und Western Blot untersucht. Eine vermehrte Freisetzung von NS3 konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden (nachweisbares NS3 mit * markiert).

4.2.3.2 Zp BVDV-1

Das NS2-3 Spaltungsmuster des zp BVDV-1 Stamms CP7 wurde untersucht. Dieser Stamm zeigte keine stark regulierte Spaltung. Nach 6 Stunden war eine sehr schwache NS3-Bande darstellbar, die 8 Stunden p. i. deutlich darzustellen war. Ungespaltenes NS2-3 war nach 8 Stunden nur wenig vorhanden. 10 Stunden nach der Infektion war der Anteil an freiem NS3 deutlich höher als der an ungespaltenem NS2-3.

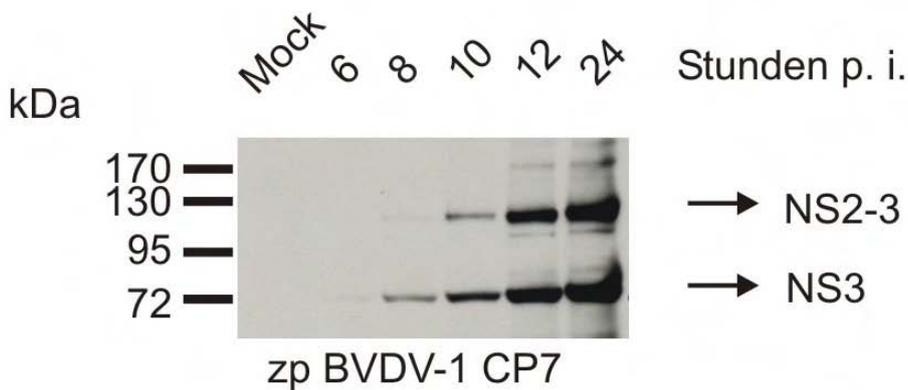


Abb. 27: NS2-3 Spaltung des zp BVDV-1 Stamms CP7 zu verschiedenen Zeitpunkten

4.2.3.3 BVDV-2

Die NS2-3 Spaltungskinetik der BVDV-2 Stämme Hi916, CS8644 und 890 wurde untersucht. Die BVDV-2 Stämme zeigten ein heterogenes Bild. Die NS2-3 Spaltung des Stamms Hi916 scheint reguliert zu sein, da zu späten Zeitpunkten wesentlich mehr ungespaltenes NS2-3 als freies NS3 nachzuweisen war. Der Stamm CS8644 verhielt sich relativ ähnlich, jedoch scheint die Menge an generiertem NS3 im Vergleich zum Hi916 wesentlich höher zu sein. BVDV-2 890 zeigte 24 Stunden nach der Infektion ungespaltenes NS2-3 und freies NS3 in gleicher Menge.

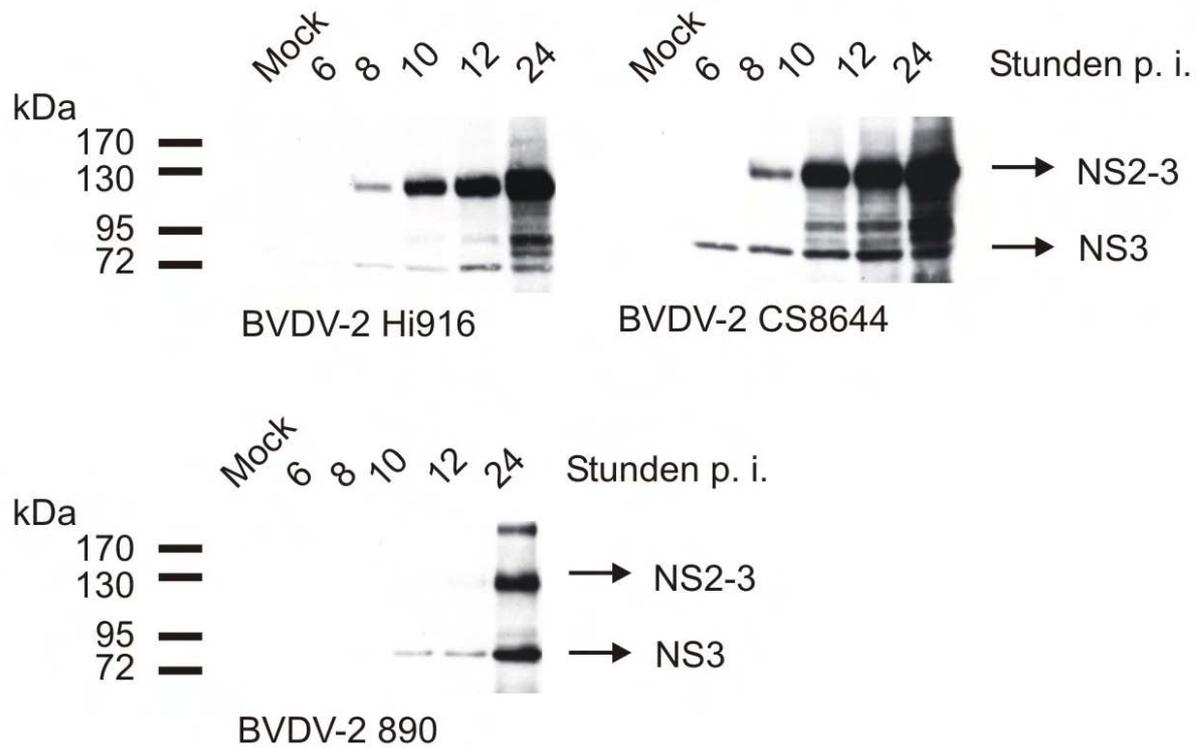


Abb. 28: NS2-3 Spaltung von verschiedenen nzp BVDV-2 Stämmen zu verschiedenen Zeitpunkten

4.2.3.4 BDV

Der nzp BDV Stamm X818 zeigte eine ähnliche Spaltungskinetik wie klassische nzp BVDV-1 Stämme. Bereits 12 Stunden nach der Infektion überwiegte der Anteil an ungespaltenem NS2-3.

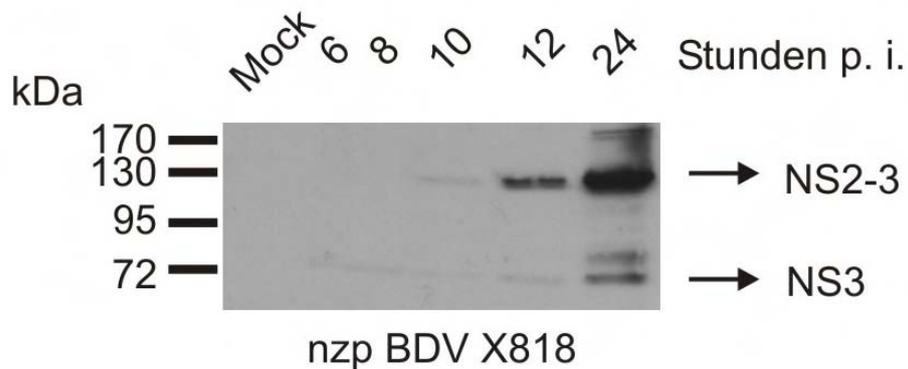


Abb. 29: NS2-3 Spaltung in mit nzp BDV X818 infizierten MDBK Zellen

Ergebnisse

4.2.3.5 CSFV

Da die MDBK Zellen als bovine Zelllinie um den Faktor 100 schlechter zu infizieren sind mit CSFV-Stämmen als mit BVDV-Stämmen, wurde das Protokoll modifiziert, um eine bessere Vergleichbarkeit der Experimente zu erreichen. Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen wurde hier synthetisch generiertes Transkript des CSFV Gesamtklons Alfort Tübingen in MDBK Zellen elektroporiert. Mit dieser Methode wird nur ein Teil der Zellen mit der viralen RNA transfiziert. Diese im Vergleich zur Infektion weniger effiziente Methode führt zu einer geringeren Menge an viralem Protein. Dennoch kann man die Aussage treffen, dass sich nach 24 Stunden etwa gleiche Mengen an NS2-3 und NS3 detektieren lassen.

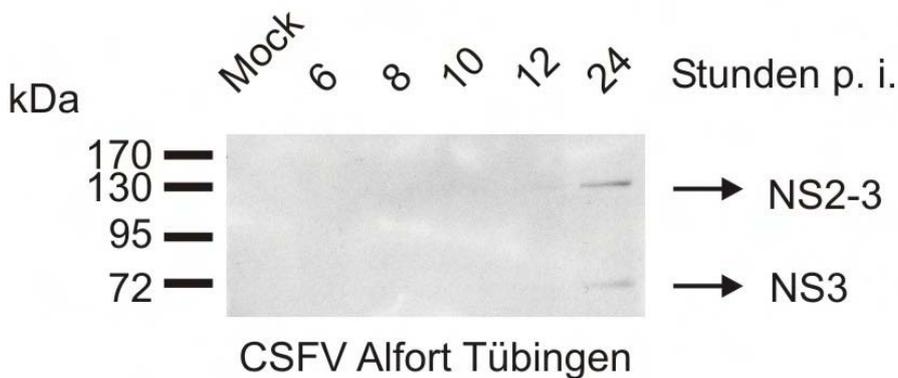


Abb. 30: NS2-3 Spaltung des nzp CSFV Alfort Tübingen zu verschiedenen Zeitpunkten (elektroporierte MDBK Zellen)

4.3 Untersuchung zu den molekularen Grundlagen des geringen Jiv-Spiegels in Huh7 Zellen

Aufgrund der geringen Abundanz des Jiv-Proteins in eukaryontischen Zellen ist der direkte Jiv-Nachweis, selbst in für nzp BVDV-1 permissiven bovinen Zellen, bisher nicht gelungen. Daher kann eine Aussage über das Vorkommen des Proteins nur gemacht werden, indem ein Experiment durchgeführt wird, dessen Ergebnis indirekt auf das Vorhandensein von Jiv zurückzuführen ist. In Huh7 Zellen ist die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A nicht möglich. Allerdings ermöglicht die Kotransfektion eines Jiv-Expressionsplasmides in Huh7 Zellen die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A. Dieses Resultat weist darauf hin, dass in den Huh7 Zellen kein oder nicht genügend funktionelles Jiv-Protein zur Verfügung steht. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob und in welchen Mengen Jiv-mRNA Transkripte nachweisbar sind. Daneben sollte die Sequenz dieser mRNA untersucht werden.

4.3.1 Untersuchungen auf mRNA-Ebene

4.3.1.1 Quantifizierung des Jiv-mRNA-Gehaltes von Huh7 Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob der Mangel des Jiv-Proteins in Huh7 Zellen durch eine geringe Menge Jiv-kodierender mRNA zu erklären ist. Hierfür wurde Gesamtzell-RNA von Huh7 Zellen aus drei verschiedenen Passagen isoliert und mittels absoluter quantitativer Real-Time RT-PCR gemessen. Zum Vergleich wurde die Gesamtzell-RNA von MDBK Zellen, die ausreichend Jiv-Protein zur Stimulation der BVDV-Replikation besitzen, ebenfalls aus drei verschiedenen Passagen, mitgeführt. Das Experiment wurde im Doppelansatz durchgeführt. Die Mittelwerte sind in Abb. 31 dargestellt. Der Jiv-mRNA-Gehalt in Huh7 Zellen war zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zu den bovinen Wirtszellen (MDBK) um 40 - 50% reduziert. Da in PT Zellen, in welchen der Jiv-mRNA-Gehalt um etwa 80% reduziert wurde, eine effiziente BVDV-Replikation nachgewiesen worden ist (Lackner et al., 2005), ist der hier festgestellte Jiv-Spiegel der Huh7 Zellen keine hinreichende Erklärung für den Replikationsdefekt von nzp BVDV-1 NCP7-5A. Daher wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt.

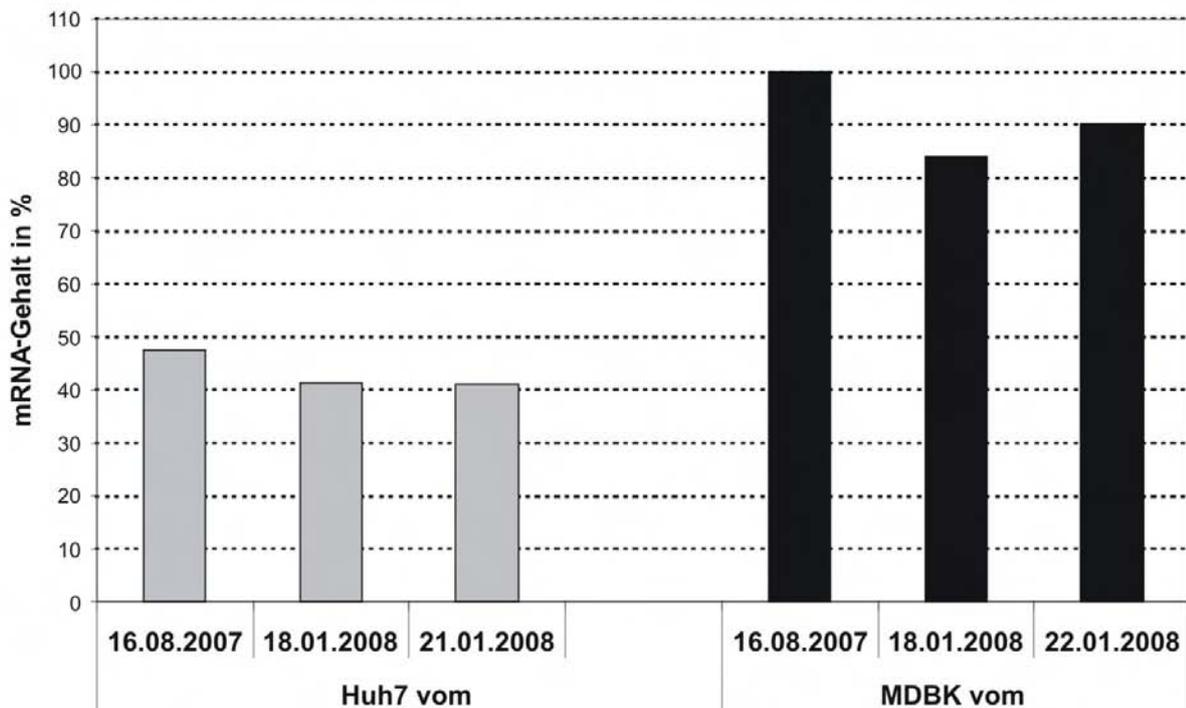


Abb. 31: Jiv-mRNA-Gehalt in Huh7 und MDBK Zellen

Die Gesamtzell-RNA von Huh7 und MDBK Zellen aus drei verschiedenen Passagen wurde isoliert und mittels quantitativer Real-Time RT-PCR gemessen. Das Diagramm zeigt je Balken die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der Jiv-mRNA-Gehalt in Prozent. Der mRNA-Gehalt in bovinen Wirtszellen (MDBK) zum ersten Untersuchungszeitpunkt wurde als Referenzwert verwendet (100%).

