

**Identifizierung eines zellulären Rezeptors
für das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV):
Reinigung, Klonierung und Expression
des bovinen CD46 (MCP)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Karin Maurer
aus Köln

2002

Die mündliche Prüfung fand am 19.08.2002 statt

Vorsitzender:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Prof. Dr. Jürgen Mayer

Prof. Dr. Manfred Kröger

Prof. Dr. Till Rümenapf

Prof. Dr. Albrecht Bindereif

Für meine Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Till Rümenapf am Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Till Rümenapf für die Überlassung des interessanten Themas, für seine Diskussionsbereitschaft sowie die Unterstützung und die Ermutigung bei allen aufgetretenen Fragestellungen,

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel, der als Leiter des Instituts für Virologie die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat und stets großes Interesse am Fortgang der Experimente gezeigt hat,

Prof. Dr. Manfred Kröger, der freundlicherweise die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und damit meine Dissertation im Fachbereich Biologie ermöglicht hat,

Karin Müller und Manuela Heimann für hervorragende technische Unterstützung,

Dr. Kristina Kluge, Yvonne Hausmann und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die freundschaftliche Zusammenarbeit,

Dr. Beate Kümmerer und meinem Vater für mühevollen Stunden beim Durchlesen verschiedener Entwürfe und für vielerlei kompetente Hinweise,

Familie Heider, bei der Lorenz in seinen ersten Lebensjahren ein zweites Zuhause gefunden hat,

... und Frank!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pestiviren	1
1.2	Infektion von Wirtszellen mit Pestiviren	4
1.3	Virusrezeptoren	5
1.4	Experimentelle Ansätze zur Identifizierung von Virusrezeptoren	9
1.5	Zelluläre Rezeptoren von Pestiviren, Stand der Forschung	10
1.6	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Zellen und Virusstämme	15
2.1.1.1	Zellen	15
2.1.1.1.1	Zelllinien	15
2.1.1.1.2	Sekundäre Zellen aus bovinen Föten	15
2.1.1.2	Virusstämme	15
2.1.2	Bovine Organe und Milch	16
2.1.3	Monoklonale Antikörper und Antiseren	16
2.1.3.1	Monoklonale Antikörper	16
2.1.3.2	Antiseren	16
2.1.4	Reagentien für die Zellkultur	16
2.1.4.1	Medien	16
2.1.4.2	Sonstige Lösungen	17
2.1.5	Plasmide und Bakterien	17
2.1.5.1	Plasmide	17
2.1.5.2	Bakterien	18
2.1.6	Nährmedien für Prokaryoten	18
2.1.7	Synthetische Oligonukleotide	18
2.1.8	Chemikalien	18
2.1.9	Enzyme und Kits	19
2.1.10	Geräte	20

2.1.11	Verbrauchsmaterialien	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Gewebekultur	21
2.2.1.1	Kultivierung von Zellen	21
2.1.1.2	Fixierung und immunhistochemischer Nachweis von Antigen auf Zellen	21
2.2.1.2.1	Fixierung	21
2.2.1.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Antigen	21
2.2.1.3	Biotinylierung von Zellen	22
2.2.1.4	Zellyse	22
2.2.1.5	Virustitration und Titerberechnung	22
2.2.1.6	Hemmung der Infektion durch mAk	23
2.2.1.7	Transfektion von Zellen	23
2.2.1.7.1	Transiente Transfektion mit Hilfe von Vaccinia Virus	23
2.2.1.7.2	Stabile Transfektion	24
2.2.1.8	Herstellung stabiler Zelllinien	24
2.2.1.9	Einfrieren von Zellen	24
2.2.2	Proteinchemische Methoden	24
2.2.2.1	Typisierung von monoklonalen Antikörpern (mAk)	24
2.2.2.2	Reinigung von mAk	25
2.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Mikroassay)	25
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.2.5	„Western blot“ Analyse	26
2.2.2.6	Immunpräzipitation	27
2.2.2.7	Deglykosylierung	28
2.2.2.8	Nachweis von membranständigen Proteinen durch Phasentrennung	28
2.2.2.9	Herstellung von Immunitätsmatrices	28
2.2.2.9.1	Immobilisierung von IgG2a Molekülen an ProteinA- und ProteinG-Sepharose	28
2.2.2.9.2	Immobilisierung von IgG1 Molekülen an CNBr-aktivierte Sepharose	29
2.2.2.10	Überprüfung der Antigen-Bindungsfähigkeit der Affinitätsmatrices	29
2.2.2.11	Ermittlung der Elutionsbedingungen	30
2.2.3	Mikrobiologische Methoden	30
2.2.3.1	Anzucht von Bakterien	30

2.2.3.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	30
2.2.3.3	Transformation von Plasmid DNA in kompetente Bakterien	31
2.2.4	Standard Nukleinsäuretechniken	31
2.2.4.1	Präparation von Nukleinsäuren	31
2.2.4.1.1	DNA-Präparation	31
2.2.4.1.2	RNA-Präparation	32
2.2.4.2	Fällungen	33
2.2.4.2.1	EtOH-Fällung von DNA	33
2.2.4.2.2	EtOH-Fällung von RNA	33
2.2.4.2.3	Isopropanolfällung von DNA	33
2.2.4.3	Phenol/Chloroform Extraktion von DNA und RNA	33
2.2.4.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	33
2.2.4.5	Spaltungen von DNA mit Restriktionsenzymen	34
2.2.4.6	Herstellung glatter Enden an DNA Molekülen	34
2.2.4.7	Dephosphorylierung	34
2.2.4.8	Ligation von DNA Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	34
2.2.4.9	Radioaktive Markierung von DNA durch „Nick-Translation“	35
2.2.4.10	Gelfiltration von Nukleinsäuren	35
2.2.4.11	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	35
2.2.4.11.1	Auftrennung von DNA im Agarosegel	35
2.2.4.11.2	Isolierung von DNA aus dem Agarosegel	36
2.2.4.11.3	Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel	36
2.2.4.12	„Northern blot“ Analyse	37
2.2.5	Weitere Nukleinsäuretechniken	38
2.2.5.1	Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase (RT-PCR)	38
2.2.5.2	Durchsuchung („screening“) einer cDNA Bank	38
2.2.5.3	Sequenzierung von Plasmid DNA	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Charakterisierung von Antikörpern und Antigenen	43
3.1.1	Charakterisierung der Antikörper	43
3.1.1.1	Typisierung und Reinigung	43
2.1.1.2	Infektionshemmung durch mAk 17, mAk 26 und mAk 27	43

3.1.2	Charakterisierung der Antigene	50
3.1.2.1	Darstellung der Antigene mittels Immunpräzipitation und Analyse auf N-Glykosylierung	50
3.1.2.2	Analyse der Antigene bezüglich ihrer Verankerung in der Zytoplasmamembran	53
3.1.2.3	Darstellung der Antigene in der „Western blot“ Analyse	55
3.1.2.4	Analyse verschiedener Zelllinien und Gewebe auf die Expression der Antigene	57
3.2	Isolation der mutmaßlichen Rezeptorproteine und Bestimmung interner Aminosäuresequenzen	61
3.2.1	Extraktion der Antigene aus MDBK Zellen und Kalbsthymus	61
3.2.2	Immunaффinitätschromatographie	65
3.2.2.1	Säulenmaterial	65
3.2.2.2	Säulenbeladung	65
3.2.2.3	Waschschritte	67
3.2.2.4	Elution der Antigene	67
3.2.2.5	Dialyse der Elutionsfraktionen	68
3.2.2.6	Konzentrierung und Bestimmung der Ausbeute	69
3.2.2.7	Nachweis des Reinigungserfolgs	69
3.2.3	Bestimmung interner Aminosäuresequenzen	72
3.2.3.1	Sequenzierung	72
3.2.3.2	Datenbanksuche	73
3.3	Literaturrecherche	75
3.3.1	Eigenschaften des humanen CD46	75
3.3.1.1	Vorkommen, Funktion und Struktur	75
3.3.1.2	Spleissvarianten	76
3.3.2	Homologien des CD46 verschiedener Spezies	77
3.3.3	Übereinstimmungen des gereinigten bovinen Proteins mit CD46	78
3.4	Identifizierung des bovinen CD46	80
3.4.1	Klonierung und Sequenzierung des Gens für das bovine CD46	80
3.4.1.1	„Northern blot“ Analyse	81