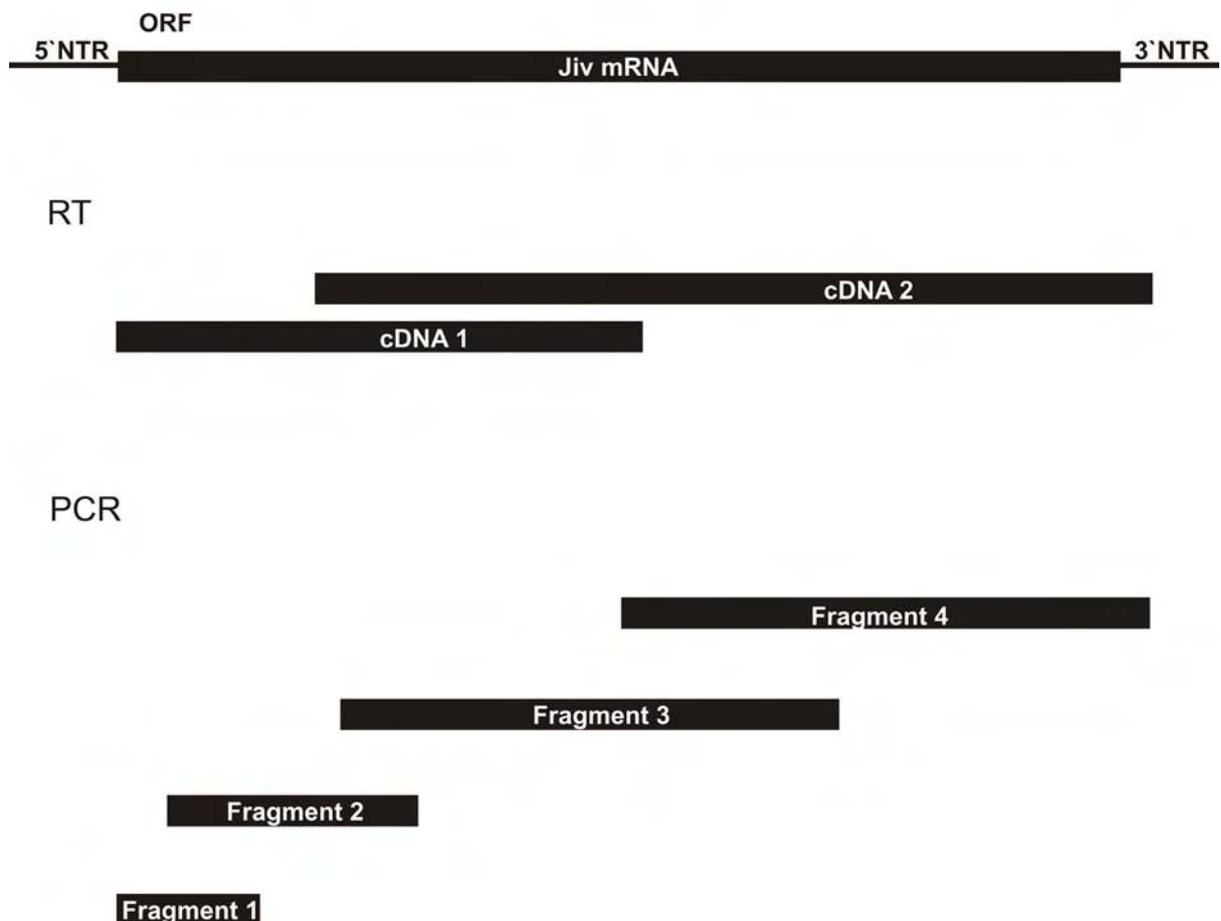
4.3.1.2 Sequenzanalyse der Jiv-mRNA in Huh7 Zellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Sequenz der Jiv-mRNA in den Huh7 Zellen Hinweise auf die Translation eines fehlerhaften Proteins oder sogar das Ausbleiben der Translation liefert. Nach einer Gesamtzell-RNA Isolierung aus Huh7 Zellen erfolgte die Anreicherung der mRNA wie in Kap. 3.2.2.3 beschrieben.

Daran schloss sich eine RT-PCR an. Da der kodierende Bereich der Jiv-mRNA in etwa 2100 Basen umfasst, wurde mit zwei verschiedenen reversen Primern gearbeitet, um zwei cDNA Produkte zu erhalten, die den gesamten kodierenden Bereich erfassen sollten. Diese cDNA Produkte dienten als Template für die anschließende PCR. Dabei wurden vier verschiedene Fragmente amplifiziert, die sich im Bereich der Primerbindungsstellen überlappen (siehe Abb. 32). Auf diese Weise konnte der gesamte kodierende Bereich der mRNA Sequenz ermittelt werden. Für die PCR wurde *Pfu*-Polymerase verwendet; diese ist zwar im Vergleich zur *Taq*

Polymerase weniger prozessiv, jedoch ist deren Fehlerrate deutlich geringer. Nach Modifikation der PCR-Produkte mit dem A-Addition Kit (Fa. Qiagen, nach Angaben des Herstellers durchgeführt) konnten die Fragmente mittels TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T ligiert werden. Je PCR-Fragment wurden zwei bis drei unabhängige Klone untersucht. Eine Übersicht über die verwendeten Primer und die generierten Klone gibt Tab. 9.

mRNA Isolierung aus Huh7 Zellen



Klonierung der PCR-Produkte in den pGEM-T Vektor und anschließende Sequenzanalyse

Abb. 32: Sequenzanalyse der Jiv-mRNA in Huh7 Zellen – Klonierungsstrategie

Bezeichnung	Untersuchte Klone	Primer der RT	Kodierender Primer der PCR	Reverser Primer der PCR
Fragment 1:	#16, #17, # 18	1100 rev	5'-NTR	210 rev
pGEM-T hu Jiv				
5'-NTR – 210 rev				
Fragment 2:	#2, #7,	1100 rev	huci 180	700 rev
pGEM-T hu Jiv				
180 – 700 rev				
Fragment 3:	#1, #5	2258 rev	huci 600	1600 rev
pGEM-T hu Jiv				
600 – 1600 rev				
Fragment 4:	#1, #4, #7	2258 rev	huci 1050	2258 rev
pGEM-T hu Jiv				
1050- 2258 rev				

Tab. 9: Übersicht über die zur Klonierung der Jiv-mRNA aus Huh7 Zellen verwendeten Primer sowie über die untersuchten Klone

Für die Sequenzanalyse wurde zunächst die Nukleotidsequenz der erzeugten Klone (Fragmente 1 – 4) mit den für das bovine Jiv-Protein (Genbank-Zugangsnummer: AY 027882) und den für das humane Protein DnaJ C14 (Genbank-Zugangsnummer: EF560741) veröffentlichten Daten verglichen. Hierfür wurde das GCG-Programm-Paket (*Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA*) im HUSAR-System (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*) verwendet. Mit dem Programm „gap“ wurde auf Proteinebene eine Aminosäuren-Identität von 100% zwischen der DnaJ C14-Sequenz und der aus Huh7 ermittelten Sequenz gefunden. Die Jiv-Sequenz aus Huh7 Zellen und die des bovinen Jiv waren zu 92,3% identisch (siehe Abb. 33). Ein Vergleich mit der DRIP78-Sequenz der Ratte (Bermak et al., 2001) wies eine Aminosäuren-Identität von 89,2% auf.

Ergebnisse

Huh7	1	MAQKHPPGERGLYGAHHSGGASLRTLGPVSDPEI PSFSGLRDSAGTAPNGT	50
Jiv	1	MAQKHPPGEGGLCGAHHSGGASLRTLGPVSDPDILSFSGLRDSAGSAPNGT	50
Huh7	51	RCLTEHSGPKHTQHNPNAHWLDP SHGPPGGPGPPRDAEDPDQSETSSSEE	100
Jiv	51	RCLTEHSSPKYTQPPNPAHWSDP SHGPPRGPGPLAEEDPDQSEASS.EE	99
Huh7	101	SGVDQELS KENETGNQK DGN.SFLSIP SACNCQGT PGIPEGPYSEGGNGS	150
Jiv	100	SGVDQELSRENETGYQDDGNS SFLSIPSTCNCQGT PGIPEGPYSEGRDSS	149
Huh7	151	SSNFCHHCTSPALGED.ELEEEYDDEESLKFPSDFSRVSSGKKPPSRRQR	199
Jiv	150	SSNFCHHCTSPALGEDEELEGEYDEEEPLKFPSDVS RVPSEKKPAPRRQR	199
Huh7	200	HRFPTKEDTREGGRRDPRS PGRHRLGRKRSQADKRKGLGLWGAEELCQLG	249
Jiv	200	HRVPAKEDTREGGRRDPRS PGRHRLGRKRSQADKRRGLGLWGAEELCQLG	249
Huh7	250	QAGFWWLI ELLVLVGEYVETCGHLIYACRQLKSSDLLDFRVWVGWGTGRL	299
Jiv	250	QAGFWWLI ELLVLVGEYVETCGHLIYACRQLKGSDDLRLRVWVGWAGRL	299
Huh7	300	GGWAQVMFQFLSQGFYCGVGLFTRFLKLLGALLLALALFLGFLQLGWRF	349
Jiv	300	RGWAQVMFQFLSQGFYCGAGLFTFRFLRLV GALLLALALLGCLQLGWRF	349
Huh7	350	LVGLGDR LGWRDKATWLF SWLDS PALQRCLTLLRDSRPWQRLVRIVQGW	399
Jiv	350	LVGLSDR LGWRDKATWIF SWLASPTWQRCLILLRESRPWQQLVRIVQGW	399
Huh7	400	LLELPWVKQNI NRQGNAPV ASGRYCP EEEVARLLTMAGVPEDELNPFHVL	449
Jiv	400	LLELPWVKQRTNRQANAPVAGGRYCP EEEVARLLTMAGVPEDELNPFHVL	449
Huh7	450	GVEATASDVELKKAYRQLAVMVHPDKNHH PRAEEAFKVLRAAWDIVSNAE	499
Jiv	450	GVEATASDVELKKAYRQLAVMVHPDKNHH PRAEEAFKVLRAAWDIVSNPE	499
Huh7	500	KRKEYEMKRMAENELSRVNEFLSKLQDDLKEAMNTMMC SRCQGKHRRFE	549
Jiv	500	RRKEYEMKRMAENELSRVNEFLSKLQ...EAMNTMMC SRCQGKHRRFE	545
Huh7	550	MDREPKSARYCAECNRLHPAEEGDFWAESSMLGLKITYFALMDGKVDIT	599
Jiv	546	MDREPKSARYCAECNRLHPAEEGDFWAESSMLGLKITYFALMDGKVDIT	595
Huh7	600	EWAGCQRVGISPDTHRVPHYHISFGSRI PGTRGRQRATPDAPPADLQDFLS	649
Jiv	596	EWAGCQRVGISPDTHRVPHYHISFGSRMPGTSGRQRATPDAPPADLQDFLS	645
Huh7	650	RIFQVPPGQMPNGNFFAAPQPAPGAAAASKPNSTV PKGEAKPKRRKKVRRPFQR	703
Jiv	646	RIFQVPPGQMSNGNFFAAPQPGPGATAASKPNSTV PKGEAKPKRRKKVRRPFQR	699

Abb. 33: Proteinsequenzvergleich von Jiv (*Bos taurus*, Genbank-Zugangsnummer: AY 027882) und dem Jiv-Protein aus Huh7 Zellen. Die Jiv90-Region ist in roten Lettern dargestellt.

4.3.1.2.1 Funktionalität der Jiv-mRNA-Sequenz von Huh7-Zellen

Ob die Sequenz der Jiv-mRNA von Huh7 zur der Translation eines funktionalen Proteins führt, wurde in dem folgenden Experiment untersucht: Huh7 Zellen sollten das NS2-3 Fragment des Stamms NCP7 gemeinsam mit dem Jiv-Protein, welches durch die in Huh7 Zellen gefundene Sequenz kodiert wurde, koexprimieren. Wird NS2-3 in den Jiv exprimierenden Huh7 Zellen prozessiert, so kann man daraus schliessen, dass die gefundene Jiv-mRNA-Sequenz der Huh7 Zellen die Translation eines funktionalen Proteins erlaubt.

Da die kodierende Sequenz des Expressionsplasmid pcDNA Σ hu Jiv mit der in Huh7 gefundenen Sequenz für die Jiv-mRNA übereinstimmt, wurde dieses Konstrukt gemeinsam mit dem Plasmid pN/E2-NS4A, welches für die Proteine E2-p7-NS2-NS3-NS4A (E2-NS4A) des Polyproteins des nzp BVDV-1 Stamms NCP7 kodiert, in die mit MVA-T7-Vaccinavirus infizierten Huh7 Zellen kotransfiziert. Durch die Infektion der Huh7 Zellen mit MVA-T7-Vaccinavirus wird eine T7-DNA-abhängige RNA-Polymerase exprimiert, die unter der Kontrolle der vorhandenen T7-Polymerase Promotoren der Expressionsplasmide die entsprechenden mRNAs transkribieren. Diese mRNAs werden dann translatiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Huh7 Zellen lysiert. Die Zelllysate wurden über SDS-Page aufgetrennt und einer Western Blot Analyse zum Nachweis von NS2-3 und NS3 unterzogen.

24 Stunden nach der alleinigen Transfektion des Plasmid pN/E2-NS4A in Huh7 Zellen war nur ungespaltenes NS2-3 nachweisbar. Die Kotransfektion von pN/E2-NS4A und pcDNA Σ hu Jiv in Huh7 Zellen führte zur Induktion der NS2-3 Spaltung, so dass nach 24 Stunden vor allem freies NS3 nachweisbar war (siehe Abb. 34). Somit kodiert die gefundene Jiv-mRNA-Sequenz von Huh7 Zellen für funktionales Jiv.

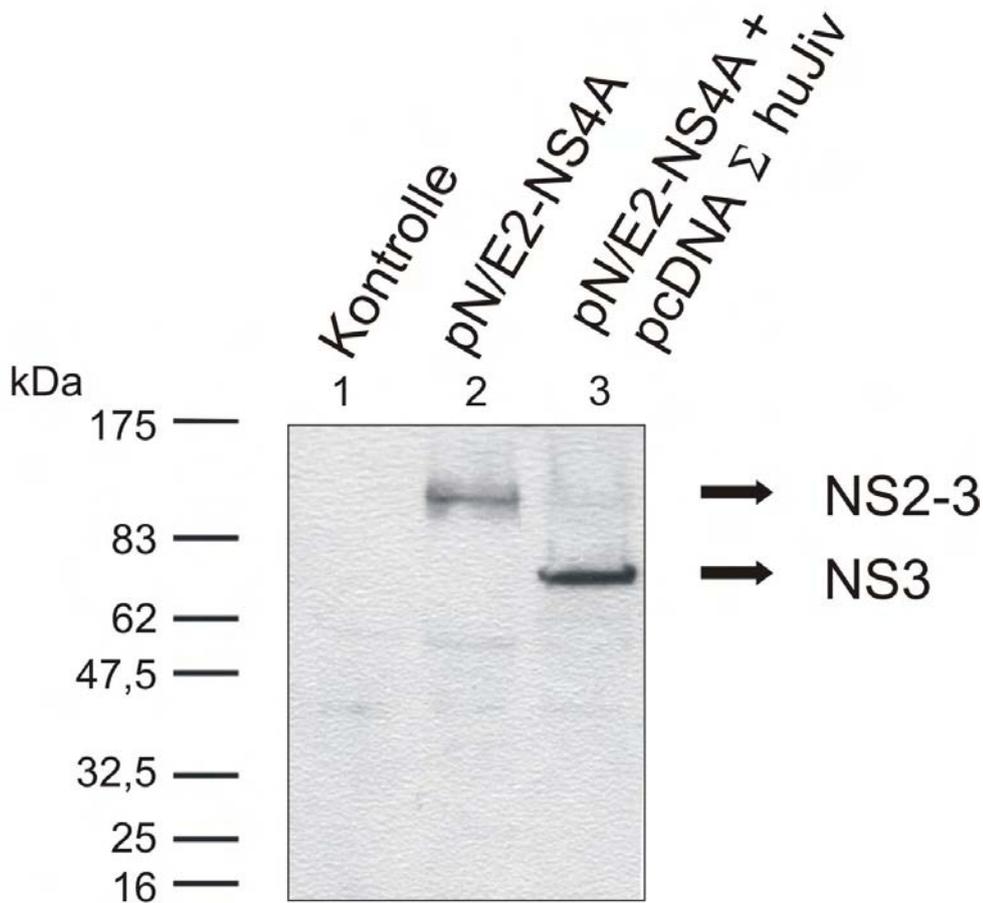


Abb. 34: Die Jiv-mRNA von Huh7 Zellen kodiert für funktionales Jiv

Huh7 Zellen wurden mit MVA-Vaccinavirus infiziert und anschließend transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Zelllysate wurden über SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot zum Nachweis von NS2-3 und NS3 analysiert.

Als Kontrolle (Spur 1) ist das Lysat von infizierten und nichttransfizierten Huh7 Zellen aufgetragen. Nach der alleinigen Transfektion des Plasmids pN/E2-NS4A wird nur ungespaltenes NS2-3 exprimiert (Spur 2). Die Koexpression von NS2-3 (pN/E2-NS4A) und von Jiv, kodiert von der mRNA aus Huh7 Zellen (pcDNA Σ hu Jiv), führt zur Spaltung von NS2-3 (Spur 3).

4.3.2 Untersuchungen auf Protein-Ebene

4.3.2.1 Degradation des Jiv-Proteins in Huh7 Zellen

Eine weitere Erklärung für den Mangel des Jiv-Proteins in Huh7 Zellen wäre, dass genügend Jiv-mRNA vorhanden ist und diese auch effizient translatiert wird, jedoch das translatierte Protein eine geringere Halbwertszeit besitzt und in den Huh7 Zellen verglichen mit den bovinen Zellen schneller proteolytisch abgebaut wird. Um diese Möglichkeit abzuklären, wurden die Zellen mit einem Proteasom-Inhibitor behandelt. Das Proteasom besitzt verschiedene Proteasefunktionen, die durch die verschiedenen Klassen von Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden können. Eine vollständige Hemmung aller Proteasomfunktionen ist in der Regel nicht erforderlich, um eine Reduktion der Proteindegradation zu erreichen (Kisselev und Goldberg, 2001). Die Hemmung der „Chymotrypsin-ähnlichen“ Aktivität durch Proteasom-Inhibitoren der Gruppe der Peptidaldehyde wie z.B. MG132 oder auch MG115 führt zu einer erheblichen Verminderung des zellulären Proteinabbaus. Daneben konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren auch zur vermehrten Synthese molekularer Chaperone führt (Bush et al., 1997; Kawazoe et al., 1998).

Huh7 Zellen wurden mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Anschließend erfolgte eine wie in Kap. 3.2.4.5.1 beschriebene Immunpräzipitation unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Jiv. Die Behandlung mit MG132 führte zu keiner nachweisbaren Erhöhung der Menge von Jiv in Huh7 Zellen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde untersucht, ob der durch MG132 mögliche induzierte Anstieg des Jiv-Proteins die Replikation des nzp BVDV-1 Gesamtklons NCP7-5A in Huh7 Zellen erlaubt.

Huh7 Zellen wurden mit 10 μ M MG132 für 4 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die Elektroporation mit Transkript des Replikons DI9 als Positivkontrolle und mit dem Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A. Huh7 Zellen ohne Proteasom-Inhibitor Behandlung wurden mitgeführt. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und ein NS3-Immunfluoreszenz-Assay durchgeführt. Die Behandlung von Huh7 Zellen mit MG132 führte nicht zur Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A. Diese Untersuchungen legen nahe, dass der geringe Jiv-Spiegel in Huh7 Zellen nicht in erster Linie auf einen stark gesteigerten Abbau dieses Proteins in diesem Zelltyp zurückzuführen ist.

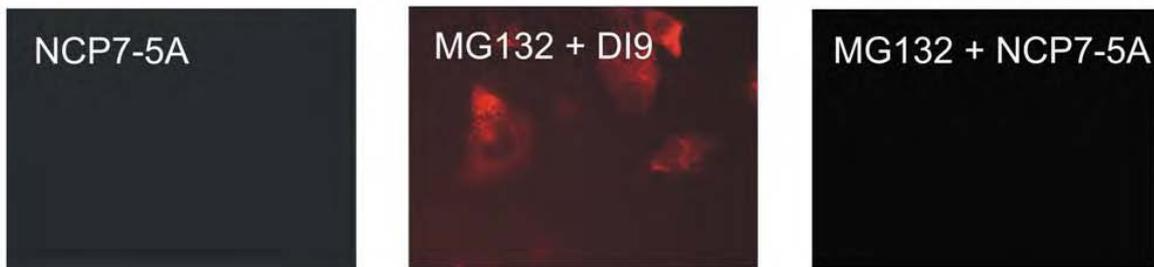


Abb. 35: Elektroporation von genomischer viraler RNA des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A und des Replikons DI9 in mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelten Huh7 Zellen

Huh7 Zellen wurden mit 10 μ M MG132 für 4 Stunden kultiviert. Eine Elektroporation mit RNA Transkript des Replikons DI9 als Positivkontrolle und mit dem RNA Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A schloss sich an. Huh7 Zellen ohne Proteasom-Inhibitor Behandlung wurden mitgeführt. Die Auswertung erfolgte nach 24 bzw. 48 Stunden mittels Immunfluoreszenz. Hier gezeigt ist die Auswertung nach 24 Stunden. Durch die Behandlung mit MG132 konnte die Menge von funktionalem Jiv-Protein nicht erhöht werden. In der Immunfluoreszenz war die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A trotz Proteasom-Inhibitor-Behandlung zu keinem Zeitpunkt darstellbar.

4.3.2.2 Ausdifferenzierung von Huh7 Zellen

Die Huh7 Zelllinie ist eine nicht gut ausdifferenzierte humane Hepatomzelllinie. Daher wäre es denkbar, dass spezifische Faktoren fehlen, die beispielsweise für die Translation des Jiv-Proteins erforderlich sein könnten. Für das Hepatitis C Virus wurde gezeigt, dass die Ausdifferenzierung von Huh7 Zellen die Empfänglichkeit für die Infektion erhöht (Sainz und Chisari, 2006). Die Differenzierung von Huh7 Zellen wurde durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) induziert (Sainz und Chisari, 2006). Der genaue Mechanismus ist unbekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass DMSO die Integrität der Zellmembran sowie intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst. Daneben hat DMSO einen Effekt auf das alternative Splicing in der Zelle. Es wurde beschrieben, dass DMSO auch die Expression verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren hochregulieren kann (Shukla et al., 2006).

4.3.2.2.1 Behandlung von Huh7-Zellen mit DMSO

Huh7 Zellen wurden 21 Tage lang auf kollagenbeschichteten Zellkulturschalen mit Medium passagiert, dem 1% DMSO zugesetzt wurde. Nach 7 Tagen konnte das Einsetzen einer Wachstumsverzögerung beobachtet werden, die sich bis zum Tag 14 verstärkte. An Tag 21 wurden die Zellen mit dem cRNA Transkript des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A elektroporiert. Als Positivkontrolle diente die RNA des Replikons DI9. Die Auswertung erfolgte bei den BVDV Replikon

transfizierten Zellen nach 24 Stunden. In dem Fall der Transfektion mit dem Gesamtklon nzp BVDV-1 NCP7-5A wurde der NS3-Immunfluoreszenz-Assay nach 48 Stunden durchgeführt. Es konnte keine Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in mit DMSO behandelten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 36). Das Ergebnis zeigt, dass die Ausdifferenzierung von Huh7 Zellen mittels DMSO nicht zur Hochregulierung von Faktoren führt, die eine gesteigerte Translation von Jiv bewerkstelligen.



Abb. 36: DMSO induzierte Ausdifferenzierung von Huh7 Zellen führt nicht zur Unterstützung der Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A

Huh7 Zellen wurden für 21 Tage mit 1% DMSO enthaltenen Medium passagiert, um die Differenzierung auszulösen. Anschließend erfolgte die Untersuchung von Huh7 Zellen 48 Stunden nach Elektroporation von genomischer viraler RNA (NCP7-5A) mittels Immunfluoreszenz auf Vorhandensein von NS2-3/NS3 mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3. Nur das Replikon DI9 repliziert in den ausdifferenzierten Huh7 Zellen.

4.3.2.3 Mögliche Mechanismen für die Translationsrepression von Jiv in Huh7 Zellen

Die Regulation der Translation ist komplex und wird in der Zelle auf verschiedenen Wegen realisiert. Eine Regulationsmöglichkeit ist die Wirkung kleiner RNAs auf spezifische Ziel-mRNAs. Dieser Effekt wird mit dem Begriff RNA-Interferenz (RNAi) beschrieben. Zuerst entdeckt wurde das Phänomen im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Fire und Kollegen zeigten, dass die Injektion von doppelsträngigen RNAs die Genexpression spezifisch herunterregulierte (Fire et al., 1998). Liegen doppelsträngige RNAs z.B. nach einer Virusinfektion in der Zelle vor, so werden sie durch eine zytoplasmatische Endonuklease des RNase III-Typs, die als DICER bezeichnet wird, weiter in 19-mere RNA-Duplexe, die an den 3'-Enden Überhänge von zwei Nukleotiden aufweisen, prozessiert. Die so entstandenen kurzen RNA-Duplexe werden als *small interfering RNAs* (siRNA) bezeichnet. Die siRNA wird im

Ergebnisse

nächsten Schritt entwunden und es kommt zur Einlagerung des *Antisense*-Stranges in den sogenannten siRISC-Komplex (*siRNA induced silencing complex*). Ist die siRNA perfekt komplementär zur Sequenz der Ziel-mRNA kommt es zur Spaltung der Ziel-mRNA. Ist die Basenpaarung nicht vollständig komplementär, so kann es zur Translationshemmung ohne eine Abnahme der mRNA-Menge kommen. Diese mRNA kann in P-bodies (mRNA processing bodies, in der Literatur auch als GW- oder Dcp-bodies bezeichnet) eingelagert werden. In Abhängigkeit der Bedingungen in der Zelle kann diese mRNA entweder wieder für die Translation zur Verfügung stehen oder aber auch degradiert werden (Chu und Rana, 2006).

Neben siRNAs wird das Vorkommen von micro RNAs (miRNA) beschrieben. Diese 20 - 22 Nukleotid langen RNAs werden endogen in der Zelle synthetisiert. Ihnen wird eine bedeutende Rolle für die Regulation einer Vielzahl der menschlichen Gene zugesprochen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein möglicher regulatorischer Effekt von miRNAs auf die Jiv Menge in Huh7 Zellen untersucht werden.

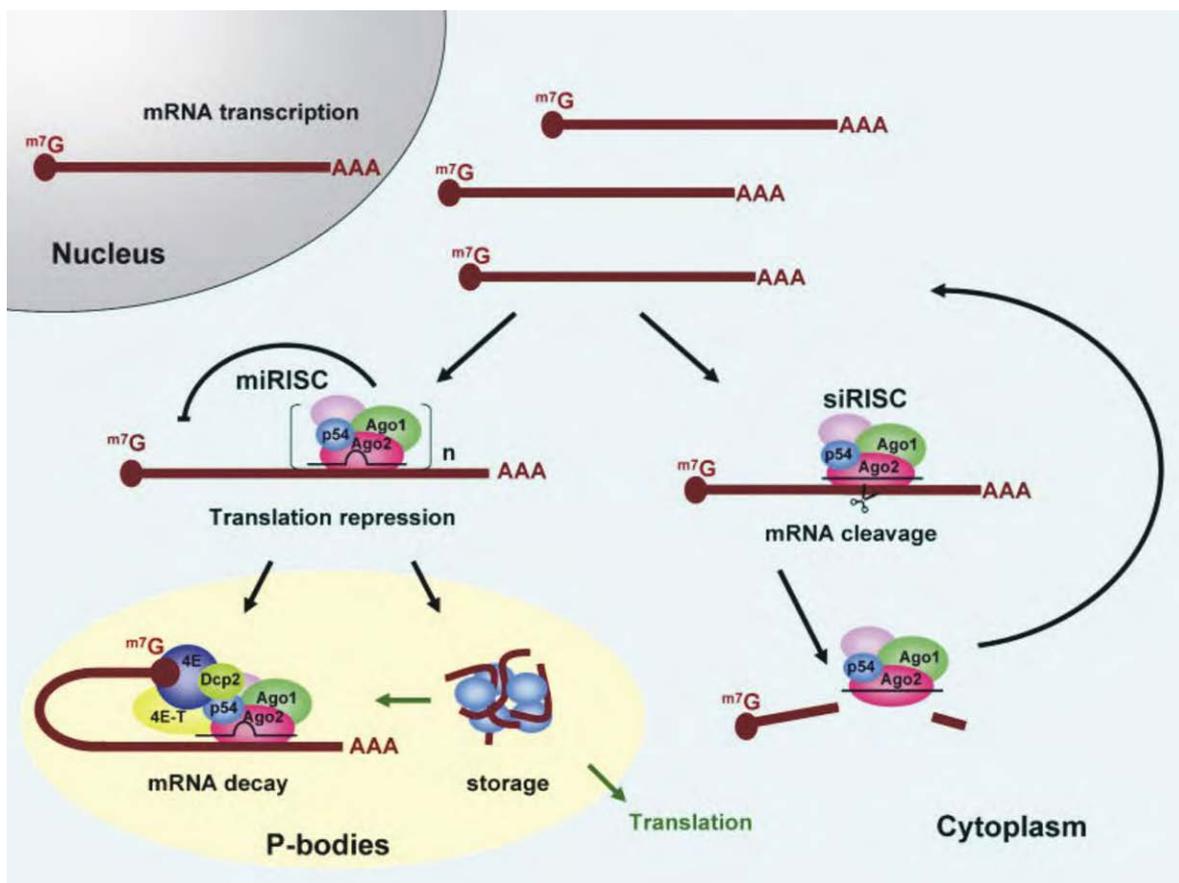


Abb. 37: Schema der Translationsrepression in humanen Zellen durch RNA-Interferenz, Abb. aus ((Chu und Rana, 2006)

4.3.2.3.1 Unterdrückung der Translationshemmung durch RNA-Interferenz

Ein wichtiges Protein, welches zur Bildung der miRISC bzw. siRISC-Komplexe benötigt wird und ein wesentlicher Bestandteil der P-bodies ist, ist das Protein RCK/p54 (auch als DDX6 bezeichnet) (Chu und Rana, 2006). Dieses Protein beinhaltet das konservierte Motiv Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat und gehört damit zu den DEAD-Box Proteinen. Es ist eine ATP-abhängige Helikase, die in der Lage ist sowohl RNA- als auch DNA-Doppelstränge zu trennen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der Knockdown des Proteins RCK/p54 durch Transfektion einer siRNA, die gegen die RCK/p54 mRNA gerichtet ist, zur (i) Auflösung der P-bodies führt und damit zur Translation der dort potentiell gelagerten mRNA oder (ii) ob der Zerfall des miRISC-Komplexes postulierte Repression für die Jiv-Translation außer Kraft setzt.

4.3.2.3.2 Auswahl der Zielsequenz zur Unterdrückung der Expression von RCK/54

Nur ein Bruchteil der nach dem Zufallsprinzip ausgewählten siRNA-Sequenzen induziert eine effiziente Spaltung der Ziel-mRNA. Reynolds et al. konnten verschiedene Kriterien aufzeigen, die für die Funktionalität der verwendeten siRNA entscheidend sind. Unter anderem sollte der GC-Gehalt im Bereich von 30 bis 52% liegen, auch werden Präferenzen für bestimmte Basen an den Positionen 3, 10, 13 und 19 beschrieben (Reynolds et al., 2004).

Die siRNA gegen das Gen RCK/p54 wurde bei der Firma Dharmacon synthetisiert. Nach Angabe der Sequenz der Ziel-mRNA wurde ein Pool bestehend aus vier verschiedenen siRNAs hergestellt. Dadurch konnte an vier verschiedenen Regionen innerhalb des ORF der Ziel-mRNA angesetzt werden (siehe Abb. 38).

Ergebnisse

```
1 ATGGGTCTGT CCAGTCAAAA TGGTCAGCTG AGAGGCCCTG TGAAACCCAC
51 TGGTGGCCCT GGAGGAGGGG GCACACAGAC ACAGCAACAG ATGAACCAGC
101 TGAAAAACAC CAACACAATC AATAATGGCA CTCAGCAGCA AGCACAGAGT
151 ATGACCACCA CTATTAAACC TGGTGATGAC TGGAAAAAGA CTTTAAACT
201 CCCTCCAAAG GATCTAAGAA TCAAACTTC GGATGTGACC TCCACAAAAG
251 GAAATGAGTT TGAAGATTAC TGTTTGAAAC GGGAGTTACT GATGGGAATT
301 TTTGAAATGG GCTGGGAAAA GCCATCTCCT ATTCAGGAGG AGAGCATTCC
351 CATTGCTTTA TCTGGTAGGG ATATCTTAGC TAGAGCAAAA AATGGAACAG
401 GCAAGAGCGG TGCCTACCTC ATTCCCTTAC TTGAACGGCT AGACCTGAAG
451 AAGGACAATA TACAAGCAAT GGTGATTGTT CCCACTAGAG AACTTGCTCT
501 ACAGGTCAGT CAAATTTGCA TCCAGGTCAG CAAACACATG GGAGGGGCCA
551 AAGTGATGGC AACCACAGGA GGAACCAATT TACGAGATGA CATAATGAGG
601 CTTGATGATA CAGTGCACGT GGTGATTGCT ACCCCTGGGA GAATCCTGGA
651 TCTTATTAAG AAAGGAGTAG CAAAGGTTGA TCATGTCCAG ATGATAGTAT
701 TGGATGAGGC AGATAAGTTG CTGTCACAGG ATTTTGTGCA GATAATGGAG
751 GATATTATTC TCACGCTACC TAAAAACAGG CAGATTTTAC TATATTCCGC
801 TACTTTCCCT CTTAGTGTAC AGAAGTTCAT GAATTCCCAT TTGCAGAAAC
851 CCTATGAGAT TAACCTGATG GAGGAACTAA CTCTGAAGGG AGTAACCCAG
901 TACTACGCAT ATGTAAGTGA GCGCCAAAAA GTACACTGCC TCAACACACT
951 TTTCTCCAGG CTTCAGATAA ACCAGTCGAT CATTTTCTGT AACTCCTCTC
1001 AGCGAGTTGA ATTGCTAGCC AAGAAGATTT CTCAACTGGG TTATTCTTGC
1051 TTCTATATTC ATGCTAAAAT GAGGCAGGAA CATCGAAATC GTGTATTTCA
1101 TGATTTCCGA AATGGCTTAT GCCGCAATCT TGTTTGCACT GATCTGTTTA
1151 CCCGAGGTAT TGATATACAA GCTGTGAATG TGGTAATAAA CTTTGATTTT
1201 CCAAAGCTGG CAGAGACCTA TCTCCATCGT ATTGGAAGAT CAGGTCGCTT
1251 TGGTCATCTT GGCTTAGCCA TCAACTTGAT CACATATGAT GATCGCTTCA
1301 ACCTGAAAAG TATTGAGGAG CAGCTGGGAA CAGAAATTAA ACCTATTCCG
1351 AGCAACATTG ATAAGAGCCT GTATGTGGCA GAATACCACA GCGAGCCTGT
1401 AGAAGATGAG AAACCTTAA
```

Abb. 38: Nukleinsäuresequenz des für das humane RCK/p54-Protein kodierenden ORFs – Genbank-Zugangsnummer: NM 004397

Dargestellt ist der für das RCK/p54-Protein (= DDX6) kodierende Leserahmen (ORF). In roten Lettern markiert sind die Target-Bereiche der siRNAs.