3.4.1.2	Durchsuchung einer bovinen cDNA Bank mit heterologer Sonde	84
3.4.1.3	Analyse von Teilsequenzen des Gens für das bovine CD46	84
3.4.1.4	Durchsuchung einer bovinen cDNA Bank mit homologer Sonde	86
3.4.2	Expression des bovinen CD46 im T7-Vaccinia-Expressionssystem	91
3.5	Heterologe Expression des bovinen CD46 und funktionelle Untersuchungen	93
3.5.1	Herstellung stabiler Zelllinien	93
3.5.2	Steigerung der Infektionseffizienz von BVDV NADL durch Expression des bovinen CD46	94
4	Diskussion	100
5	Zusammenfassung	117
6	Summary	119
7	Literaturverzeichnis	121
8	Anhang	133

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AEC	Aminoethylcarbazon
anti-id	anti-idiotypische(r) Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinolindicarbonsäure
BDV	„border disease virus“
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BVDV	„bovine viral diarrhea virus“
°C	Grad Celsius
CAR	„coxsackie virus-adenovirus receptor“
CD	„cell differentiation number“
cm	Zentimeter
CIP	alkalische Phosphatase
CR	Komplement Rezeptor
CRIB	„cells resistant to BVDV infection“
CSFV	„classical swine fever virus“
C-Terminus	Carboxyterminus
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMP	Dimethylpimelimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykane
g	Gramm
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HCMV	„human cytomegalovirus“
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus

HIV	„human immunodeficiency virus“
HSV	Herpes Simplex Virus
HVEM	„herpes virus entry mediator“
ICAM	„intracellular adhesion molecule“
IE	Infektiöse Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
LDL	„low density lipoprotein“
LDLR	„low density lipoprotein receptor“
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	Milli
μ	Mikro
mAk	monoklonale(r) Antikörper
MCP	„membrane cofactor protein“
MCS	„multiple cloning site“
MD	„mucosal disease“
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
n	Nano
NaDOC	Natriumdesoxycholat
NGF	„nerve growth factor“
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoterminus
nzp	nicht zytopathogen
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
p	Pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	„plaque forming unit“
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PO	Meerrettich Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCA	„regulators of complement activation“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Polymerasekettenreaktion
SAPO	Streptavidin gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase
SCR	„short consensus repeat“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SLAM	„signalling lymphocyte-activation molecule“

Ss	„single strand“
SSC	„standard sodium citrate“
STP-Region	Serin/Threonin/Prolin-reiche Region
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	„tissue necrosis factor“
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
TX-114	Triton X-114
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
U-Region	Region unbekannter Funktion
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
zp	zytopathogen

1 Einleitung

1.1 Pestiviren

Das Virus der bovinen viralen Diarrhöe („bovine viral diarrhea virus“, BVDV) wird zusammen mit dem Virus der klassischen Schweinepest („classical swine fever virus“, CSFV) und dem „border disease“ Virus (BDV) dem Genus Pestivirus zugeordnet. Pestiviren werden in vier Genotypen eingeteilt: BVDV I, BVDV II, CSFV und BDV. Zusätzlich gibt es Pestivirus Isolate, die keinem dieser Genotypen zugeordnet werden können (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999). Aufgrund unterschiedlichen Verhaltens bei der Infektion kultivierter Zellen lassen sich bei Pestiviren zwei Phänotypen unterscheiden, die als zytopathogene (zp) bzw. nicht-zytopathogene (nzp) Biotypen bezeichnet werden. Zp Pestiviren bewirken während ihrer Vermehrung eine Lyse der Zellen, während die Replikation von nzp Viren keine sichtbare Veränderung der Wirtszellen hervorruft (Baker, 1987). Molekulare Untersuchungen insbesondere zur Genomorganisation und Genexpressionsstrategie führten zur Eingliederung der Pestiviren in die Familie der *Flaviviridae*, der auch die Genera Flavivirus und Hepatitis C Virus (HCV) angehören (Wengler, 1991).

Pestiviren sind kleine behüllte RNA Viren. Der Durchmesser der Viruspartikel beträgt 40 bis 60 nm (Thiel et al., 1996). Ein etwa 30 nm großes Nukleokapsid mit vermutlich ikosaedrischer Struktur wurde beschrieben (Horzinek et al., 1967). Es ist umgeben von einer Lipidhülle zellulären Ursprungs, in die die viralen Strukturproteine eingelagert sind. Das Genom der Pestiviren besteht aus einzelsträngiger RNA positiver Polarität, deren Länge 12,3 – 12,5 kb beträgt (Renard et al., 1987; Collett et al., 1988a; Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990; Deng & Brock, 1992). Nicht kodierende Regionen, die im 5´-Bereich etwa 380 und im 3´-Bereich etwa 200 Nukleotide enthalten, flankieren ein einziges offenes Leseraster, das für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren kodiert (Collett et al., 1988a; Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990; Deng & Brock, 1992).

Durch ko- und posttranslationale Spaltung des Polyproteins entstehen die reifen Virusproteine. An der Prozessierung sind sowohl zelluläre als auch viruskodierte Proteasen beteiligt (Collett et al., 1988b, 1988c, 1991; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Unmittelbar am N-Terminus des Polyproteins liegt das Nichtstrukturprotein N^{pro} (pro: „protease“), das sich autokatalytisch aus dem Polyprotein abspaltet (Stark et al., 1993;

Rümenapf et al., 1997). Es folgen im Polyprotein die Strukturproteine C, E^{rns} (rns: „ribonuclease, soluble“, E1 und E2, die am Aufbau des Viruspartikels beteiligt sind. Das Kapsidprotein C ist ein basisches Protein von etwa 14 kD und ist vermutlich am Aufbau des Nukleokapsids beteiligt. In der Virushülle befinden sich drei viruskodierte Glykoproteine E^{rns}, E1 und E2. E1 und E2 besitzen am C-Terminus Membrananker (van Zijl et al., 1991; Rümenapf et al., 1993), die Art der Assoziation von E^{rns} an das Virion ist dagegen noch ungeklärt. Alle drei Glykoproteine bilden Komplexe durch die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken. Sowohl in Virionen als auch in infizierten Zellen konnten ein E^{rns} Homodimer, ein E1-E2 Heterodimer und ein E2 Homodimer nachgewiesen werden (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991). Das E^{rns} Homodimer wird außerdem von infizierten Kulturzellen in den Überstand sezerniert. E^{rns} zeigt überraschenderweise Sequenzhomologien zu fungalen und pflanzlichen Ribonukleasen und besitzt tatsächlich eine entsprechende enzymatische Aktivität (Schneider et al., 1993). Im Verlauf einer Infektion induzieren die beiden Glykoproteine E^{rns} und E2 neutralisierende Antikörper (Bolin, 1988; Donis et al., 1988; Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1992).

Im Anschluss an die Virusstrukturproteine befinden sich im pestiviralen Polyprotein die Nichtstrukturproteine p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. P7 kommt als einzelnes Peptid, aber auch als ungespaltenes E2-p7 in infizierten Zellen vor; seine Funktion ist unbekannt (Elbers et al., 1996). Das NS2-3 Protein wird bei vielen Pestiviren teilweise in NS2 und NS3 gespalten (Collett et al., 1988b; Thiel et al., 1991; Meyers et al., 1991, 1992; Becher et al., 1994, 1996). Bei BVD Viren korreliert das Vorkommen von gespaltenem NS3 strikt mit dem zp Biotyp (Donis & Dubovi, 1987; Pocock et al., 1987). NS3 repräsentiert einerseits eine virale Serinprotease, die an der Reifung von NS4A, NS4B, NS5A und NS5B beteiligt ist (Wiskerchen & Collett, 1991). Andererseits konnte für NS3 auch eine NTPase- und eine Helikaseaktivität nachgewiesen werden (Tamura et al., 1993; Warrener & Collett, 1995). NS4A dient als Kofaktor für die NS3-Protease (Xu et al., 1997), die Funktion von NS4B ist bislang nicht bekannt. Als weiteres Nichtstrukturprotein folgt im Polyprotein NS5, das in ein NS5A und ein NS5B Protein gespalten wird (Collett et al., 1991). NS5B ist die RNA-abhängige RNA Polymerase (Steffens et al., 1999).