4.3.2.3.3 Erstellung einer Positivkontrolle

Um die Funktion der genutzten siRNAs zu prüfen, wurde die cDNA des humanen RCK/p54 über eine RT aus Huh7 Zellen gewonnen, über eine PCR amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt für die anschließende Sequenzierung in einen T-Vektor kloniert. Nach Überprüfung der Sequenz wurde das Insert in den Expressionsvektor pcDNA3 eingefügt. Nachfolgend wurden BHK Zellen mittels Superfect mit 1,5 µg des Expressionsvektors pcDNA RCK/p54 transfiziert. Danach erfolgte die zweite Transfektion mit der siRNA gegen das Protein RCK/p54. Nach 24 Stunden erfolgten die Lyse der Zellen mit SDS-Lysepuffer und die anschließende Analyse im Western Blot. Hierzu wurde der Antikörper anti-DDX6 (Fa. Aviva Systems Biology) verwendet, als Sekundärantikörper diente ein anti-Kaninchen Antikörper, der mit IRDye®-680 konjugiert ist. Am Odyssey-Gerät wurde die Fluoreszenz auf der Membran eingescannt und die Laufbanden auf korrekte Höhe und Intensität beurteilt. Die quantitative Auswertung zeigte einen Knockdown um den Faktor 4.

Nach Transfektion von Huh7 Zellen mit der siRNA konnte jedoch keine Reduktion des Proteins im Western Blot festgestellt werden, was möglicherweise auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Proteinen oder eine mangelhafte Transfektion der Zellen zurückzuführen ist (siehe Abb. 39). Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen, wurden die Huh7 Zellen mit einer siRNA, die gekoppelt war an dem Farbstoff FITC, transfiziert. Die Auswertung ergab eine Transfektionsrate von etwa 60 - 70% (Daten nicht gezeigt).

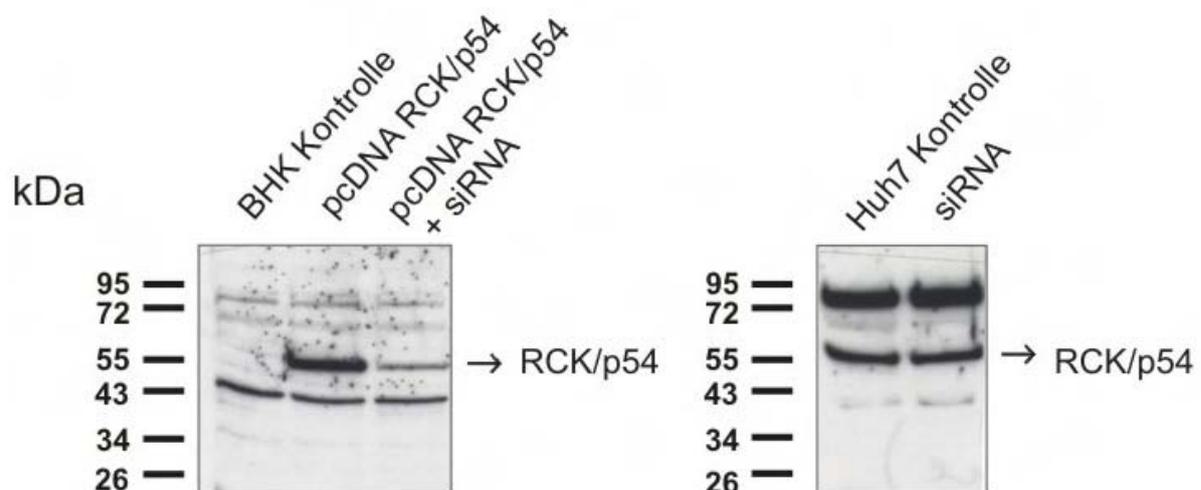


Abb. 39: Funktionskontrolle der verwendeten siRNAs

(Links) BHK Zellen wurden mit 1,5 µg des Expressionsvektors pcDNA RCK/p54 transfiziert. Es folgte eine zweite Transfektion mit der siRNA gegen das Protein RCK/p54. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit SDS-Lysepuffer lysiert. Nach quantitativer Auswertung konnte ein Knockdown um den Faktor 4 festgestellt werden.

(Rechts) Nach Transfektion von Huh7 Zellen mit der siRNA gegen RCK/p54 konnte im Western Blot mit dem Antikörper anti-DDX6 der Knockdown nicht dargestellt werden.

4.3.2.3.4 siRNA induzierter Knockdown des RCK/p54-Proteins führt zur Disruption der P-bodies

Da das Protein RCK/p54 eine wichtige strukturelle Komponente der P-bodies ist, sollte nach einem erfolgreichen Knockdown des Proteins der Strukturverlust der P-bodies zu beobachten sein. Aufgrund der schlechten Beurteilungsmöglichkeit des Knockdowns des Proteins RCK/p54 im Western Blot wurde nach der Transfektion der Huh7 Zellen mit der siRNA gegen RCK/p54 eine Immunfluoreszenz unter Verwendung des polyklonalem Serums gegen das Protein Ge-1 durchgeführt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Bloch, Harvard Medical School). Das Ge-1 Protein ist Bestandteil der P-bodies (Yu et al., 2005). Als Sekundärantikörper diente ein anti-Human Antikörper gekoppelt an den Farbstoff FITC (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Herzog, Institut für Virologie, JLU Gießen). Wie in Abb. 40 zu sehen ist, führte die Transfektion der siRNA RCK/p54 zum Verlust der P-body Strukturen. Somit scheint in Huh7 Zellen ein Knockdown von RCK/p54 zu erfolgen, der sich jedoch aus technischen Gründen im Western Blot nicht darstellen lässt.

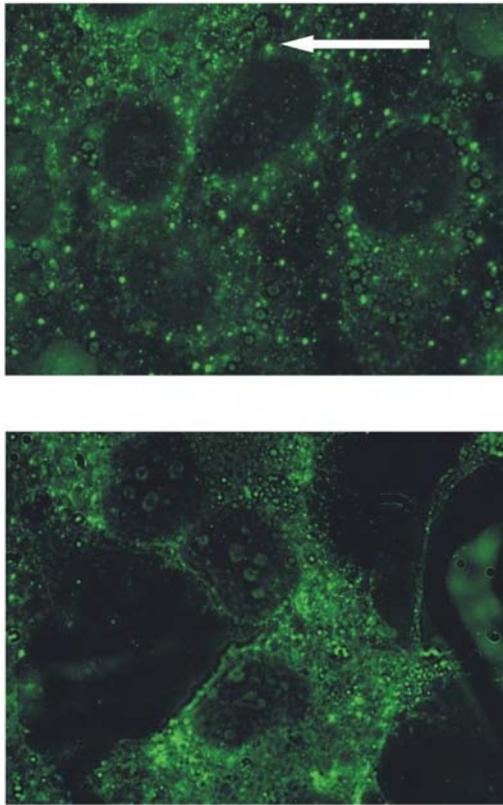


Abb. 40: Immunfluoreszenz nach Transfektion von Huh7 Zellen mit einer siRNA gegen das Protein RCK/p54

Oben: Negativkontrolle, Huh7-Zellen wurden mit einer unspezifischen siRNA transfiziert. Der Pfeil zeigt auf P-Body Strukturen. Unten: Dargestellt ist der Verlust der P-Body Strukturen in Huh7-Zellen nach der Transfektion mit einer gegen das Protein RCK/p54 gerichteten siRNA.

4.3.2.3.5 Effekt der Translationsrepression des Proteins RCK/p54 auf die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A

Abschließend wurde untersucht, ob ein siRNA-vermittelter Knockdown des Proteins RCK/p54 in Huh7 Zellen zu einem Wegfall des postulierten inhibitorischen Effektes auf die Translation der Jiv-mRNA führt. Durch den daraus resultierenden Anstieg des Jiv-Proteins, sollte der nzp BVDV-1 Stamm NCP7-5A dann in diesen Zellen replizieren können.

Daher wurden Huh7 Zellen mit der siRNA RCK/p54 transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit genomischer viraler RNA von nzp BVDV-1 NCP7-5A elektroporiert. 48 Stunden nach der Elektroporation erfolgte die Auswertung mittels des beschriebenen NS3-Immunfluoreszenz-Assays. Der Knockdown der mRNA des RCK/p54-Proteins führte jedoch nicht zur Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen (Daten

Ergebnisse

nicht gezeigt). Dieser Befund legt nahe, dass es vermutlich nach dem RCK/p54-Knockdown zu keinem Anstieg des Jiv-Spiegels in Huh7 Zellen kommt.

5 Diskussion

5.1 Korrelation zwischen regulierter NS2-3 Prozessierung und Persistenz

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVDV) ist der Erreger des wirtschaftlich bedeutenden Erkrankungskomplexes der Bovinen Virusdiarrhoe / Mucosal Disease (BVD/MD). Aufgrund der Fähigkeit in Zellkultur einen zytopathischen Effekt zu induzieren, unterscheidet man nichtzytopathogene (nzp) von zytopathogenen (zp) Stämmen. Von Bedeutung ist dabei die Infektion eines trächtigen Tieres während des 40. – 120. Trächtigkeitstages mit einem nzp BVDV Stamm, da dies eine persistente Infektion des Fetus zur Folge haben kann (PI-Tier). Zp BVD-Viren sind nicht in der Lage eine solche persistente Infektion zu etablieren. Da die Persistenz mit der Ausscheidung infektiöser Viren einhergeht, stellen PI-Tiere das Haupterregerreservoir dar.

Entsteht in einem PI-Tier ein zp Stamm aus einem persistierenden nzp Stamm, so kommt es im PI-Tier durch die unregulierte Generierung des Nichtstrukturproteins NS3 zu einer massiven Replikation des zp Virus, das als Folge der Immuntoleranz nicht durch das Immunsystem eliminiert werden kann. Dies führt zum Ausbruch der stets tödlich verlaufenden Mucosal Disease.

Eine Gemeinsamkeit der zp Stämme ist die vermehrte Freisetzung des viralen Nichtstrukturproteins 3 (NS3). NS3 ist neben NS4A, NS4B, NS5A und NS5B Bestandteil des Replikationskomplexes. NS3 besitzt Protease-, Helikase- und ATPase Aktivität und ist für die Funktion des Replikationskomplexes in seiner freien Form essentiell (Behrens et al., 1998a; Lackner, 2004; Lackner et al., 2004). Die NS3 Generierung bei zp Viren wird durch unterschiedliche Mechanismen erreicht: ein in das pestivirale Polyprotein mittels RNA-Rekombination integriertes zusätzliches Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen oberhalb des NS3 oder ein zusätzliches virales N^{pro} können zur vermehrten NS3 Freisetzung führen (Meyers und Thiel, 1996). Eine weitere Möglichkeit ist die Insertion viraler Sequenzen sowie Punktmutationen oder auch die Insertion der zellulären Sequenz, die für das Jiv-Protein kodiert. Die Sequenz der mRNA, die für das zelluläre J-Domänen Protein Jiv (*J-domain-protein interacting with viral protein*) kodiert, wurde für das Rind bestimmt (Rinck et al., 2001). Verschiedene Orthologe des bovinen Jivs sind beschrieben

worden, darunter das humane HDJ3-Protein (Chen et al., 2003), (auch als DnaJ C14 bezeichnet) sowie das DRIP78 der Ratte (Bermak et al., 2001). Jiv gehört in die Familie der J-Domänen Proteine und ist damit ein Vertreter der molekularen Chaperone (*chaperone* = Anstandsdame, Aufsicht). Diese haben wichtige Funktionen u.a. für die korrekte Faltung von Proteinen in der Zelle (Frydman, 2001). Ungespaltenes NS2-3 kann sein Spaltprodukt NS3 funktionell nicht ersetzen. Da in zp BVDV infizierten Zellen eine vermehrte NS3 Freisetzung stattfindet, ist hier eine gesteigerte Synthese der viralen RNA nachweisbar (Mendez et al., 1998; Vassilev und Donis, 2000; Becher et al., 2001; Lackner et al., 2005). Im Fall der nzp Viren ist die Bereitstellung von freiem NS3 durch die NS2-Protease zeitlich reguliert. In Zellkultur war die NS3 Freisetzung nur bis neun Stunden nach der Infektion nachweisbar (Lackner et al., 2005). Die Detektion von signifikanten Mengen an freiem NS3 zu späten Infektionszeitpunkten kann daher auch als Marker für die Infektion mit einem zp BVDV-1 Stamm angesehen werden. Im Fall von nzp BVD-Viren wurde die Regulation der NS2-Autoprotease durch den Verbrauch des intrazellulären Jiv-Proteins in der Wirtszelle erklärt (Lackner et al., 2005). In der Anfangsphase der Infektion bindet das in der Zelle vorliegende Jiv an das pestivirale NS2 und aktiviert die Spaltung von NS2-3. Die Jiv-Moleküle bleiben nach der derzeitigen Theorie an NS2 gebunden und stehen nicht mehr für die Spaltung neu translatierter NS2-3 Proteine zur Verfügung. Der durch diesen Verbrauch abgesunkene Jiv-Pool in der infizierten Zelle führt dann zur Akkumulation von ungespaltenen NS2-3. Dieser Anstieg der Menge von NS2-3 gegenüber NS3 zu späten Infektionszeitpunkten konnte auch in dieser Arbeit durch Western Blot Analysen für verschiedene nzp Pestiviren gezeigt werden (siehe Kap. 4.2.3.1). Die Generierung von NS3 zu frühen Zeitpunkten ist in Hinsicht auf den viralen Lebenszyklus sinnvoll, denn in dieser Phase steht die Replikation der viralen RNA im Vordergrund. Mit dem Wechsel hin zu ungespaltenem NS2-3 in der späten Infektionsphase geht die Absenkung der Syntheserate viraler RNA einher und die Bildung infektiöser Partikel steht im Vordergrund. Ungespaltenes NS2-3 ist für die Virionmorphogenese essentiell (Agapov et al., 2004).

Die Regulierung der viralen Replikation ist also im Fall von nzp BVDV eine entscheidende Voraussetzung für die Anpassung des Virus an seinen Wirt und damit für seine Persistenz in der Wirtspopulation. Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Grundlage für die Viruspersistenz bei Pestiviren zu leisten.

5.2 Einfluss des zellulären J-Domänen Proteins Jiv auf die Replikation von nzp BVDV-1

In der Vergangenheit wurde der Einfluss des Jiv-Proteins auf die pestivirale Replikation sowie auf die Prozessierung des viralen Proteins NS2-3 untersucht. So beobachtete man nach der Infektion von Jiv überexprimierenden (MDBK_{tet-onJiv}) Zellen mit einem nzp BVDV-1 Stamm einem Biotypwechsel von nzp nach zp sowie eine erhöhte NS3 Expression (Rinck et al., 2001). Daneben kann in diesen Zellen eine um den Faktor 10 erhöhte Syntheserate viraler RNA nachgewiesen werden (Lackner et al., 2005). Dieser Befund steht im Zusammenhang mit der hohen Menge an freiem NS3, da dieses mit einem vermehrten Vorkommen aktiver Replikationskomplexe korreliert.

Eine Absenkung des intrazellulären Jiv-Spiegels durch stabile Expression einer gegen die Jiv-mRNA gerichteten *short hairpin*-RNA (=shRNA, RNA-Interferenz) in empfänglichen Wirtszellen (PT Zellen) führte zu einer Reduktion des Jiv-mRNA-Gehaltes um ca. 80% (Lackner et al., 2005). Trotz der starken Reduktion erfolgte in diesen Jiv-Knockdown-Zellen eine relativ effiziente Replikation von nzp BVDV-1. Vergleicht man die Wachstumskurve des nzp BVDV-1 Stamms NCP7 in empfänglichen Wirtszellen ohne Jiv-Knockdown mit der in Jiv-Knockdown-Zellen, so war der Virustiter in den Jiv-Knockdown-Zellen bis zu 1,5 Log₁₀-Stufen erniedrigt. Die virale RNA-Syntheserate war um den Faktor 10 - 20 vermindert. Dies zeigt, dass dieser nzp BVDV-1 Stamm sensibel auf eine Reduktion des Jiv-Spiegels reagiert. Extrapoliert man den Effekt der Jiv-Mengenreduktion auf die virale Replikation, könnte das Jiv-Protein essentiell für nzp BVDV-1 Stämme sein.

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, war es notwendig, ein Zellkultursystem zu etablieren, welches einen weiter reduzierten Jiv-Gehalt aufweist. Da der direkte Nachweis des Jiv-Proteins auch in empfänglichen Zellen aufgrund der geringen Abundanz nicht möglich ist, wäre als indirekte Nachweismethode die Überprüfung der Replikation von nzp BVDV-1 geeignet. Im Idealfall wäre in dem neu etablierten Zellkultursystem kein intrazelluläres Jiv vorhanden. Nzp BVDV-1 Stämme sollten dann in diesen Zellen nicht replizieren können. Sollte es sich bei dem zellulären Jiv-Protein um den einzigen fehlenden essentiellen Kofaktor in dieser Zelle handeln, so

würde eine transiente Expression des Jiv-Proteins die Replikation von nzp BVDV-1 ermöglichen.

5.3 Pestivirale Replikation in Huh7 Zellen

Auf der Basis dieser Überlegungen wurden zu Beginn dieser Arbeit diverse Zelllinien mit RNA-Transkripten des Gesamtklons NCP7-5A transfiziert (siehe Tab. 3). Nur in der humanen Hepatomzelllinie (Huh7) wurde ein selektiver Replikationsblock für das Transkript von nzp BVDV-1 NCP7-5A festgestellt, während zp BVDV effizient replizierte. Das Fehlen weiterer essentieller Faktoren für die pestivirale Replikation konnte ausgeschlossen werden, da ein BVDV-Replikon DI9, welches nur NS3 bis NS5B exprimiert (Behrens et al., 1998b; Tautz et al., 1999), in der Lage ist in Huh7 Zellen effizient zu replizieren. Somit sind in Huh7 Zellen alle Faktoren vorhanden, die für die pestivirale RNA-Replikation benötigt werden.

Um einen inhibitorischer Effekt der viralen Strukturproteine auf die virale Replikation auszuschließen, wurden Huh7 Zellen mit dem Transkript der zp BVDV Chimäre NCP7/Osloss transfiziert. Diese Chimäre basiert auf dem Gesamtklon NCP7-5A, dessen NS2-Gen gegen das des zp Stamms Osloss ausgetauscht wurde. Im Genom des Stamms Osloss liegt direkt oberhalb des NS3 eine Ubiquitin-kodierende Sequenz. Diese 228 Basen Insertion im Virusgenom führt zur Translation eines Ubiquitin-Monomers zwischen NS2 und NS3 (Meyers et al., 1989b). Ubiquitin stellt ein Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen dar (Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen = UCH). Es kommt am C-Terminus des Ubiquitin zur Spaltung, so dass gleichzeitig der N-Terminus des NS3 generiert wird. Das Ubiquitin-Monomer verbleibt als Fusion am NS2 (Tautz et al., 1993b). Der Befund, dass diese Virus-Chimäre in Huh7 Zellen replizieren kann, zeigt, dass die Virusreplikation durch die viralen Strukturproteine nicht gehemmt wird (siehe Kap. 4.1.1).

Dass auch natürlich vorkommende zp Viren in Huh7 Zellen replizieren können, konnte anhand von zp BVDV-1 CP7 belegt werden. CP7 trägt in der NS2-kodierenden Region eine 27 Basen lange Insertion, welche essentiell für die Spaltung von NS2-3 ist. Wird diese Insertion in das Genom eines nzp Virus eingefügt, so kann auch hier die NS2-3 Spaltung detektiert werden (Tautz et al., 1996).

Diese Ergebnisse zeigten, dass in Huh7 Zellen mindestens ein Faktor fehlt, der für den Replikationszyklus von nzp BVDV notwendig ist. Da wie oben beschrieben

vorherige Arbeiten ergaben, dass dem zellulären J-Domänen Protein Jiv eine besondere Bedeutung für die Replikation von nzp BVDV-1 zukommt (Rinck et al., 2001; Lackner et al., 2004; Lackner et al., 2005), lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem fehlenden Faktor in Huh7 Zellen um das Jiv-Protein handeln könnte.

5.4 Wirtsfaktor-Mangel in Huh7 Zellen

Im nächsten Schritt wurde daher gezielt untersucht, ob es sich beim fehlenden Replikationsfaktor in Huh7 Zellen um das Jiv-Protein handelt. Die transiente Expression des Jiv-Proteins erlaubte die Replikation der transfizierten RNA von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen (siehe Kap. 4.1.2). Das gleiche Ergebnis konnte für einen weiteren nzp BVDV-1 Gesamtklon (nzp NADL Jiv90⁻ *pac* (Mendez et al., 1998; Lee et al., 2005), Daten nicht gezeigt) erzielt werden. Infektiöse Partikel konnten ausschließlich im Überstand und im Zellextrakt von elektroporierten Huh7 Zellen nachgewiesen werden, die transient Jiv exprimierten. Mit diesem Experiment konnte dargestellt werden, dass Jiv ein essentieller Wirtsfaktor für die Replikation der nzp BVDV Gesamtklone NCP7-5A und NADL Jiv90⁻ *pac* ist. Daneben hatte man mit den Huh7 Zellen nun ein geeignetes Testsystem, (i) um verschiedene Pestiviren vergleichend auf ihre Jiv-Abhängigkeit hin zu untersuchen und (ii) weiterhin mit diesem System Mutagenese-Studien durchzuführen, um so Bereiche des Jiv-Proteins mit essentieller Funktion für die BVDV-Replikation einzugrenzen. Im Gegensatz dazu war bisher nur die Untersuchung der Induktion der NS2-3 Spaltung möglich.

5.4.1 Bereiche im Jiv90 mit Bedeutung für die NS2-3 Spaltung

Um wichtige Aminosäuren von Jiv90 für die Aktivierung der NS2-Protease bestimmen zu können, wurde in der Vergangenheit in den Arbeiten von Lackner und Kollegen NS2-3 zusammen mit dem Kofaktor Jiv90 bzw. Alanin-Mutanten des Jiv90 in Zellen transfiziert und anschließend die NS2-3 Spaltungseffizienz mittels Radioimmunpräzipitation ausgewertet (Lackner et al., 2005). Die meisten Alaninsubstitutionsmutanten konnten die NS2-3 Spaltung immer noch induzieren, wobei einige eine stark reduzierte Spaltungsinduktion aufwiesen. Ein Austausch der Aminosäure Tryptophan an Position 39 der Jiv90-Domäne zu Alanin führte hingegen zum vollständigen Ausfall der Spaltungsinduktion, obwohl die Bindungsfähigkeit dieser Jiv-Mutante an das virale NS2 erhalten blieb. Diese Aminosäure ist somit für

die Spaltungsinduktion von Jiv als essentiell anzusehen. Für die Bindung an das virale NS2 wird nur ein 20 Aminosäuren großes Peptid (Position 41 - 60) benötigt. Für die Spaltungsinduktion werden hingegen nur Verkürzungen von zehn Aminosäuren im N-terminalen oder fünf Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Jiv90 toleriert (Lackner et al., 2005).

5.4.2 Bereiche im Jiv90 mit Bedeutung für die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A

5.4.2.1 Jiv90-Varianten mit Alanin-Austauschen an den Positionen 39 und 59/60 des Jiv90 können die Replikation von nzp BVDV-1 in Huh7 Zellen nicht unterstützen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Kontext des Jiv-Proteins Aminosäuren in der Jiv90-Domäne gegen Alanin ausgetauscht und die Fähigkeiten dieser Alaninmutanten zur Unterstützung der viralen Replikation untersucht (siehe Kap. 4.1.3). Die erzielten Ergebnisse korrelieren nicht vollständig mit den oben beschriebenen Daten aus der Arbeit von Lackner et al., bei welchen Jiv-Mutanten auf ihre Effizienz bezüglich der NS2-3 Spaltungsinduktion untersucht worden waren. Selbst einige Mutanten, die eine stark reduzierte Spaltungsinduktion zeigten (z.B. Jiv90 I84A = 27%-ige Spaltungseffizienz, siehe Tab. 5), ermöglichten dennoch die virale Replikation in Huh7 Zellen. Die meisten der untersuchten Alaninmutanten förderten die Virusreplikation in Huh7 Zellen. Selbst Mutationen im Zink-Bindebereich (C24A, C24A/C27A, C27A) wurden toleriert. Jedoch konnte auch in dem neu etablierten Huh7-Zellkultur-Assay gezeigt werden, dass die Aminosäure Tryptophan an Position 39 des Jiv90 essentiell ist, da diese Mutante nicht in der Lage ist die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen zu fördern. Interessanterweise kann die Doppelmutante V59A/Y60A im Bindepeptid (Position 41 - 60) des Jiv90 die virale Replikation ebenfalls nicht unterstützen, jedoch werden die Einzelaustausche V59A und Y60A toleriert. Es wäre möglich, dass die exprimierten Jiv-Mutanten in Huh7 Zellen nicht gleich stabil sind und es dadurch zum Ausbleiben der Replikationsinduktion von nzp BVDV-1 NCP7-5A kommt. Dies erscheint jedoch als unwahrscheinlich, da sich im Western Blot solche Stabilitätsunterschiede nicht darstellen ließen.

Da es sich bei dem Huh7-Zellkultur-Assay um keine quantitative Methode handelt, ist es schwierig eine Aussage zu treffen, ob Mutanten mit geringer NS2-3 Spaltungseffizienz auch geringere virale Replikationsraten zeigen im Vergleich zu anderen Jiv-Alaninmutanten mit hoher Spaltungseffizienz. Dies könnte in einem weiterführenden Experiment mithilfe der quantitativen Real-Time RT-PCR bestimmt werden. Dennoch ist festzuhalten, dass die meisten Alaninmutanten mit schwacher Spaltungsinduktion grundsätzlich die Fähigkeit besitzen, die virale Replikation in Huh7 Zellen zu fördern.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass ein Bruchteil der Jiv-Moleküle trotz Mutation die richtige Faltung besitzen und diese für die Spaltungsinduktion einer ausreichenden Zahl von NS2-3 Molekülen genügen, um die pestivirale Replikation zu ermöglichen.

Die Tatsache, dass die Ergebnisse des Immunfluoreszenznachweises und die Bildung infektiöser Partikel miteinander korrelieren, spricht dafür, dass es sich bei negativen Proben um keine falsch negativen Resultate handelt.

5.4.2.2 Tetra-Alanininsertionen in der Nähe des NS2-Bindepeptids von Jiv führen zum Verlust der Fähigkeit, die pestivirale Replikation zu fördern

Durch das Einfügen von vier Alaninen hinter bestimmte Aminosäuren in der Jiv90-Domäne des Jiv-Proteins sollten strukturelle Veränderungen erzielt werden, so dass mithilfe dieser Mutanten eine weitere Kartierung der wichtigen Bereiche der Jiv90-Region vorgenommen werden konnte.

Da bisher die Effizienz der NS2-3 Spaltungsinduktion der Tetra-Alaninmutanten nicht quantifiziert wurde, erfolgte dies zu Beginn der vorliegenden Arbeit entsprechend der beschriebenen Radioimmunpräzipitationsmethode (Lackner et al., 2005). Alle Tetra-Alaninmutanten lösten die NS2-3 Spaltung aus. Eine besonders stark reduzierte Spaltungsinduktion (unter 4%) war bei den Mutanten nach den Positionen R22 (Arginin), F38 (Phenylalanin), T63 (Threonin) und Q64 (Glutamin) nachweisbar. Die Mutanten nach den Positionen R11 (Arginin) und A25 (Alanin) zeigten eine mäßig reduzierte Spaltungseffizienz im Gegensatz zu der Mutante nach Position D15 (Aspartat), deren Fähigkeit die NS2-3 Spaltung auszulösen vergleichbar mit der des unveränderten Jiv90 (Jiv90 wt) ist (siehe Kap. 4.1.4). Im nächsten Schritt wurde der Einfluss dieser Tetra-Alaninmutanten auf die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen untersucht. Die Tetra-Alaninmutanten mit schwacher NS2-3

Spaltungsinduktion (R22AAAA, F38AAAA, T63AAAA und Q64AAAA) konnten die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen nicht unterstützen; auch konnten im Überstand der elektroporierten Zellen keine infektiösen Partikel nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die anderen Mutanten in der Lage die Replikation von NCP7-5A in Huh7 Zellen zu unterstützen; in diesen Fällen gelang auch der Nachweis von infektiösen Viren im Überstand.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnte festgestellt werden, dass Tetra-Alaninmutanten, welche eine geringe Fähigkeit zur Induktion der NS2-3 Spaltung aufwiesen, die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A nicht fördern konnten. Auch hier wurden im Western Blot keine Stabilitätsunterschiede der transient exprimierten Proteine festgestellt, die als Begründung für die beobachteten Effekte möglich gewesen wären. Interessanterweise führen die in der Nähe des Bindepeptids eingefügten Tetra-Alanine (F38AAAA, T63AAAA, E64AAAA) zum Verlust der Fähigkeit der Replikationsförderung. In einem weiterführenden Experiment wäre es sinnvoll, Tetra-Alanine im Bereich des Bindepeptids an den Positionen 41 – 60 einzufügen.

5.4.2.3 Das Minimalfragment Jiv90 unterstützt die Replikation des Gesamtklons nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen

In den Arbeiten von Lackner et al. wurde untersucht, ob Verkürzungen des Jiv90-Fragments in der Lage sind die NS2-3 Spaltung auszulösen. Hierfür wurde Jiv90 jeweils im N- bzw. C-terminalen Bereich schrittweise um 5 bis 10 Aminosäuren verkürzt. Es stellte sich heraus, dass Jiv90 im N-terminalen Bereich um 10 Aminosäuren und im C-terminalen Bereich um 5 Aminosäuren verkürzt werden kann, ohne die Fähigkeit zur Induktion der NS2-3 Spaltung vollständig zu verlieren (Lackner et al., 2005). Im Huh7-Zellkultur-Assay konnte jedoch nur das Jiv90-Fragment die Virusreplikation fördern. Sobald das Jiv90-Fragment im N- bzw. C-terminalen Bereich um weitere Aminosäuren verkürzt wurde, konnte keine virale Replikation mehr nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.1.5). Ein Grund dafür könnte der mit den Verkürzungen verbundene Verlust der zinkbindenden Eigenschaften sein, da sich im N-terminalen Bereich des Jiv90-Fragmentes zwei Zink-Binde-Motive (CXXC) befinden. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da Alaninsubstitutionen im Zink-Binde-Motiv keinen kompletten Funktionsverlust zur Folge haben. Stabilitätsunterschiede zwischen den exprimierten Proteinen konnten durch eine

mittels Immunfluoreszenz durchgeführte Expressionskontrolle ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wird die Fähigkeit der Spaltungsinduktion kleinerer Jiv-Varianten im Beisein des kompletten Virusgenoms beeinträchtigt. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass es sich bei der kleinsten natürlich im Genom eines zp Virus vorkommenden Jiv Insertion um Jiv90 handelt (Vassilev et al., 1997; Mendez et al., 1998).