Alle von Pestiviren hervorgerufenen Erkrankungen betreffen ausschließlich Paarhufer (*Artiodactyla*). BVD Viren rufen in erster Linie Erkrankungen von Rindern hervor, sind aber auch bei Schafen, Ziegen und einigen wildlebenden Wiederkäuern aufzufinden. Ebenso wie die klassische Schweinepest verursacht BVDV wirtschaftliche Schäden in der Nutztierhaltung.

Das BVD Virus wurde erstmals 1946 in den USA beschrieben (Olafson et al., 1946) und ist heute weltweit verbreitet. Seroepidemiologische Untersuchungen zeigen, dass je nach Region 60 – 90% der Rinderbestände gegen BVDV gerichtete Antikörper aufweisen (Moennig & Plagemann, 1992). Die klinischen Symptome der BVDV Infektion sind sehr variabel. Akute Infektionen von Jungtieren mit Vertretern des Genotyps BVDV I, den sogenannten klassischen BVD Viren, gehen einher mit transienter Leukopenie, Fieber und Diarrhöe, aber auch einer Erkrankung der Atemwege. Die größten wirtschaftlichen Schäden werden jedoch durch intrauterine Erkrankungen von Föten verursacht, die zu Aborten, Totgeburten oder der Geburt von missgebildeten Kälbern führen (Casaro et al., 1971; Kahrs, 1973; Harkness et al., 1978; Done et al., 1980; Baker, 1987). Oft verläuft die Erkrankung subklinisch, so dass die Mehrzahl der BVDV Infektionen vom Tierhalter unbemerkt bleibt (Thiel et al., 1996). Sporadisch tritt als Folge einer BVDV Infektion die sogenannte „mucosal disease“ (MD) in Erscheinung, die von starken Läsionen an den Schleimhäuten im Maul-, Rachen- und Darmbereich gekennzeichnet ist und letal verläuft (Liess et al., 1974). Voraussetzung für die komplexe Pathogenese der MD ist die diaplazentare Infektion eines Fötus mit einem nzp BVDV Stamm im ersten Drittel der Trächtigkeit (Liess et al., 1984). Es kommt zur Geburt immuntoleranter, persistent infizierter Kälber, die größere Mengen an Virus ausscheiden und somit eine beträchtliche Infektionsgefahr für andere Tiere darstellen. Die tödliche MD tritt in der Regel innerhalb des ersten Lebensjahres auf. Interessanterweise lässt sich aus einem an MD erkrankten Tier neben dem persistierenden nzp Virus stets auch ein zp Virus isolieren. Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass das zp Virus in der Regel aus dem nzp Virus hervorgeht (Meyers & Thiel, 1996). Virusinfektionen mit Vertretern des Genotyps BVDV II traten mit schweren klinischen Symptomen und hoher Letalität erstmals um 1989 in Nordamerika auf. Diese Erkrankung, die besonders Kälber betraf, zeichnete sich durch schwere Thrombozytopenie und Blutungen der Schleimhäute sowie verschiedener innerer Organe aus (Rebhuhn et al., 1989; Corapi et al., 1989; Ridpath et al., 1994; Pellerin et al., 1994).

Ein ähnliches Krankheitsbild ist kennzeichnend für die klassische Schweinepest. Neben Leukopenie und hohem Fieber treten typische hämorrhagische Läsionen der Haut und der inneren Organe auf. Die Ausprägung der klinischen Symptome und die Mortalitätsquote variiert je nach Virulenz des entsprechenden Virusstamms (Thiel et al., 1996).

Infektionen von Schafen und Ziegen mit BDV ähneln in vielen Aspekten denen des Rindes mit BVDV. Akute Erkrankungen sind subklinisch oder rufen nur milde Symptome hervor (Shaw et al., 1967; Vantsis et al., 1979), während intrauterine Infektionen zum Abort

des Fötus, zu Missbildungen oder zur Geburt von lebensschwachen, persistent infizierten Lämmern führen können (Barlow, 1980). Auch wurde analog zu der BVDV Infektion des Rindes ein der MD ähnliches Syndrom im Zusammenhang mit persistenten Infektionen beschrieben (Barlow et al., 1983; Nettleton et al., 1992).

1.2 Infektion von Wirtszellen mit Pestiviren

Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und sind für ihre Vermehrung darauf angewiesen, die Stoffwechselwege einer lebenden Zelle für die Replikation ihres Genoms und die Synthese ihrer Proteine zu rekrutieren. Der entscheidende Schritt bei der Infektion einer Wirtszelle besteht darin, das virale Genom an den Ort der Replikation (Zytoplasma, Nukleus) zu bringen. Bei praktisch allen Viren lässt sich der Infektionsvorgang in mindestens sechs Stadien einteilen: Adsorption, Penetration, Freisetzung des viralen Genoms („uncoating“), Replikation und Biosynthese der viralen Proteine, Morphogenese („assembly“) und Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel (Knipe, 1996). Adsorption und Penetration werden als frühe Ereignisse einer Virusinfektion bezeichnet. Während der Adsorption kommt es zu spezifischen Interaktionen zwischen viralen und zellulären Strukturen, die die Bindung des Viruspartikels an die Oberfläche der Zielzelle zur Folge haben. Das zelluläre Oberflächenmolekül, an das ein bestimmtes Virus bindet, wird als Virusrezeptor bezeichnet (Marsh & Helenius, 1989; White & Littman, 1989). Virusrezeptoren werden nicht nur für die Adsorption rekrutiert, sondern durch sie wird auch die Penetration, d. h. der Durchtritt des Virus durch die Zytoplasmamembran, initiiert (Tardieu et al., 1982). Bei behüllten Viren, bei denen das Nukleokapsid mit einer Lipidmembran umgeben ist, ist die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran essentiell für die Infektion. Diese Fusion erfolgt entweder an der Zelloberfläche oder an internen Membranen nach Endozytose äußerlich gebundener Viruspartikel. Über den Eintritt von Pestiviren in Wirtszellen ist bislang wenig bekannt. Es gibt aber vorläufige experimentelle Hinweise darauf, dass die Penetration nach einer rezeptorvermittelten Endozytose erfolgt. Die gesamte Virusvermehrung findet im Zytoplasma statt. Die Ausschleusung reifer Viruspartikel ist bislang nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird die Exozytose von Partikeln, die durch Sprossung an internen Membranen entstehen (Gray & Nettleton, 1987; Bielefeldt Ohmann & Bloch, 1982).

1.3 Virusrezeptoren

Da der Virusrezeptor das erste zelluläre Molekül darstellt, mit dem ein Virus in Kontakt tritt, kommt ihm herausragende Bedeutung für Wirtsspezifität und Zell- bzw. Organotropismus zu. Die Definition von Tardieu et al. (1982) beinhaltet die Beteiligung eines Virusrezeptors sowohl an der reinen Bindung des Virus an die Zelloberfläche als auch an der Vermittlung der Infektion, die durch eine biologisch relevante Zellantwort (Oberflächenfusion, rezeptorvermittelte Endozytose) eingeleitet wird. Aufgrund der vielen Daten, die mittlerweile bezüglich der Invasionsmechanismen verschiedenster Virussysteme veröffentlicht worden sind, ist es fraglich geworden, von „dem Virusrezeptor“ als einem einzelnen Molekül zu sprechen. Bei einer wachsenden Anzahl von Viren scheint es sich eher um ein Zusammenspiel mehrerer zellulärer Komponenten zu handeln, die für die Infizierbarkeit von Zellen verantwortlich sind. Virusrezeptoren werden durch die unterschiedlichsten Strukturen der zellulären Oberfläche repräsentiert. Hierzu zählen neben verschiedenen Oberflächenproteinen auch nicht-proteinartige Oberflächenstrukturen wie Sialinsäure und Glykolipide (Übersicht in Wimmer, 1994). Eine Auswahl an bislang beschriebenen Virusrezeptoren ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Das breite Wirtsspektrum einiger Viren kann unter Anderem darauf zurückgeführt werden, dass sich die als Rezeptoren identifizierten Proteine unterschiedlicher Spezies strukturell kaum voneinander unterscheiden. Ein Beispiel hierfür ist das Sindbis Virus, das den unter Wirbeltieren hoch konservierten „high affinity“ Lamininrezeptor für den Eintritt in die Wirtszelle benutzt (Wang et al, 1992). Das Masernvirus hingegen kann nur Primaten infizieren. Vor einiger Zeit wurde für verschiedene Masernvirusstämme das humane „membrane cofactor protein“ (MCP), das auch als Zelldifferenzierungsmarker (CD46) bekannt ist, als Virusrezeptor beschrieben (Naniche et al., 1993; Dörig et al., 1993). Analog zu der Speziesspezifität des Masernvirus ist CD46 nur innerhalb der Primaten konserviert und kann daher für die Speziesspezifität verantwortlich gemacht werden (Dörig et al., 1994). Da jedoch die überwiegende Zahl klinischer Isolate des Masernvirus nicht auf CD46 als Rezeptor angewiesen sind (Buckland & Wild, 1997; Bartz et al., 1998), blieb die Frage nach einem zweiten Rezeptor bestehen. Unlängst wurde das „signalling lymphocyte-activation molecule“ (SLAM, auch bezeichnet als CDw150) als Rezeptor für alle untersuchten klinischen Isolate des Masernvirus beschrieben (Tatsuo et al., 2000; Erlenhoefer et al., 2001). Die Expression von SLAM auf T- und B-Zellen steht sowohl mit dem Zelltropismus als auch der Pathogenese der Maserninfektion (Lymphopenie, Immunsuppression) im Einklang

(Yanagi, 2001). Wie CD46 ist auch SLAM zwischen den Spezies nicht hoch konserviert (Castro et al., 1999).

Auch in anderen Virussystemen scheint ein ausgeprägter Zelltropismus auf die Expression spezifischer Rezeptoren zurückzuführen zu sein. Die Vermehrungsfähigkeit des Epstein-Barr Virus (EBV) ist in erster Linie auf B-Lymphozyten beschränkt. Die Infektion wird durch die Bindung an den nur auf B-Lymphozyten exprimierten Komplement Rezeptor 2 (CR2, auch bezeichnet als CD21) initiiert (Nemerov et al., 1986). Hier werden ebenfalls weitere Rezeptoren vermutet, da einerseits auch CR2-negative T-Zellen und Epithelzellen infiziert werden können (Sauvageau et al., 1990; Greenspan et al., 1985), andererseits die Transfektion nicht infizierbarer Zellen mit CR2 für eine effektive Infektion mit EBV nicht ausreicht (Ahearn et al., 1988; Carel et al., 1989). Bei der Infektion mit dem Retrovirus „human immunodeficiency virus“ (HIV) sind ausgesprochen komplexe Mechanismen beteiligt. Hier wurde schon sehr früh CD4, ein Vertreter der Immunoglobulin Superfamilie, als der primäre Rezeptor identifiziert (Klatzmann et al., 1984). Bis heute konnten eine Reihe von Chemokin-Rezeptoren, die zu einer Familie von G-Protein gekoppelten Proteinen mit sieben Transmembranregionen gehören, als Korezeptoren für die Infektion mit HIV identifiziert werden. Die Benutzung der verschiedenen Korezeptoren ist abhängig vom Virusstamm, und kann sich im Verlauf einer fortschreitenden Infektion ändern (Übersicht in: Berger et al., 1999). Auch gibt es Informationen über die Beteiligung von nicht-proteinartigen Zelloberflächenstrukturen an der Infektion mit HIV (Harouse et al., 1991; Roderiquez et al., 1995).

Am Beispiel von CD4, dem primären Rezeptor für HIV, wird offensichtlich, dass das gleiche zelluläre Molekül von vollkommen unterschiedlichen Viren als Rezeptor benutzt werden kann. Auch das humane Herpesvirus 7 (HHV-7), ein DNA-Virus, benötigt für die Infektion CD4 (Lusso et al., 1994). Desgleichen dient CD46, das eine Rolle bei der Masernvirusinfektion spielt (siehe oben), auch anderen Krankheitserregern als Eintrittspforte in die Zielzelle. Hierzu gehören neben dem humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) (Santoro et al., 1999) auch Mikroorganismen wie Neisserien (Kallstrom et al., 1997) und Streptokokken (Okada et al., 1995). Im Gegensatz dazu benutzen mitunter auch sehr nah verwandte Viren unterschiedliche Zelloberflächenmoleküle als Rezeptoren. Dies gilt beispielsweise für Rhinoviren. Das Genus Rhinovirus gehört zu der Familie *Picornaviridae* und enthält etwa 100 verschiedene Serotypen. Etwa 90% der Serotypen benutzen das „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) als zellulären Rezeptor und werden aus diesem Grund als „major receptor group“ Rhinoviren bezeichnet (Greve et al., 1989). „Minor receptor group“

Rhinoviren dagegen interagieren mit ihren Wirtszellen über einen „low density lipoprotein receptor“ (LDLR) (Hofer et al., 1994), während ein einziger Serotyp der Rhinoviren, HRV87, weder an ICAM-1 noch an LDLR, sondern an einen dritten Virusrezeptor bindet (Uncapher et al., 1991).

Eine besondere Rolle bei der Invasion von Viren in ihre Wirtszellen zeichnet sich in den letzten Jahren für nicht-proteinartige, geladene Zelloberflächenmoleküle ab. Infektionsrelevante Interaktionen mit Glykosaminoglykanen (GAG, z.B. Heparansulfat, Chondroitinsulfat), die auf der Oberfläche praktisch aller eukaryotischer Zellen vorhanden sind, wurden für viele Virussysteme beschrieben (WuDunn & Spear, 1989; Harouse et al., 1991; Compton et al., 1992; Roderiquez et al., 1995; Jackson et al., 1996; Byrnes et al., 1998; Chung et al., 1998; Iqbal et al., 2000; Akula et al., 2001). Interessanterweise konnten für fast alle diese Viren auch Proteine als Virusrezeptoren identifiziert werden. Aufgrund neuer Untersuchungen wird bei einigen Virussystemen vermutet, dass die Bindung an GAG nur nach Passage auf kultivierten Zellen auftritt und keine herausragende Rolle bei der Infektion *in vivo* spielt (Sa-Carvalho et al., 1997; Klimstra et al., 1998; Hulst et al., 2000, 2001).

Tab. 1: Zelluläre Rezeptoren verschiedener Viren^{a)}

Virusfamilie	Virus	Rezeptor	Referenz
<i>Arenaviridae</i>	Lassa Fieber Virus	Alpha-dystroglykan	Cao et al., 1998
<i>Flaviviridae</i>	Hepatitis C Virus	CD81	Pileri et al., 1998
		LDLR	Agnello et al., 1999
<i>Herpesviridae</i>	Epstein-Barr Virus	CD21	Fingerroth et al., 1984
	HHV-6	CD46 (MCP)	Santoro et al., 1999
	HHV-7	CD4	Lusso et al., 1994
	HSV	Vertreter der TNF/NGF Rezeptor Familie	Montgomery et al., 1996
		GAG	Williams & Straus, 1997

<i>Morbilliviridae</i>	„canine distemper virus“	CD9	Löffler et al., 1997
	Masern Virus	CD46 (MCP)	Naniche et al., 1993 Dörig et al., 1993
		CDw150 (SLAM)	Tatsuo et al., 2000
<i>Lentiviridae</i>	HIV-1	CD4	Dalglish et al., 1984
		Galactosylceramid	Bhat et al., 1991
		Vertreter der Chemokin Rezeptoren	Übersicht in: Berger et al., 1999
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza Virus	Sialinsäure	Herrler et al., 1985
<i>Picornaviridae</i>	Polio Virus	CD155 (PVR)	Mendelssohn et al., 1989
	„major group“ Rhinovirus	ICAM-1	Greve et al., 1989
	„minor group“ Rhinovirus	Vertreter der LDL Rezeptor Familie	Hofer et al., 1994
<i>Poxviridae</i>	Vaccinia Virus	EGF Rezeptor	Eppstein et al., 1985
		Heparansulfat	Chung et al., 1998
<i>Rhabdoviridae</i>	Tollwut Virus	Acetylcholin Rezeptor	Lentz et al., 1982
<i>Togaviridae</i>	Sindbis Virus	high-affinity Laminin Rezeptor	Wang et al., 1992
		Heparansulfat	Byrnes & Griffin, 1998

^{a)}Abkürzungen: (CD) „cell differentiation number“; (EGF) „epidermal growth factor“; (GAG) Glykosaminoglykane; (HHV) „human herpes virus“; (HIV) „human immunodeficiency virus“; (HSV) „herpes simplex virus“; (ICAM) „intracellular adhesion molecule“; (LDL) „low density lipoprotein“; (LDLR) „low density lipoprotein receptor“; (MCP) „membrane cofactor protein“; (NGF) „nerve growth factor“; (PVR) „poliovirus receptor“; (SLAM) „signalling lymphocyte-activation molecule“; (TNF) „tumor necrosis factor“.