5.5 Jiv-Abhängigkeit verschiedener Pestiviren

Neben der Untersuchung der für die virale Replikation wichtigen Bereiche der Jiv90-Domäne sollten verschiedene Pestiviren mit dem Huh7-Zellkultur-Assay auf ihre Jiv-Abhängigkeit untersucht werden (siehe Kap. 4.2.1). Da sich die in dieser Arbeit untersuchten BVDV-1 nzp Stämme bezüglich ihrer Jiv-Abhängigkeit sehr uneinheitlich verhielten, ist es schwierig, eine generelle Aussage über die essentielle Rolle des Wirtsfaktors Jiv zu machen. Dass die Koexpression von Jiv die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen ermöglicht, belegt, dass in diesen Zellen ein Mangel des Jiv-Proteins vorliegt. Dies bedeutet jedoch nicht, dass in diesen Zellen kein Jiv exprimiert wird. Leider ist der Nachweis des endogenen Jiv-Proteins (auch in empfänglichen Wirtszellen) aufgrund des Fehlens eines geeigneten Nachweissystems für die extrem geringen Mengen bisher noch nicht gelungen. Dies ist ein wichtiger Aspekt für zukünftige Arbeiten.

Es ist möglich, dass in Huh7 Zellen ein sehr geringer Jiv-Spiegel vorzufinden ist. Bei den Huh7 Zellen handelt es sich um Leberzellen, die sehr stoffwechselaktiv sind. So ist es vorstellbar, dass das Jiv-Protein in der Zelle für andere Vorgänge Verwendung findet und somit nicht für die pestivirale Replikation zur Verfügung steht. Über die physiologischen Aufgaben des Jiv-Proteins in der Zelle ist derzeit jedoch noch nicht viel bekannt (Bermak et al., 2001; Dupre et al., 2007).

Das uneinheitliche Bild der Jiv-Abhängigkeit der nzp BVDV-1 Stämme könnte möglicherweise auf einen unterschiedlichen Fitness-Grad dieser Viren zurückzuführen sein. Eine mögliche Ursache für den unterschiedlichen Fitness-Zustand könnte in den nichttranslatierten Regionen (NTRs) oder in den Replikaseproteinen zu finden sein. Es ist beschrieben, dass die 3'NTR des Virusgenoms einen erheblichen Einfluss auf die Replikationseigenschaften des Virus hat. So können Deletionen von vier Basen in der 3'NTR zu einem erheblichen Einbruch des Virustiters führen (Pankraz, 2007). Die 3'NTR bei Pestiviren kann in

ihrer Länge von 188 bis 276 Nukleotiden variieren (Becher et al., 1998; Avalos-Ramirez et al., 2001). Ein Alignment der 3'NTR verschiedener Pestiviren zeigt, dass die am weitesten 3'-wärts gelegenen 70 Nukleotide konserviert sind. Man bezeichnet diese Region als „3'-conserved“-Region, der variable Rest wird „3'-variable“-Region genannt (Deng und Brock, 1993).

Isken und Kollegen konnten zeigen, dass bestimmte zelluläre Proteine die Replikation der Pestiviren durch Bindung an der „3'-variable“-Region unterstützen. Diese zellulären Proteine gehören der sogenannten NF90/NFAR-Proteinfamilie („*Nuclear factor associated with RNA*“) an und können auch an die 5'NTR binden (Isken et al., 2003; Isken et al., 2004). Es ist vorstellbar, dass sich die Pestiviren aufgrund der variablen 3'-Region hinsichtlich ihrer Replikationsrate unterscheiden und dass Viren, die durch diese Eigenschaften besser replizieren, weniger sensibel auf das niedrige Jiv-Niveau in Huh7 Zellen reagieren, da sie effizienter Replikationskomplexe rekrutieren können.

Diese Hypothese wird weiter durch die Tatsache bestärkt, dass die RNA von zwei nahezu identischen nzp BVDV-1 NCP7 Gesamtklonen nach Elektroporation in Huh7 Zellen zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Die beiden NCP7 Gesamtklone unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihrer 3'NTRs. Während bei dem Gesamtklon, der in dieser Arbeit als NCP7-5A bezeichnet wurde, die 3'terminale Region aus „historischen“ Gründen denen des zp BVDV Stamm Osloss entspricht, besitzt der Gesamtklon NCP7 393 die authentischen Enden des nzp BVDV-1 Stamms NCP7 (Pankraz et al., 2005).

Die Infektiosität der RNA, die auf Basis des Gesamtklons mit der authentischen 3'NTR (NCP7 393) transkribiert wurde, ist um den Faktor 2 höher und die verursachten Plaques sind doppelt so groß im Vergleich zu der RNA des Gesamtklons pNCP7-5A (Daten nicht gezeigt). Interessanter Weise ist nur NCP7 393, wenn auch nur zu einem sehr geringen Grad, in der Lage in Huh7 Zellen ohne zusätzliche Jiv-Expression zu replizieren (siehe Abb. 16).

Desweiteren zeigen auch die Ergebnisse der Versuche mit den CSFV Gesamtklonen unterschiedliche Effekte eines niedrigen Jiv-Niveaus. So replizieren virulente CSFV Stämme wie Alfort 187 (Daten nicht gezeigt) und Brescia (siehe Kap. 4.2.2.4) unabhängig vom niedrigen Jiv-Spiegel. Das stark attenuierte Impfvirus (Riems) hingegen ist abhängig vom Jiv-Level und repliziert ausschließlich bei transienter Jiv-Expression in Huh7 Zellen. Eine Vermutung war, dass die Autoprotease im NS2 des

CSFV Alfort 187 aktiver und daher weniger Jiv abhängig ist als die des Stamms Riems. Ersetzt man allerdings die NS2-Protease des Gesamtklons CSFV Alfort durch die des Jiv-abhängigen Gesamtklons CSFV Riems, so kann die RNA dieser Chimäre entgegen der ursprünglichen Erwartungen dennoch in Huh7 Zellen replizieren. Somit liegt der Grund für die Attenuierung des Stamms Riems nicht im Bereich der NS2-Protease. Da in diesem Fall davon ausgegangen werden muss, dass nicht die absolute Zahl der NS3-Moleküle die Ursache für die fehlende Replikation in Huh7 darstellt, sollten andere Defekte in der Assemblierung der Replikase, z.B. in der 3´NTR, der Grund für die Jiv-Abhängigkeit sein.

Interessanterweise weist die 3´NTR von CSFV Riems einen Austausch im Vergleich zum Stamm Alfort 187 auf, der auch zwischen NCP-5A und NCP7 393 zu finden ist. Dieser Austausch verkürzt den Stammbereich des „*Stem-loop*“ 1, der für die RNA-Replikation von großer Bedeutung ist. Durch diese Veränderung in der 3´NTR könnte CSFV Riems eine schlechtere Effizienz bei der Assemblierung der Replikase aufweisen und deshalb sensitiver auf den geringen Jiv-Gehalt in den Huh7 Zellen reagieren. Es sollte daher in einem weiterführenden Versuch untersucht werden, ob der Stamm Riems mit der 3´NTR des Stamm Alfort 187 in der Lage ist in Huh7 Zellen zu replizieren.

Um auf die Frage der essentiellen Rolle des Jiv-Proteins für nzp Viren eine eindeutige Antwort geben zu können wäre es sehr hilfreich, eine vollständig Jiv-freie Zelle zur Verfügung zu haben. Dabei stellt sich allerdings die Frage, ob solche „Jiv-Knockout“ Zellen lebensfähig wären. Sollte sich eine solche Zelllinie etablieren lassen, so wäre der nächste mögliche Schritt der „Jiv-Knockout“ im Gesamtorganismus. Theoretisch könnte dies für ein solches Rind bedeuten, dass sich ein nzp BVD-Virus nur mit erheblichen Einschränkungen oder gar nicht vermehren könnte, was neue Möglichkeiten für die Bekämpfung der Tierseuche BVD/MD aufzeigen würde.

5.6 Molekulare Grundlagen für den Jiv-Mangel in Huh7 Zellen

Die Beobachtung, dass nur nach exogener Jiv-Expression die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A in Huh7 Zellen erfolgte, legt nahe, dass Huh7 Zellen einen sehr geringen Jiv Spiegel aufweisen. Um die molekulare Basis des Jiv-Mangels in Huh7 Zellen zu finden, wurde zunächst die Jiv-mRNA untersucht. Mittels absoluter quantitativer Real-Time RT-PCR wurde der Jiv-mRNA-Gehalt in Huh Zellen und

empfindlichen Wirtszellen (MDBK) bestimmt. Zu allen untersuchten Zeitpunkten und in allen Ansätzen war der Jiv-mRNA-Gehalt in Huh7 Zellen im Vergleich zur bovinen Wirtszelle um etwa 50% reduziert (siehe Kap. 4.3.1.1). Da jedoch frühere Arbeiten ergaben, dass die pestivirale Replikation in Wirtszellen, die über Anwendung von RNA-Interferenz einen um 80% reduzierten Jiv-mRNA-Gehalt besitzen (PT Jiv knockdown Zellen, (Lackner et al., 2005)), noch effizient möglich ist, stellt eine Reduktion der Jiv-mRNA in Huh7 Zellen um 50% keine ausreichende Erklärung für den beobachteten Phänotyp dar. Weiterhin könnte auch eine fehlerhafte Sequenz im offenen Leserahmen (ORF) der Huh7 Jiv-mRNA verantwortlich für die Translation eines fehlerhaften Proteins oder sogar für das Ausbleiben der Jiv-Translation sein. Daher wurde die Jiv-mRNA Sequenz von Huh7 Zellen bestimmt und mit den für das bovine Jiv-Protein (Genbank-Zugangsnummer: AY 027882) und den für das humane Protein DnaJ C14 (Genbank-Zugangsnummer: EF560741) veröffentlichten Daten verglichen. Auf Proteinebene wurde eine Aminosäuren-Identität von 100% zwischen der DnaJ C14-Sequenz und der aus Huh7 ermittelten Sequenz gefunden. Die Jiv-Sequenz aus Huh7 Zellen und die des bovinen Jiv waren zu 92,3% identisch. Da die kodierende Region des in dieser Arbeit verwendeten Jiv-Expressionsplamids von der isolierten mRNA aus Huh7 Zellen stammt und zur Expression von funktionalem Jiv führt (siehe Kap. 4.3.1.2.1), liefert die ermittelte Jiv-mRNA Sequenz keine hinreichende Erklärung für den Jiv-Mangel in Huh7 Zellen.

Weiterhin wäre es möglich, dass genügend Jiv-mRNA in der Huh7 Zelle vorhanden ist, es jedoch nach der Translation zu einem erhöhten Abbau des Proteins im Vergleich zur bovinen Wirtszelle kommt und Jiv somit nicht mehr für die Virusreplikation zur Verfügung steht. Um dieser Theorie nachzugehen, wurden Huh7 Zellen mit MG132 behandelt. Dieser zur Gruppe der Peptidaldehyde gehörende Proteasom-Inhibitor führt zu einer erheblichen Verminderung des zellulären Protein-Abbaus. Nach Behandlung von Huh7 Zellen mit MG132 konnte weder mittels Immunpräzipitation Jiv nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), noch konnte eine indirekte Zunahme der Jiv-Menge über das Erfolgen der nzp BVDV-1 NCP7-5A Replikation gezeigt werden (siehe Kap. 4.3.2.1). Somit erscheint es als unwahrscheinlich, dass der Jiv-Mangel durch dessen erhöhte Degradation im Stoffwechsel von Huh7 Zellen begründet ist.

Bei der Huh7 Zelle handelt es sich um eine humane Hepatomzelllinie, die nicht gut ausdifferenziert ist. Somit könnte auch darin ein Grund für den Jiv-Mangel liegen. In

der Literatur wurde beschrieben, dass die Behandlung von Huh7 Zellen mit DMSO zu deren Ausdifferenzierung führt (Sainz und Chisari, 2006). Daher wurde untersucht, ob die Ausdifferenzierung mittels DMSO zur Hochregulierung von Faktoren führt, die für die Initiation der Jiv-mRNA Translation wichtig sind. Obwohl die morphologischen Veränderungen nach DMSO-Behandlung für ein Ausdifferenzieren der Zellen sprachen, konnte in diesen keine Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A beobachtet werden (siehe Kap. 4.3.2.2). Somit gibt dieses Experiment keinen Hinweis auf eine Hochregulation der Jiv-Translation nach Ausdifferenzierung.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Translation der Jiv-mRNA in Huh7 durch regulatorische Vorgänge in der Zelle gehemmt wird. Eine Regulationsmöglichkeit ist die Wirkung von sogenannten microRNAs (miRNA) auf spezifische Ziel-mRNAs. Die miRNA kann die Ziel-mRNA zerschneiden oder lediglich deren Translation verhindern. Diese der Translation nicht zugeführte mRNA wird in P-bodies (*mRNA processing bodies*, in der Literatur auch als GW- oder Dcp-bodies bezeichnet) gelagert. In Abhängigkeit der Bedingungen in der Zelle kann diese mRNA entweder wieder für die Translation zur Verfügung stehen oder aber auch degradiert werden (Chu und Rana, 2006).

Für humane Leberzellen ist das Vorkommen einer spezifischen miRNA namens miR122 beschrieben (Jopling et al., 2005). Jedoch geben Sequenzvergleiche mit der Jiv-mRNA keinen Hinweis darauf (Daten nicht gezeigt), dass die Translation der Jiv-mRNA über die miR122 reguliert wird. Auch die Transfektion von spezifisch mit miR122 basenpaarenden modifizierten Oligonukleotiden, die als „antagomir“ bezeichnet werden, führte gemäß BVDV-Replikationsassay nicht zur Erhöhung des Jiv-Spiegels in der Zelle (Daten nicht gezeigt).

Um die Suche nach einer spezifischen miRNA zu umgehen, wurde überlegt einen Protein-Faktor auszuschalten, der ganz allgemein für die miRNA vermittelte Translationsrepression in der Zelle erforderlich ist. Ein Protein, welches in der „Stilllegungsmaschinerie“ benötigt wird und ein wesentlicher Bestandteil der P-bodies ist, ist eine ATP-abhängige Helikase namens RCK/p54 (auch als DDX6 bezeichnet) (Chu und Rana, 2006). Durch den gezielten Knockdown des Proteins RCK/p54 in Huh7 Zellen, sollte (i) die Disruption der P-bodies und damit die Translation der dort gelagerten mRNA und (ii) der Zerfall des für die Repression notwendigen miRISC-Komplexes erreicht werden. Ein siRNA vermittelter Knockdown des Proteins

RCK/p54 in Huh7 Zellen führte jedoch nicht zu einem Jiv-Spiegel, der die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A erlaubt hätte, obwohl mikroskopisch der Zerfall der p-Bodies zu beobachten war (siehe Kap. 4.3.2.3.4 und 4.3.2.3.5). Es könnte sein, dass der durchgeführte Knockdown des Proteins RCK/p54 in Huh7 Zellen aufgrund der Transfektionsrate von 60 – 70% nicht effizient genug war, um die Repression der Jiv-Translation zu stören. Dies könnte auch erklären, warum in der Western Blot Analyse der Knockdown des Proteins RCK/p54 in Huh7 Zellen nicht darstellbar war, wobei dies jedoch ebenso auf eine Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers zurückzuführen sein könnte. In weiterführenden Experimenten könnte versucht werden, andere zelluläre Proteine anzugreifen, die ebenso wie das RCK/p54-Protein für die Translationshemmung benötigt werden. Ein hier zu nennender Vertreter wäre das Lsm1-Protein. Der Knockdown von diesem Protein hätte den Verlust der P-body-Strukturen zur Folge (Chu und Rana, 2006). Dort gelagerte mRNA würde der Translation wieder zur Verfügung stehen.

Ein anderer für zukünftige Experimente wichtiger zu nennender Punkt wäre die Untersuchung der Rolle des vorhandenen vorgeschalteten offenen Leserahmens (*upstream open reading frame* = uORF) in der Jiv-mRNA auf die Regulation der Jiv-Translation im Kontext der Huh7 Zellen. Die Regulation der Proteinbiosynthese durch uORFs ist für andere Proteine bereits beschrieben worden (Lovett und Rogers, 1996; Morris und Geballe, 2000; Dever, 2002; Vilela und McCarthy, 2003; Sachs und Geballe, 2006), so beispielsweise auch für ein Protein, das als Her-2 bezeichnet wird. Her-2 wird in Zellen zu einem basalen Level exprimiert. Child und Kollegen beschrieben, dass die Proteinexpression durch den uORF negativ beeinflusst wird und erklären dies mit der Unfähigkeit der Ribosomen, nach der Initiation an dem uORF an dem abwärts gelegenen Startkodon wieder zu reinitieren (Child et al., 1999a; 1999b). In Tumorzellen dagegen ist der Gehalt von Her-2 um den Faktor 50 erhöht (Kraus et al., 1987; Vernimmen et al., 2003), so auch in 20 - 30% aller Brustkrebserkrankungen. Mehta et al. konnten zeigen, dass die 3'NTR der Her-2 mRNA in Krebszellen die herunterregulierte Translation durch den uORF in der 5'NTR überwinden kann. Hier liegt ein Translation Derepressionselement (TDE) an dem ein 38 kDa großes Protein bindet (Mehta et al., 2006). Da in der bovinen Jiv-mRNA ebenfalls zwei vorgeschaltene AUGs vor dem eigentlichen ORF zu finden sind (Rinck et al., 2001), ist es gut möglich, dass in Huh7 Zellen über diesen Mechanismus die Translation der Jiv-mRNA gehemmt ist.