1.4 Experimentelle Ansätze zur Identifizierung von Virusrezeptoren

Gemessen an der Anzahl der bekannten Virussysteme ist bislang nur für relativ wenige Vertreter eine eindeutige Identifizierung von zellulären Rezeptoren gelungen. Diese Untersuchungen gestalteten sich aus verschiedenen Gründen teilweise äußerst schwierig. Ein kritischer Punkt ist die Abgrenzung zwischen unspezifischer und biologisch relevanter Bindung von Virusproteinen an Strukturen der Zelloberfläche, der durch die Veränderung von Viren während der Kultivierung *in vitro* an Problematik noch gewinnt. Bei zahlreichen Viren, für die bereits zelluläre Rezeptoren bekannt sind, hat sich zudem herausgestellt, dass für die Infektion mehrere zelluläre Moleküle additiv oder alternativ notwendig sind. Um die komplexen Vorgänge bei der Invasion von Viren in ihre Wirtszellen untersuchen zu können, stehen verschiedene experimentelle Ansätze zur Verfügung. Hierbei kommen sowohl biochemische als auch molekularbiologische Methoden zum Einsatz.

Eine der erfolgreichsten Vorgehensweisen der biochemischen Charakterisierung von Virusrezeptoren besteht darin, monoklonale Antikörper (mAk) gegen die Oberfläche von Wirtszellen zu generieren. Gelingt es, die Virusinfektion mit Hilfe solcher Antikörper effektiv zu hemmen, kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Antigene eine entscheidende Rolle beim Eintritt der Viren in die Zelle spielen. Diese mutmaßlichen Virusrezeptoren können dann mit Hilfe einer Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend charakterisiert werden. Mit Hilfe dieser Methode sind bisher viele Virusrezeptoren identifiziert worden (Greve et al., 1989; Delmas et al., 1992; Bergelson et al., 1992; Naniche et al., 1993; Huber et al., 1994; Greve et al., 1998; Bearzotti et al., 1999). Auch anti-idiotypische Antikörper (anti-ids) können als Werkzeuge zur Auffindung von Virusrezeptoren herangezogen werden. Bei dieser Methode werden Antikörper gegen die Antigenbindungsdomäne virusneutralisierender Antikörper hergestellt, die folglich die rezeptorbindende Region der Virushülle imitieren. Da anti-ids theoretisch an dieselben Strukturen wie die Viren an die Zelloberfläche binden, kann man sie zur Isolierung eines zellulären Rezeptors heranziehen (Xue & Minocha, 1993; Varthakavi et al., 1996; Kopecky et al., 1999). In Virussystemen, bei denen die präparative Reinigung von Virionen möglich ist, können chromatographisch aufgetrennte Zelloberflächenmoleküle infizierbarer Zellen auf Membranen transferiert und anschließend auf direkte Bindungsfähigkeit markierter Viruspartikel getestet werden. Mit dieser Methode, die auch als „virus overlay binding assay“ (VOBA) bezeichnet wird, können auch nicht-proteinartige Virusrezeptoren identifiziert werden (Hofer et al., 1994; Salas-Benito et al., 1997; Cao et al., 1998). Eine weitere

Möglichkeit besteht in der Untersuchung löslicher zellulärer Fraktionen auf die Fähigkeit, die Infektion zu blockieren (Rolsma et al., 1994).

Bei der bisher am erfolgreichsten angewandten molekularbiologischen Methode zur Identifizierung von Virusrezeptoren wird cDNA von Wirtszellen des entsprechenden Virus verwendet. Bei der Expression solcher Fragmente in nicht-infizierbaren Zelllinien können Sequenzabschnitte identifiziert werden, die die Empfänglichkeit für das entsprechende Virus vermitteln (Mendelsohn et al., 1989; Bates et al., 1993; Bergelson et al., 1994; Pileri et al., 1998; Rasko et al., 1999). Eine wesentlich aufwändigere Methode ist die Herstellung von Zellhybriden durch den Austausch von definierten Chromosomenfragmenten zwischen infizierbaren und nicht-infizierbaren Zelllinien (Dörig et al., 1993). Auch andere experimentelle Ansätze, z.B. die Herstellung von sogenannten Pseudotypen, bei der einzelne Virusstrukturproteine auf der Oberfläche nicht verwandter Viren exprimiert werden, haben zur Identifizierung von spezifischen Rezeptoren geführt (Dalglish et al., 1984).

1.5 Zelluläre Rezeptoren von Pestiviren, Stand der Forschung

Für Pestiviren im Allgemeinen und das BVD-Virus im Speziellen ist über die zellulären und viralen Komponenten, die für die Bindung des Virus an die Oberfläche der Zelle und für ihr Eindringen in das Zytoplasma miteinander interagieren, wenig bekannt. Allerdings weisen die bislang in der Literatur vorhandenen Daten darauf hin, dass es sich auch hier um einen Mechanismus handelt, bei dem mehrere zelluläre und virale Proteine miteinander interagieren. Auf der Seite der Pestiviren sind vermutlich die Strukturproteine E2 und E^{ns} an der Rezeptorbindung beteiligt, da für beide neutralisierende Antikörper beschrieben worden sind (Donis et al., 1988; Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1992). Was die Seite der Zelle betrifft, sind mehrere Ansätze zur Charakterisierung von proteinartigen Virusrezeptoren veröffentlicht worden.

Mit Hilfe von anti-idiotypischen Antikörpern (anti-ids), die gegen einen anti-E2 Antikörper gerichtet sind, gelang die Identifizierung eines Zelloberflächenproteins von 50 kD, für das eine Rezeptoreigenschaft für BVDV postuliert wurde (Xue et al., 1991). Hierbei wurde vorausgesetzt, dass das virale Strukturprotein E2 den rezeptorbindenden Liganden des Virions darstellt (Xue & Minocha, 1993). Durch die anti-ids konnte die Infektion boviner Zellen nur mit bestimmten BVDV Stämmen gehemmt werden. Die Inhibition war jedoch nicht vollständig, sondern erreichte maximal 60%. Für BVDV NADL konnte sogar nur eine Hemmung von 30% erreicht werden, während bei einigen BVDV Stämmen schließlich

keinerlei Hemmung festzustellen war. Aus diesen Gründen wurde die Hypothese formuliert, dass auf den untersuchten Zellen mehrere Virusrezeptoren für BVDV vorhanden sind, deren Bedeutung bei der Infektion mit unterschiedlichen BVDV Stämmen variiert. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Rezeptoreigenschaft des von den anti-ids erkannten 50 kD-Proteins empfindlich gegen Protease-, nicht aber gegen Phospholipase- und Glykosidase-Aktivität ist (Xue et al., 1996). Bei Untersuchungen zur Verbreitung dieses 50 kD Proteins stellte es sich heraus, dass es auch auf nicht-infizierbaren Zellen (z.B. von Affen) vorkommt (Zhang et al., 1998), was seine Funktion als spezifischer Virusrezeptor in Frage stellt.

Ein anderer Ansatz basierte auf der Isolierung von drei monoklonalen Antikörpern (mAk), die gegen die Oberfläche von bovinen Zellen gerichtet waren (Schelp et al., 1995). Interessanterweise wurden diese mAk im Verlauf einer Immunisierung von Mäusen mit angereicherten BVD Virionen erhalten und bei der Charakterisierung BVDV-neutralisierender Antikörper identifiziert. Mit diesen mAk konnte die Infektion boviner Zellen mit verschiedenen BVDV Stämmen auf spezifische und konzentrationsabhängige Weise gehemmt werden. Einige Virusstämme konnten sogar vollständig blockiert werden. Die von allen drei mAk gleichermaßen erkannten Proteine, für die bislang keine Informationen über Identität und natürliche Funktion vorlagen, hatten ein apparentes Molekulargewicht von ~60 und ~93 kD und konnten nur auf bovinen Zellen nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose verschiedener Flaviviren stand im Fokus von Untersuchungen über das mit Pestiviren verwandte Hepatitis C Virus. In diesem Zusammenhang wurden auch Experimente mit BVDV durchgeführt, die auf eine Beteiligung des „low density lipoprotein receptor“ (LDLR) bei der BVDV Infektion hinwiesen (Agnello et al., 1999). Hierfür sprachen sowohl die infektionshemmende Wirkung eines mAk gegen LDLR als auch die Abwesenheit von LDLR auf der Oberfläche von sogenannten „cells resistant to BVDV infection“ (CRIB Zellen), die mit Pestiviren nicht infizierbar sind (Flores & Donis, 1995).

Wie bei vielen anderen Virussystemen wurden in letzter Zeit auch für Pestiviren Interaktionen mit geladenen Zelloberflächenstrukturen beschrieben. Das Virus der klassischen Schweinepest konnte *in vitro* durch Heparin und Dextransulfat sowie durch Heparinase-Behandlung der Kulturzellen gehemmt werden, wobei das Virushüllprotein E^{ms} an der Wechselwirkung beteiligt war. Allerdings traf dies nicht auf Viren zu, die direkt aus infizierten Tieren stammten, es sei denn, sie wurden auf Kulturzellen amplifiziert.

Anschließende Sequenzanalysen zeigten, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure im E^{ms} zu diesem veränderten Phänotyp führte (Hulst et al., 2001a). Auch für BVDV konnte sowohl eine Interaktion des Virushüllproteins E^{ms} mit verschiedenen Glykosaminoglykanen (Heparin, Fucoidan, Dermatansulfat) als auch eine Hemmung der Virusinfektion durch diese Substanzen gezeigt werden (Iqbal et al., 2000).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung früher Ereignisse der Pestivirusinfektion. Im Vordergrund stand dabei die Isolierung und Identifizierung von zellulären Molekülen, die als Virusrezeptoren für BVDV dienen. In der Literatur waren verschiedene experimentelle Ansätze in diesem Kontext bereits beschrieben worden. Unter anderem waren von Schelp et al. (1995) drei verschiedene mAk isoliert worden, die mit Proteinen in der Größe von ~60 und ~93 kD auf der Oberfläche von Wirtszellen interagierten. Diese mAk waren aufgrund der spezifischen und effektiven Infektionshemmung, die bei einigen BVDV Stämmen sogar zu einer vollständigen Blockierung führte, besonders erfolgversprechend. Die entsprechenden Hybridomzelllinien BVD/CA 17, BVD/CA 26 und BVD/CA 27 wurden uns freundlicherweise von Prof. V. Moennig (Tierärztliche Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

1 Charakterisierung:

Am Anfang stand die Charakterisierung der Eigenschaften der mAk und ihrer Antigene. Neben der Reproduktion der Experimente zur Hemmung der BVDV Infektion waren Untersuchungen zur Eignung der mAk für eine präparative Proteinreinigung besonders wichtig. Auch die Ursache für das Auftreten mehrerer Proteinbanden, das bei Immunpräzipitationen mit einzelnen mAk ungewöhnlich ist, sollte abgeklärt werden. Ebenso stellte sich die Frage, weshalb sich die Proteine in der SDS-PAGE nur als unscharfe Banden darstellen ließen. Da es sich bei den gesuchten Proteinen um Zelloberflächenmoleküle handelte, sollte in diesem Zusammenhang das Vorkommen posttranslationaler Modifikationen überprüft werden. Besonders im Hinblick auf die angestrebte Reinigung war auch die Untersuchung der Zytoplasmaverankerung vorgesehen. Ebenso sollte abgeklärt werden, bei welchen Spezies und Zelltypen die von den mAk erkannten Proteine vorkommen. Hierbei sollte besonderes Gewicht auf Zellen und Organe des Rindes gelegt

werden, da die Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Auswahl einer geeigneten Antigenquelle für die präparative Proteinreinigung verwendet werden sollten.

2 Proteinreinigung:

Zunächst war die Etablierung einer geeigneten Nachweismethode für den Durchsatz großer Probenmengen notwendig. Die Proteinreinigung selbst war als Einstufenverfahren geplant, wobei die bei der Charakterisierung der Antikörper und Antigene gewonnenen Erkenntnisse einfließen sollten. Durch Kopplung der mAk an geeignetes Trägermaterial sollte eine Immunaффinitätsmatrix mit hoher Antigenbindungskapazität hergestellt werden. Die Versuchsbedingungen für die Antigenbindung, die Waschschrirte und die Ablösung der isolierten Proteine sollten zunächst im analytischen Maßstab untersucht werden. Im Idealfall sollten die so gewonnenen Erkenntnisse im Anschluss durch Vergrößerung des Versuchsvolumens zu einem präparativen Proteinreinigungsschema führen. Das Ziel der Reinigung war die Bereitstellung der isolierten Proteine in ausreichender Menge für eine N-terminale Aminosäuresequenzierung.

3 Identifizierung:

Basierend auf Aminosäuresequenzen der gereinigten Zelloberflächenproteine sollte die Protein- und Nukleotidsequenz der gesuchten Proteine ermittelt werden. Hierzu sollte eine cDNA Klonierung mit Hilfe von spezifischen DNA Sonden durchgeführt werden, die entweder als „primer“ für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) oder zum Durchsuchen von cDNA Genbanken („screening“) dienen können. Wenn Sequenzdaten vorliegen, sollte durch Homologieuntersuchungen eine Klassifizierung und möglicherweise eine Identifizierung der gereinigten Proteine erfolgen. Durch Fremdexpression der Gene sollte anschließend mit Hilfe der mAk bestätigt werden, dass es sich tatsächlich um die gesuchten mutmaßlichen Virusrezeptoren handelt. Hierbei sollte auch die korrekte Glykosylierung und die Lokalisation der heterolog exprimierten Proteine in der Zytoplasmamembran überprüft werden.

4 Einordnung der Ergebnisse:

Nach erfolgreicher Identifizierung der von den mAk erkannten Proteine war von Interesse, ob es sich hierbei um Strukturen handelt, die als Virusrezeptoren in Frage kommen. Dies sollte mit Hilfe einer umfassenden Literaturrecherche abgeklärt werden. Zudem sollte

hierbei weiterer Aufschluss über das Vorkommen der Proteine und ihrer natürlichen Funktionen gewonnen werden.

5 Heterologe Expression:

Von großer Wichtigkeit war die funktionelle Charakterisierung der bovinen Zelloberflächenproteine im Zusammenhang mit der BVDV Infektion. Zu diesem Zweck sollten die mutmaßlichen Virusrezeptoren in nicht-infizierbaren Zellen exprimiert und der Phänotyp der veränderten Zellen bezüglich ihrer Infizierbarkeit untersucht werden. Sollte die Expression der bovinen Oberflächenproteine eine BVDV Infektion von natürlicherweise nicht-infizierbaren Zellen ermöglichen, so wäre dies ein Beleg für ihre Funktion als spezifische Virusrezeptoren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Virusstämme

2.1.1.1 Zellen

2.1.1.1.1 Zelllinien

- A: **MDBK** („marbin darby bovine kidney“): ATCC, USA
- B: **PK15** („porcine kidney“): ATCC, USA
- C: **38A₁D** (Schweine Lymphom): erhalten von Prof. Dr. Schäfer (MPI für Virusforschung, Tübingen)
- D: **BHK-21** („baby hamster kidney“): ATCC, USA
- E: **L-Zellen** (Mäuse Lymphom): ATCC, USA
- F: **HeLa** (humanes Cervix Karzinom): ATCC, USA

- G: Hybridom **BVDV/CA 17**
- H: Hybridom **BVDV/CA 26**
- I: Hybridom **BVDV/CA 27**

Die Hybridomzelllinien wurden von Prof. Dr. V. Moennig (Tierärztliche Hochschule, Hannover) zur Verfügung gestellt.