5.7 Ausblick

Nachdem für einige nzp Pestiviren mit dem Huh7-Zellkultur-Assay gezeigt werden konnte, dass Jiv essentiell für deren Replikation ist, ist es nun Gegenstand aktueller Arbeiten den geringen Jiv-Spiegel der Huh7-Zelllinie durch Anwendung von RNA-Interferenz weiter abzusenken. Sollten nzp BVDV-1 Stämme, die zuvor in Huh7 Zellen ohne zusätzliche Jiv-Expression replizierten, in diesen Huh7 Jiv-knockdown Zellen auf die exogene Jiv-Expression angewiesen sein, so wäre dies ein Beleg dafür, dass Jiv generell ein essentieller Faktor bei nzp BVDV-1 ist und man könnte der Fragestellung nachgehen, inwieweit andere Pestiviren ebenfalls vom Jiv-Protein abhängig sind.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit den molekularen Gründen für den geringen Jiv-Spiegel in Huh7 Zellen. Dies wird auch die Fragestellung zukünftiger Studien sein. U.a. sollte untersucht werden, ob der vorgeschaltene offene Leserahmen (uORF) in der 5'NTR der Jiv-mRNA Grund für die geringe Translationrate der Jiv-mRNA ist.

6 Zusammenfassung

Das Genus *Pestivirus* bildet gemeinsam mit den Genera *Flavi-* und *Hepacivirus* die Familie der *Flaviviridae*. Vertreter des Genus *Pestivirus* sind das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe Typ 1 (BVDV-1), das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe Typ 2 (BVDV-2), das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und das *Border Disease Virus* der Schafe (BDV). Pestiviren besitzen ein RNA-Genom von positiver Polarität, das etwa 12,3 Kilobasen (Kb) groß ist. Ein einziger offener Leserahmen (ORF), welcher im 5´- und 3´-Bereich von nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert wird, kodiert für ein Polyprotein.

Aufgrund der Fähigkeit in der Zellkultur nach Infektion einen zytopathischen Effekt auszulösen, werden zytopathogene (zp) und nichtzytopathogene (nzp) Biotypen unterschieden. Nur nzp BVDV Stämme können persistierende Infektionen hervorrufen. Die Viruspersistenz geht mit einer erworbenen Immuntoleranz gegen das infizierende Virus einher. Durch Rekombination oder Mutation im RNA-Genom des persistierenden Virus können zytopathogene (zp) Viren entstehen, welche die stets tödlich verlaufende Erkrankung Mucosal Disease (MD) im immuntoleranten Wirt auslösen. Eine Gemeinsamkeit der zp Stämme ist eine vermehrte Freisetzung des viralen Nichtstrukturproteins 3 (NS3) und eine damit verbundene verstärkte Synthese viraler RNA in infizierten Wirtszellen.

Ein zelluläres Protein aus der Familie der J-Domänen-Chaperone hat wesentlichen Einfluss auf die Replikation von Pestiviren. Dieses Protein interagiert mit dem viralen Nichtstrukturprotein 2 (NS2) und wird daher als Jiv (kurz für: „*J-domain protein interacting with viral protein*“) bezeichnet. Die Koexpression des Jiv-Proteins zusammen mit NS2-3 führt zur Spaltung von NS2-3 und damit zur Freisetzung von NS3. Einige zp BVDV Stämme tragen Jiv-kodierende Sequenzen in ihrem Genom, was eine unregulierte NS2-3-Prozessierung, eine hohe virale RNA-Replikationsrate und den zp Biotyp zur Folge hat.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe eines auf Basis von Huh7 Zellen etablierten Assays erstmals gezeigt werden, dass das Jiv-Protein für die Replikation bestimmter nzp BVDV-1 Stämme essentiell ist. Darüberhinaus konnte mithilfe dieses Assays die Relevanz bestimmter Aminosäuren des Jiv-Proteins für dessen Unterstützung der viralen Replikation geklärt werden. Es wurden dabei zwei Regionen identifiziert, die für die Funktion des Jiv-Proteins im pestiviralen Lebenszyklus essentiell sind. Wird

Zusammenfassung

die Aminosäure Tryptophan an Position 39 zu Alanin (W39A) ausgetauscht, so unterbleiben die Aktivierung der viralen NS2 Protease und die NS2-3 Spaltung und damit die virale Replikation (NCP7-5A) in Huh7 Zellen. Ebenso führt eine Doppelmutation im NS2-Bindepeptid (Position 41 – 60 von Jiv90) an den Positionen 59 (Valin) und 60 (Tyrosin) zu einem Funktionsverlust von Jiv. Durch das Einfügen von Tetra-Alaninen hinter bestimmte Aminosäuren im Bereich des NS2-Bindepeptids wurde die Fähigkeit, die Replikation von nzp BVDV-1 NCP7-5A zu unterstützen ebenfalls stark beeinträchtigt. Dies spricht für eine besondere Bedeutung der Jiv-Region um das NS2-Bindepeptid. Jiv90 zeigte sich als das minimale Fragment, welches die nzp BVDV-1 NCP-5A Replikation noch unterstützen kann. Dies korreliert mit der Tatsache, dass Jiv90 die kleinste Jiv-Insertion im Genom von zp Pestiviren darstellt.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit beschäftigte sich mit der molekularen Ursache für den niedrigen Jiv-Protein Gehalt in Huh7 Zellen. Die mittels Real-Time RT-PCR quantifizierte Menge der Jiv-mRNA war im Vergleich zu BVDV empfänglichen Wirtszellen um etwa 50% reduziert. Das von der Jiv-mRNA aus Huh7 Zellen kodierte Protein konnte die BVDV-Replikation unterstützen. Somit legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die molekulare Basis für den Jiv-Mangel in Huh7 Zellen auf posttranskriptioneller Ebene liegt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur essentiellen Rolle des Wirtsfaktors Jiv für die Replikation bestimmter nzp Pestiviren stellen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der molekularen Grundlage für die Viruspersistenz bei Pestiviren dar.

7 Summary

The genus *Pestivirus* forms together with the genera *Flavi-* und *Hepacivirus* the family *Flaviviridae*. Members of the genus *Pestivirus* are the Bovine Viral Diarrhoea Virus type 1 (BVDV-1), Bovine Viral Diarrhoea Virus type 2 (BVDV-2), Classical Swine Fever Virus (CSFV) and Border Disease Virus of sheep (BDV). Pestiviruses have an RNA genome of positive polarity which is 12,3 kb in size. One open reading frame (ORF) which is flanked by untranslated regions (UTR) at the 5'- and 3'-end encodes one polyprotein.

Based on the ability to cause a cytopathic effect in cell culture, cytopathogenic (cp) and noncytopathogenic (noncp) biotypes are distinguished. Only noncp BVDV strains are able to establish persistent infections. Viral persistence is associated with immunotolerance towards the persisting virus. Recombinations or mutations of the RNA genome of the persisting virus can emerge cytopathogenic (cp) viruses, which causes lethal Mucosal Disease (MD) in the immunotolerant host. One common feature of cp strains is increased release of nonstructural protein 3 (NS3) and thereby increased synthesis of viral RNA in infected host cells.

A cellular protein of the J-domain-chaperone family has influence on the replication of pestiviruses. This protein interacts with the viral nonstructural protein 2 (NS2) and is termed Jiv (short for: "J-domain protein interacting with viral protein"). Coexpression of Jiv together with NS2-3 leads to the cleavage of NS2-3 and release of NS3. Some cp BVDV strains comprise Jiv-coding sequences in their genome which results in unregulated NS2-3-processing, increased viral RNA-synthesis and determines the cp biotype.

In the present work, a Huh7 cell assay was established which allows for the first time the demonstration, that the Jiv-protein is essential for certain noncp BVDV-1 strains. Furthermore the relevance of individual residues of Jiv for the support of viral replication could be investigated. Two regions have been identified which are essential for the function of Jiv in the viral life cycle. An exchange of amino acid tryptophan at position 39 to alanine (W39A) abolishes the activation of the NS2-protease and NS2-3 cleavage und therefore the viral replication (NCP7-5A) in Huh7 cells. Likewise, a double mutation within the binding peptide (Position 41 - 60) at positions 59 (valine) and 60 (tyrosine) leads to a loss of function of Jiv. The introduction of tetraalanines behind certain amino acids in the region of the NS2-

Summary

binding peptide also affects the ability to support the replication of noncp BVDV-1 NCP7-5A. This shows significance for the NS2 binding peptide of Jiv. Jiv90 seems to be the minimal fragment which is able to support the replication of noncp BVDV-1 NCP-5A. This correlates with the fact that the minimal insertion of Jiv found within a cp genome is Jiv90.

Another aim of this work was to find out the molecular basis for the low Jiv amount in Huh7 cells. The quantified amount of Jiv-mRNA in Huh7 cells, detected via real time RT-PCR, was about 50% reduced compared to BVDV susceptible host cells. The protein which is encoded by the Jiv-mRNA of Huh7 cells can support BVDV-replication. The results of this work indicate that the Jiv deficiency of Huh7 cells is based on posttranscriptional level.

The findings of this work about the essential role of the host factor Jiv for certain noncp pestiviruses contribute to the understanding of the molecular basis of pestiviral persistence.

8 Literaturverzeichnis

- Agapov, E. V., Murray, C. L., Frolov, I., Qu, L., Myers, T. M. und Rice, C. M. (2004) Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 78, 2414-25.
- Agashe, V. R. und Hartl, F. U. (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol*, 11, 15-25.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. und Bartenschlager, R. (2008) Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, 4, e1000035.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J. und Becher, P. (2001) Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, 286, 456-65.
- Baker, J. C. (1987) Bovine viral diarrhoea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 190, 1449-1458.
- Baker, R. T., Tobias, J. W. und Varshavsky, A. (1992) Ubiquitin-specific protease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 267, 23364-23375.
- Baroth, M., Orlich, M., Thiel, H. J. und Becher, P. (2000) Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology*, 278, 456-66.
- Becher, P., Meyers, G., Shannon, A. D. und Thiel, H.-J. (1996) Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J Virol*, 70, 2992-8.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. und Thiel, H.-J. (1999) Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 262, 64-71.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., König, M. und Thiel, H.-J. (1997) Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol*, 78, 1357-66.
- Becher, P., Orlich, M. und Thiel, H.-J. (1998) Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol*, 72, 5165-73.
- (2000) Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus result in altered growth characteristics. *J Virol*, 74, 7884-94.
- (2001) RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol*, 75, 6256-64.
- Becher, P., Shannon, A. D., Tautz, N. und Thiel, H. J. (1994) Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, 198, 542-51.
- Behrens, S.-E., Grassmann, C. W., Thiel, H.-J., Meyers, G. und Tautz, N. (1998a) Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol*, 72, 2364-2372.
- Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G. und Tautz, N. (1998b) Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol*, 72, 2364-72.
- Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C. und Zhou, Q. Y. (2001) Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol*, 3, 492-8.
- Bielefeldt Ohmann, H., Ronsholt, L. und Bloch, B. (1987) Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J Gen Virol*, 68 (Pt 7), 1971-82.

- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- Bolin, S. R., McClurkin, A. W., Cutlip, R. C. und Coria, M. F. (1985) Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*, 46, 573-576.
- Bolin, S. R., Moennig, V., Kelso Gourley, N. E. und Ridpath, J. (1988) Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch Virol*, 99, 117-123.
- Brownlie, J., Clarke, M. C. und Howard, C. J. (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec*, 114, 535-536.
- Bruschke, C. J., Weerdmeester, K., Van Oirschot, J. T. und Van Rijn, P. A. (1998) Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol*, 64, 23-32.
- Bukh, J., Apgar, C. L., Govindarajan, S. und Purcell, R. H. (2001) Host range studies of GB virus-B hepatitis agent, the closest relative of hepatitis C virus, in New World monkeys and chimpanzees. *J Med Virol*, 65, 694-7.
- Bush, K. T., Goldberg, A. L. und Nigam, S. K. (1997) Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem*, 272, 9086-92.
- Cheetham, M. E. und Caplan, A. J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones*, 3, 28-36.
- Chen, J., Huang, Y., Wu, H., Ni, X., Cheng, H., Fan, J., Gu, S., Gu, X., Cao, G., Ying, K., Mao, Y., Lu, Y. und Xie, Y. (2003) Molecular cloning and characterization of a novel human J-domain protein gene (HDJ3) from the fetal brain. *J Hum Genet*, 48, 217-21.
- Child, S. J., Miller, M. K. und Geballe, A. P. (1999a) Cell type-dependent and -independent control of HER-2/neu translation. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 201-13.
- (1999b) Translational control by an upstream open reading frame in the HER-2/neu transcript. *J Biol Chem*, 274, 24335-41.
- Chon, S. K., Perez, D. R. und Donis, R. O. (1998) Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 251, 370-82.
- Chu, C. Y. und Rana, T. M. (2006) Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*, 4, e210.
- Collett, M. S., Wiskerchen, M. A., Welniak, E. und Belzer, S. K. (1991) Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch Virol*, Suppl. 3, 19-27.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. und Dubovi, E. J. (1988) Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea infections. *J Virol*, 62, 2823-2827.
- (1990) Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*, 51, 1388-1394.
- Corapi, W. V., French, T. W. und Dubovi, E. J. (1989) Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 63, 3934-43.
- Cornish, T. E., van Olphen, A. L., Cavender, J. L., Edwards, J. M., Jaeger, P. T., Vieyra, L. L., Woodard, L. F., Miller, D. R. und O'Toole, D. (2005) Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and

- buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 17, 110-7.
- de Moerlooze, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberg, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., Renard, A. und Martial, J. A. (1993) Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J Gen Virol*, 74, 1433-1438.
- Deng, R. und Brock, K. V. (1993) 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res*, 21, 1949-1957.
- Dever, T. E. (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108, 545-56.
- Dupre, D. J., Robitaille, M., Richer, M., Ethier, N., Mamarbachi, A. M. und Hebert, T. E. (2007) Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for Ggamma subunits before assembly with Gbeta. *J Biol Chem*, 282, 13703-15.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Rumenapf, T. und Thiel, H.-J. (1996) Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7. *J Virol*, 70, 4131-4135.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. und Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7413-7.
- Fetzer, C., Tews, B. A. und Meyers, G. (2005) The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol*, 79, 11901-13.
- Finley, D., Bartel, B. und Varshavsky, A. (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, 338, 394-401.
- Finley, D., Özkaynak, E. und Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell*, 48, 1035-1046.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- Frolov, I., McBride, M. S. und Rice, C. M. (1998) cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhoea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *Rna*, 4, 1418-35.
- Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 70, 603-47.
- Grummer, B., Bendfeldt, S., Wagner, B. und Greiser-Wilke, I. (2002) Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res*, 90, 143-53.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- Harada, T., Tautz, N. und Thiel, H. J. (2000) E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol*, 74, 9498-506.
- Harlow, E. und Lane, D. (1998): *Using antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Heimann, M., Roman-Sosa, G., Martoglio, B., Thiel, H. J. und Rumenapf, T. (2006) Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol*, 80, 1915-21.

- Heinz, F. X., Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Meyers, G., Rice, C. M. und Thiel, H.-J. (2005): Family Flaviviridae. *Virus Taxonomy—Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego, USA, Academic Press.
- Hershko, A. und Ciechanover, A., Eds. (1992). The ubiquitin system. *Ann Rev Biochem*.
- Hoff, H. S. und Donis, R. O. (1997) Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. *Virus Res*, 49, 101-113.
- Howard, C. J., Brownlie, J. und Clarke, M. C. (1987) Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol*, 19, 13-21.
- Hughes, L. E., Kershaw, G. F. und Shaw, I. G. (1959) "B" or "Border Disease". An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.*, 71, 113-317.
- Hulst, M. M., Westra, D. F., Wensvoort, G. und Moormann, R. J. (1993) Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol*, 67, 5435-42.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S. und McCauley, J. W. (2004) Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol*, 78, 136-45.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Sarisky, R. T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. N. und Behrens, S. E. (2003) Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *Embo J*, 22, 5655-65.
- Isken, O., Grassmann, C. W., Yu, H. und Behrens, S. E. (2004) Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *Rna*, 10, 1637-52.
- Jentsch, S., Ed. (1992). The ubiquitin-conjugating system. *Annu Rev Genet*.
- Jonnalagadda, S., Butt, T. R., Monia, B. P., Mirabelli, C. K., Gotlib, L., Ecker, D. J. und Crooke, S. T. (1989) Multiple (α -NH₂-ubiquitin) protein endoproteases in cells. *J Biol Chem*, 264, 10637-10642.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. und Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309, 1577-81.
- Kao, C. C., Del Vecchio, A. M. und Zong, W. (1999) De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant Flaviviridae RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, 253, 1-7.
- Kawazoe, Y., Nakai, A., Tanabe, M. und Nagata, K. (1998) Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *Eur J Biochem*, 255, 356-62.
- Kelley, W. L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci*, 23, 222-227.
- Kisselev, A. F. und Goldberg, A. L. (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*, 8, 739-58.
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R. und Thiel, H.-J. (1995) Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol*, 69, 6479-6486.
- Kraus, M. H., Popescu, N. C., Amsbaugh, S. C. und King, C. R. (1987) Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human

- mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *Embo J*, 6, 605-10.
- Kümmerer, B., Stoll, D. und Meyers, G. (1998) Bovine viral diarrhea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J Virol*, 72, 4127-4138.
- Kümmerer, B. M. und Meyers, G. (2000) Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol*, 74, 390-400.
- Kümmerer, B. M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. und Meyers, G. (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol*, 77, 117-28.
- Lackner, T. (2004): Untersuchung zur Prozessierung des Nichtstrukturproteins 2-3 (NS2-3) von Pestiviren. *Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Virologie*.
- Lackner, T., Müller, A., König, M., Thiel, H. J. und Tautz, N. (2005) Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol*, 79, 9746-55.
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H. J., Gorbalenya, A. E. und Tautz, N. (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol*, 78, 10765-75.
- Langedijk, J. P. (2002) Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem*, 277, 5308-14.
- Lee, Y. M., Tscherne, D. M., Yun, S. I., Frolov, I. und Rice, C. M. (2005) Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. *J Virol*, 79, 3231-42.
- Liebler, E. M., Waschbusch, J., Pohlenz, J. F., Moennig, V. und Liess, B. (1991) Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol Suppl*, 3, 109-24.
- Liess, B. (1967) Die ätiologische Abgrenzung selbständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im sogenannten "Mucosal Disease Komplex" bei Rindern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 74, 46-49.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Prágal, B. M., McCourt, D. W. und Rice, C. M. (1994) Processing in the Hepatitis C Virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol*, 68, 5063-5073.
- Lindenbach, B. D. und Rice, C. M. (2001): Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*. Knipe, D. M. und Howley, P. M. Philadelphia, New York, Lippincott - Raven Publishers. 1: 991-1042.
- Linnen, J., Wages, J., Zhang-Keck, Z.-Y., Fry, K. E., Krawczynsky, K. Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, J. W.-K., Young, L., Piatak, M., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J.-C., Morris, T., Hyams, K. C., Ismay, S., Lifson, J. D., Hess, G., Fong, S. K. H., Thomas, H., Bradley, D., Margolis, H. und Kim, J. P. (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*, 271, 505-508.
- Lovett, P. S. und Rogers, E. J. (1996) Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiol Rev*, 60, 366-85.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J. und Rüménapf, T. (2004) CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol*, 78, 1792-9.
- Mayer, A. N. und Wilkinson, K. D. (1989) Detection, resolution, and nomenclature of multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochemistry*, 28, 166-172.

- Mayer, D., Hofmann, M. A. und Tratschin, J. D. (2004) Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N(pro) gene. *Vaccine*, 22, 317-28.
- Mayer, D., Thayer, T. M., Hofmann, M. A. und Tratschin, J. D. (2003) Establishment and characterisation of two cDNA-derived strains of classical swine fever virus, one highly virulent and one avirulent. *Virus Res*, 98, 105-16.
- McClurkin, A. W., Bolin, S. R. und Coria, M. F. (1985) Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc*, 186, 568-9.
- McKercher, D. G., Saito, J. K., Crenshaw, G. L. und Bushnell, R. B. (1968) Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhoea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc*, 152, 1621-4.
- Mehta, A., Trotta, C. R. und Peltz, S. W. (2006) Derepression of the Her-2 uORF is mediated by a novel post-transcriptional control mechanism in cancer cells. *Genes Dev*, 20, 939-53.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M. S. und Rice, C. M. (1998) Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J Virol*, 72, 4737-45.
- Meyer, C., Von Freyburg, M., Elbers, K. und Meyers, G. (2002) Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhoea viruses from infectious cDNA clones. *J Virol*, 76, 8494-503.
- Meyers, G., Ege, A., Fetzer, C., von Freyburg, M., Elbers, K., Carr, V., Prentice, H., Charleston, B. und Schurmann, E. M. (2007) Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *J Virol*, 81, 3327-38.
- Meyers, G., Rumenapf, T. und Thiel, H.-J. (1989a) Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, 171, 555-567.
- (1989b) Ubiquitin in a togavirus. *Nature*, 341, 491.
- Meyers, G., Saalmüller, A. und Büttner, M. (1999) Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol*, 73, 10224-35.
- Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1996): Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in virus research*. 47.
- Meyers, G., Thiel, H. J. und Rumenapf, T. (1996) Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. *J Virol*, 70, 1588-95.
- Moennig, V., Frey, H.-R., Liebler, E., Polenz, P. und Liess, B. (1990) Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet Rec*, 127, 200-203.
- Moennig, V. und Plagemann, P. G. W. (1992) The pestiviruses. *Adv Vir Res*, 41, 53-98.
- Morris, D. R. und Geballe, A. P. (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol*, 20, 8635-42.
- Moulin, H. R., Seuberlich, T., Bauhofer, O., Bennett, L. C., Tratschin, J. D., Hofmann, M. A. und Ruggli, N. (2007) Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology*, 365, 376-89.

- Murray, C. L., Marcotrigiano, J. und Rice, C. M. (2008) Bovine viral diarrhoea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol*, 82, 1294-304.
- Nettleton, P. F. (1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech*, 9, 131-50.
- Nettleton, P. F., Gilmour, J. S., Herring, J. A. und Sinclair, J. A. (1992) The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 15, 179-188.
- Njaa, B. L., Clark, E. G., Janzen, E., Ellis, J. A. und Haines, D. M. (2000) Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest*, 12, 393-9.
- Olafson, P., MacCullum, A. D. und Fox, F. H. (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, 36, 205-213.
- Pankraz, A. (2007): Analyse der 3' Nicht Translatierten Region von BVDV Cp7. *Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Virologie*.
- Pankraz, A., Thiel, H. J. und Becher, P. (2005) Essential and nonessential elements in the 3' nontranslated region of Bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 79, 9119-27.
- Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J. und Tijssen, P. (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203, 260-268.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N. D., Siddiqui, A. und Collett, M. S. (1995) Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, 206, 750-754.
- Potgieter, L. N. D., McCracken, M. D., Hopkins, F. M. und Guy, J. S. (1985) Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 151-153.
- Rebhuhn, W. C., French, T. W., Perdrietz, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G. und Karcher, L. F. (1989) Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J Vet Intern Med*, 3, 42-46.
- Rechsteiner, M., Ed. (1987). Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Ann Rev Cell Biol*.
- Redmann, K. L. und Rechsteiner, M. (1989) Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature*, 338, 438-440.
- Reed, K. E., Gorbalenya, A. E. und Rice, C. M. (1998) The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol*, 72, 6199-206.
- Renard, A., Dino, D. und Martial, J. (1987) Vaccines and diagnostics derived from bovine diarrhoea virus. *European patent Application number 86870095.6*, publication number 02.08672.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. und Khvorova, A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22, 326-30.
- Rice, C. M. (1996). *Fields Virology*. Fields, B. N., Knipe, D. M. und Howley, P. M. Philadelphia, New York, Lippincott-Raven: 933-959.
- Ridpath, F. F., Bolin, S. R. und Dubovi, E. J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205, 66-74.
- Ridpath, J. F. und Bolin, S. R. (1995) The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: Detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, 212, 39-46.

- (1997) Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res*, 50, 237-43.
- Ridpath, J. F. und Neill, J. D. (2000) Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea viruses. *J Virol*, 74, 8771-4.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P. J., Haasnoot, P. C., Kieft, J. S., Spaan, W. J. und Lemon, S. M. (2001) The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA*, 7, 585-97.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H. J. und Tautz, N. (2001) A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J Virol*, 75, 9470-82.
- Ruggli, N., Tratschin, J. D., Mittelholzer, C. und 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, 3478-87.
- Ruggli, N., Tratschin, J. D., Schweizer, M., McCullough, K. C., Hofmann, M. A. und Summerfield, A. (2003) Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro). *J Virol*, 77, 7645-54.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1991) Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol*, 65, 589-597.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H. und Thiel, H.-J. (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol*, 67, 3288-3295.
- Sachs, M. S. und Geballe, A. P. (2006) Downstream control of upstream open reading frames. *Genes Dev*, 20, 915-21.
- Sainz, B., Jr. und Chisari, F. V. (2006) Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol*, 80, 10253-7.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. und Thiel, H.-J. (1993) Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science*, 261, 1169-1171.
- Schweizer, M. und Peterhans, E. (1999) Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol*, 80 (Pt 5), 1147-55.
- Shukla, A. K., Reinhart, C. und Michel, H. (2006) Dimethylsulphoxide as a tool to increase functional expression of heterologously produced GPCRs in mammalian cells. *FEBS Lett*, 580, 4261-5.
- Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T. und 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. und 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.
- Sutter, G., Ohlmann, M. und Erfle, V. (1995) Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Letters*, 371, 9-12.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1997) Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol*, 71, 5415-22.

- Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S. und Thiel, H. J. (1999) Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J Virol*, 73, 9422-32.
- Tautz, N., Kaiser, A. und 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, 351-63.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E. J. und Thiel, H.-J. (1996) Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27 nucleotide insertion. *J Virol*, 70, 7851-7858.
- Tautz, N., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1993a) Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology*, 197, 74-85.
- Tautz, N., Meyers, G. und Thiel, H. J. (1993b) Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology*, 197, 74-85.
- Tautz, N., Thiel, H. J., Dubovi, E. J. und Meyers, G. (1994) Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol*, 68, 3289-97.
- Tellinghuisen, T. L., Paulson, M. S. und Rice, C. M. (2006) The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus contains an essential zinc-binding site similar to that of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol*, 80, 7450-8.
- Thiel, H.-J., Plagemann, P. G. W. und Moennig, V. (1996): Pestiviruses. *Fields Virology*. Fields, B. N., Knipe, D. M. und Howley, P. M. Philadelphia, New York, Lippincott - Raven Publishers. 1: 1059-1073.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T. und Meyers, G. (1991) Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*, 65, 4705-4712.
- Tratschin, J. D., Moser, C., Ruggli, N. und Hofmann, M. A. (1998) Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture. *J Virol*, 72, 7681-4.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. und Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, 66, 1476-83.
- van Oirschot, J. T. (1992). *Diseases of Swine*. Lerman, Iowa State University Press, Ames, IA: 274-285.
- van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. und Moormann, R. (1991) Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol*, 65, 2761-2765.
- Vassilev, V. B., Collett, M. S. und 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.
- Vassilev, V. B. und Donis, R. O. (2000) Bovine viral diarrhoea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res*, 69, 95-107.
- Vernimmen, D., Gueders, M., Pisvin, S., Delvenne, P. und Winkler, R. (2003) Different mechanisms are implicated in ERBB2 gene overexpression in breast and in other cancers. *Br J Cancer*, 89, 899-906.
- Vilcek, S. (2001) Identification of pestiviruses contaminating cell lines and fetal calf sera. *Acta Virol*, 45, 81-6.
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., Greiser-Wilke, I. und Paton, D. (2004) Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet Res*, 35, 609-15.

- Vilcek, S., Greiser-Wilke, I., Nettleton, P. und Paton, D. J. (2000) Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet Microbiol*, 77, 129-36.
- Vilela, C. und McCarthy, J. E. (2003) Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Mol Microbiol*, 49, 859-67.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D. und Lithgow, T. (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep*, 5, 567-71.
- Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmuller, A. und Thiel, H. J. (1999) Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J Gen Virol*, 80 (Pt 5), 1157-65.
- Weiland, S., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. und Thiel, H.-J. (1992) A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol*, 66, 3677-3682.
- Weiland, S., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1990) Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J Virol*, 64, 3563-3569.
- Wensvoort, G. und Terpstra, C. (1985) [Swine fever: a changing clinical picture]. *Tijdschr Diergeneeskd*, 110, 263-9.
- Wilhelmsen, C. L., Bolin, S. R., Ridpath, J. F., Cheville, N. F. und Kluge, J. P. (1991) Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am J Vet Res*, 52, 269-75.
- Windisch, J. M., Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1996) RNase of Classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol*, 70, 352-358.
- Wiskerchen, M., Belzer, S. K. und 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.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S. und 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.
- Yu, H., Grassmann, C. W. und 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, 3638-48.
- Yu, J. H., Yang, W. H., Gulick, T., Bloch, K. D. und Bloch, D. B. (2005) Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *Rna*, 11, 1795-802.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M. C. und McCauley, J. W. (1996) Cell death induced by cytopathic bovine diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol*, 77, 1677-1681.
- Zhong, W., Gutshall, L. L. und 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, 9365-9.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz angefertigt. Diese Studie wurde im Rahmen des Teilprojektes B4 „Zytopathogenität von Pestiviren“ des Sonderforschungsbereiches 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ durch die DFG gefördert.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Norbert Tautz für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe dieses spannende Thema bearbeiten zu dürfen und seine hervorragende Betreuung. Seine Diskussionsbereitschaft, die konstruktive Kritik und die gewährte Freiheit im Labor machten ein besonderes Arbeitsklima aus. Vielen Dank auch für die sehr rasche Korrektur meiner Arbeit!

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel möchte ich danken, für seine Unterstützung und sehr wertvollen Hilfen. Auch vielen Dank für die Möglichkeit am Institut meine Arbeiten fortsetzen zu dürfen, nachdem Norbert seinen Ruf in Lübeck bekommen hat. Und zuletzt noch für all die schönen Nikolaustage.

Dr. Matthias König für sein stets offenes Ohr und die Unterstützung in allen Belangen.

Prof. Dr. Paul Becher für seine unermüdliche Bereitschaft mich mit „Viren zu versorgen“ und Antworten auf all meine Fragen zu geben!

Dr. Alexandra Müller möchte ich für die Einarbeitung, weitergegebene Tipps und Tricks im Labor & Diskussionen rund um die Pestiviren danken. Sie hat mir den Anfang sehr erleichtert.

Barbara Bank-Wolf, Jessica & Gleyder Roman-Sosa und Stefanie Deike für ihre Freundschaft. Babsi für die nie endende Geduld, die wertvollen Hilfen und für das

Danksagung

schnelle Korrekturlesen, Jessica für die schlaun Tricks rund ums Klonieren und die Generalproben meiner Seminare, nicht zu vergessen die kleinen Mittagspausen an der Lahn!

Meinen Labormitstreitern aus dem Labor 211/213:

Besonderer Dank an Bettina Schmidt, die mir in der Endphase den Rücken freigehalten hat. Vera Schregel, Erik Lattwein und Lars Krüger für eine sehr lustige Zeit im Labor. Sylvaine Jacobi, die sich stets um die anfallenden Dinge des Laboralltags gekümmert hat.

Alexandra Schwarz und noch mal dank an Vera Schregel, die mich in die Konfokale Laserscanningmikroskopie eingearbeitet haben. Nicht zu vergessen die lustigen Momente im „Dunkeln“.

Den anderen Mitarbeitern des Institutes für Ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

Meiner lieben Freundin Caroline Lüken für die schöne Zeit - mit ihr habe ich „das Laufen“ und auch „das Stolpern“ im Labor erlernt. Vielen Dank auch für die stets bereitgehaltene Hand beim wieder „Hochkommen“.

Meinem Tim für sein Verständnis, seine unermüdliche Hilfe bei meinen technischen Fragen, für die wichtigen „Backup“-Erinnerungen, die lebhaften Diskussionen rund um das Komma und den immer gewährten Zuspruch am Freitagabend...

Und zu guter Letzt meiner Familie, weil auf sie immer Verlass ist. Ich danke Euch von ganzem Herzen für die Unterstützung und euren Rückhalt.

édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5360-5



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 3 6 0 4