2.1.1.1.2 Sekundäre Zellen aus bovinen Föten

- A: **BEL** („bovine embryo lung“)
- B: **BFB** („bovine fetal brain“)
- C: **BFBM** („bovine fetal bone marrow“)
- D: **BFG** („bovine fetal gut“)
- E: **FBK** („fetal bovine kidney“)
- F: **FBS** („fetal bovine spleen“)

Alle sekundären Zellen wurden von Dr. M. König (JLU Gießen) zur Verfügung gestellt.

2.1.1.2 Virusstämme

- A: **NADL** (BVDV I): beschrieben in: Collett et al., 1988a
- B: **Osloss** (BVDV I): beschrieben in: Renard et al., 1987
- C: **NCP #1** (BVDV I): beschrieben in: Corapi et al., 1988
- D: **# 890** (BVDV II): beschrieben in: Ridpath & Bolin, 1995
- E: **X818, „Clover Lane“ Virus** (BDV): beschrieben in: Becher et al., 1994
- F: **Alfort T** (CSFV): beschrieben in: Meyers et al., 1989
- G: **Giraffe-1**: beschrieben in: Plowright, 1969

- H: **Vaccinia Virus VTF7-3**: erhalten von Dr. B. Moss (National Institute of Health, Bethesda, USA)

2.1.2 Bovine Organe und Milch

Kalbsthymus sowie Herz, Niere, Leber und Milz ausgewachsener Rinder stammten von einem Frankfurter Schlachthof und wurden entweder am Schlachttag verarbeitet oder sofort bei -70°C eingefroren.

Kuhmilch und Pferdemilch stammten aus dem allgemeinen Handel. Bei der menschlichen Milch handelte es sich um ein "Feldisolat".

2.1.3 Monoklonale Antikörper und Antiseren

2.1.3.1 Monoklonale Antikörper

- **mAk 17, mAk 26 und mAk 27**, gerichtet gegen die Oberfläche boviner Zellen, wurden aus dem Kulturüberstand der Hybridome, BVDV/CA17, BVDV/CA26 und BVDV/CA27 isoliert
- **mAk „Code 4“**, gerichtet gegen das pestivirale Nichtstrukturprotein NS3; erhalten von Dr. E. J. Dubovi (Cornell University, Ithaca, USA)
- **mAk mix anti-E2**, gerichtet gegen das Strukturprotein E2 von BVDV; erhalten von E. Weiland (BFAV, Tübingen)
- **mAk D5+**, gerichtet gegen das Strukturprotein E2 von BVDV; erhalten von E. Weiland (BFAV, Tübingen)
- **mAk A18**, gerichtet gegen das Strukturprotein E2 von CSFV; erhalten von E. Weiland (BFAV, Tübingen)

2.1.3.2 Antiseren

- **anti-Maus-PO** aus dem Kaninchen, gerichtet gegen Maus-IgG
- **anti-Maus-PO** aus der Ziege, gerichtet gegen Maus-IgG

Die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Spezies Antikörper stammten von der Firma Dianova.

2.1.4 Reagentien für die Zellkultur

2.1.4.1 Medien

A: Für MDBK, PK15, 38A₁D, BHK-21, L-Zellen, HeLa und sekundäre bovine Zellen

<u>BFA-34:</u>	Aminosäuren	Vitamine
	0,0178 g/l L-Alanin	0,1 mg/l Biotin
	0,03 g/l L-Aspartat	0,025 g/l Hypoxanthin
	0,07 g/l Glycin	
	0,075 g/l L-Glutamat	Sonstige Inhaltsstoffe
	0,025 g/l L-Prolin	
		3,7 g/l NaHCO ₃
		0,016 g/l Phenolrot

Vor Gebrauch Zugabe von 10% (w/v) fötalem Kälberserum (FCS), 0,04 g/l Penicillin und 0,07 g/l Streptomycin.

B: Für Transfektanten

wie BFA-34, zusätzlich wurde vor Gebrauch 0,4 mg/ml G418 zugegeben.

C: Für Hybridomzellen

folgende Zusätze zu BFA-34 wurden vor Gebrauch zugegeben:

2 mM L-Glutamin
 10 mM HEPES
 50 µM β-Mercaptoethanol
 0,04 g/l Penicillin
 0,07 g/l Streptomycin
 15% FCS (w/v)

2.1.4.2 Sonstige Lösungen**A: Versen-Puffer**

0,2 g/l EDTA Na₂ x 2 H₂O
 8,0 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,15 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,02 g/l KH₂PO₄ x H₂O

B: PBS

0,8 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 0,1 g/l Ca₂Cl x 2 H₂O
 1,15 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,2 g/l KH₂PO₄ x H₂O
 0,1 g/l MgCl₂ x 6 H₂O

C: Trypsin-Lösung

8,0 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,44 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,2 g/l KH₂PO₄ x H₂O
 2,5 g/l Trypsin 1:300
 1,23 g/l EDTA Na₂ x 2 H₂O
 0,016 g/l Phenolrot

2.1.5 Plasmide und Bakterien**2.1.5.1 Plasmide**

pBluescript SK(-) 2,96 kB, ColE1 ori, Amp^r, LacZ, f1 (-) ori, MCS flankiert von T7/T3 RNA-Polymerase-Promotor (Fa. Stratagene)

pcDNA3 (+/-) 5,4 kB, ColE1 ori, Amp^r, BGHpA, f1 ori, SV40-Promotor, Neomycin^r, SV40pA, ie-hCMV-Promotor, MCS flankiert von T7 RNA Polymerase-Promotor (Fa. Invitrogen)

2.1.5.2 Bakterien

<i>E. coli</i> Stamm HB 101	<u>Genotyp</u> <i>supE44 hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 GalK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>
<i>E. coli</i> Stamm DH 5α	<u>Genotyp</u> <i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacZΔM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
<i>E. coli</i> Stamm XL1-Blue	<u>Genotyp</u> <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac⁻</i> F' [<i>proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)</i>]
<i>E. coli</i> Stamm SOLR	<u>Genotyp</u> <i>e14⁻(mcrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ umuC::Tn5(kan^r) uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R</i> F' [<i>proAB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>] Su ⁻

2.1.6 Nährmedien für Prokaryoten

LB-Medium

10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl

LB-Agar

1,5% Agar-Agar in LB-Medium (w/v)

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen

KM1:	5'-TTTGAATTCAAAATGATGGCGTTTTGCGCGCTGC-3'
KM5:	5'-ACATTTGACCACTTTACACTC-3'
BVD6i:	5'-GGCCAGATGAATATTCCCTTG-3'
BVDR7i:	5'-ACTACTCCATTCACCATTTC-3'

Die Oligonukleotide BVD6i und BVDR7i waren durch den Fluoreszenzfarbstoff IR800 markiert, um die Verwendung des DNA Sequenzierautomaten Li-Cor 4000L (Fa. MWG Biotech) zu ermöglichen.

2.1.8 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) 40% (w/v)	Applichem
Aceton	Roth
Agar-Agar	Difco
Agarose für die Gelelektrophorese	Roth
Ampicillin	Fluka
Ammoniumchlorid	Fluka
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Biotin zur Markierung	Boehringer Mannheim/Roche
Blockierlösung Rotiblock	Roth
β-Mercaptoethanol	Fluka
Borsäure	Roth

Bromphenolblau	Sigma
BSA	Serva
CNBr-aktivierte Sepharose	Pharmacia
Coomassie Blue R250	Merck
Desoxynukleosidtriphosphate	Boehringer Mannheim/Roche
DMSO	Merck
EDTA	Roth
Ethanol	Fluka
Ethanolamin	Fluka
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim/Roche
G418	Calbiochem
Glycerin 87% (w/v)	Roth
Glycin	ICN
Harnstoff	U. S. Biochemical
H ₂ O ₂	Aldrich
Isopropanol	Fluka
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth
Methanol	Fluka
Milchpulver	D.V.G. Gesundheitswerk
Molekulargewichtsstandard für Proteine	Gibco BRL
Natriumazid	Merck
Natriumacetat	Merck
NP-40	Fluka
Octylglucosid	Calbiochem
Phenol	Roth
ProteinA- und ProteinG-Sepharose	Pharmacia
SDS	ICN
TEMED	Fluka
Tris	Sigma
Triton X-100	Fluka
Triton X-114	Fluka
Tween 20	Fluka

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Gibco BRL, Fluka, Merck, Serva und Sigma mit dem Reinheitsgrad p.A. bezogen

2.1.9 Enzyme und Kits

Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim/Roche
Antikörper-Typisierungskit „Iso-strip“	Boehringer Mannheim/Roche
„Fast Track 2.0 mRNA Isolation Kit“	Invitrogen
Gelsystem für Sequenzgele „Sequagel“	Biozym
PNGase F	Biolabs
„QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	Biolabs
Reverse Transkriptase	Gibco BRL
RNase A	Boehringer Mannheim/Roche
SAPO	Biolabs
„SuperSignal western blotting substrate“	Pierce
Taq DNA-Polymerase	Natutec

T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
„Thermo-Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“	Amersham Pharmacia Biotech
Tranfektionsreagentien Superfect und Effectene	Qiagen

2.1.10 Geräte

Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Forma Scientific
DNA-Sequenzierer Li-Cor 4000 L	MWG Biotech
Einfrier-Box für Zellen	Nalgene
Gelelektrophoresekammern horizontal	Eigenbau JLU
Gelelektrophoresekammern vertikal	Biorad
Geldokumentationssystem	MWG Biotech
Glaswaren	Schott
Heizblock	Eppendorf
Kühlschränke	Liebherr
Magnetrührer	IKA-Works
Mikroskope	Hund und Leitz
Pipettierhilfen	Gilson
Photometer	Pharmacia und Parkin-Elmer
Protein-Transferkammer	Eigenbau JLU
Röntgenfilmentwicklungsautomat	Agfa
Schüttler	Infors
Spannungsquellen	Biorad und Stratagene
Sterilbänke	Heraeus
Thermocycler	Perkin-Elmer
UV-Lampe	Bachofer
Vortex	IKA-Works
Waagen	Mettler
Wasserbad	Braun
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge Labofuge 400R	Heraeus
Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Millipore
Einmalspritzen	Braun
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturschalen	Falcon
Mikrotiterplatten	Falcon
Nitrozellulosemembran	Schleicher-Schuell
Petrischalen für Bakterien	Greiner
PVDF-Membran	Biorad
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme Biomax	Kodak
Ultrafiltrationsröhrchen	Amicon
Zentrifugationshülsen	Millipore

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebekultur

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle Kulturzellen wurden mit dem entsprechenden Medium bei 37°C und 5% CO₂ (v/v) in feuchter Atmosphäre gehalten. Am Boden der Kulturschale anhaftende Zellen wurden im Abstand von drei bis vier Tagen durch Trypsinbehandlung abgelöst. Zellen, die nicht fest am Boden der Kulturschale haften (38A₁D- und Hybridomzellen), wurden mechanisch durch Abspülen mit der Pipette vom Boden der Kulturschale abgetrennt. Geeignete Verdünnungen der so erhaltenen Zellsuspensionen konnten danach in neuen Kulturschalen eingesät werden.

2.2.1.2 Fixierung und immunhistochemischer Nachweis von Antigen auf Zellen

2.2.1.2.1 Fixierung

- Methode A (mAk 17, 26 und 27 sowie mAk-mix anti-E2 und mAk A18):

Lösungen: PBS
 Aceton/Methanol-Mischung 1:1 (-20°C)

Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und mit der vorgekühlten Aceton/Methanol-Mischung für 5 min bei -20°C fixiert und anschließend getrocknet.

- Methode B (mAk „Code 4“):

Lösungen: PBS
 Fixierlösung: 4% PFA (w/v) in PBS
 0,5% Octylglucosid (w/v) in PBS

Die Zellen wurden nach 1 x waschen in PBS mit der Fixierlösung für 20 min bei 4°C fixiert und anschließend mit Octylglucosid permeabilisiert (5 min Raumtemperatur (RT)). Zwischen den Fixierungsschritten wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen.

2.2.1.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Antigen

Lösungen: PBS
 Na-Acetat-Puffer 50 mM, pH 5.2
 Aminoethylcarbazol (AEC) 4 mg/ml in DMSO
 H₂O₂

 Substratlösung: 9,25 ml Na-Acetatlösung
 0,75 ml AEC
 5 µl H₂O₂

Der erste Antikörper (Hybridomzell-Kulturüberstand) wurde 1:3 - 1:10 in PBS verdünnt, die Inkubation erfolgte entweder 1 - 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Der zweite, Peroxidasegekoppelte Antikörper wurde 1 : 1000 in PBS verdünnt. Nach 1 - 2 stündiger Inkubation bei RT wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit der Substratlösung entwickelt.

MAk 17-, mAk 26- und mAk 27-positive Zellen sowie virusinfizierte Zellen (mAk-mix anti-E2-positive Zellen, mAk A18-positive Zellen und mAk „Code 4“-positive Zellen) färbten sich rot an und konnten im Lichtmikroskop beurteilt werden. Für eine quantitative Auswertung der Infektionseffizienz wurden die virusinfizierten Zellareale mit Hilfe eines Leuchtschirms und eines Binokulars mit 10- oder 15-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.2.1.3 Biotinylierung von Zellen

Lösungen: Boratpuffer 50 mM, pH 8,6, 150 mM NaCl
Stammlösung Biotinylcapronsäureester 10 mg/ml in DMSO
1 M NH₄Cl

Konfluente Zell-Monolayer wurden 3 x mit Borat-Puffer gewaschen und anschließend 20 min bei RT mit Biotinylcapronsäureester (1:100 Verdünnung in Boratpuffer) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1/100 Volumen NH₄Cl-Lösung zugegeben und 10 min inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS konnten die markierten Zellen weiterverarbeitet werden.

2.2.1.4 Zelllyse

Lysepuffer: 1 % Triton X-100 (w/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

Alle Schritte der Zelllyse fanden bei 0°C statt. Oberflächenbiotinylierte sowie unbehandelte Zellen wurden mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer 10 min aufgebrochen. Die Zellkerne bleiben bei dieser Methode intakt und haften am Boden der Kulturschale, sodass das Lysat nicht durch Nukleinsäuren kontaminiert wird. Bei Großansätzen wurden die Zellen von den Kulturschalen abgeschabt, 3 x mit PBS gewaschen und anschließend in Suspension lysiert. Die Zellkerne konnten danach durch Zentrifugation abgetrennt werden. Vor der Weiterverarbeitung der Lysate stand die Vorklärung durch Zentrifugation (Eppendorf 5415C, 5000 Upm, 5 min) und die Filtration (Porengröße 0,45 µm). Eingefrorene Lysate mussten nach dem Auftauen erneut geklärt werden.

2.2.1.5 Virustitration und Titerberechnung

Von Kulturüberständen infizierter Zellen wurden Verdünnungsreihen in PBS hergestellt (in der Regel: unverdünnt, 10⁻¹, 10⁻², ..., 10⁻⁶). Mit je 100 µl der verschiedenen Verdünnungen wurde eine Vertiefung einer 24-„well“-Zellkulturschale mit einem subkonfluenten Zellrasen (Zelldichte ca. 80%) infiziert. Nach 24- bis 36-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die produktive Infektion mittels eines immunhistochemischen Nachweises detektiert. Anschließend wurden infizierte Zellareale („plaques“), die auf einzelne infektiöse Einheiten (IE) zurückzuführen sind, in zwei bis drei „wells“ der Reihe ausgezählt. Der Virustiter der Ausgangslösung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$10 \times \text{ausgezählte „plaques“/„well“} \times \text{Verdünnungsstufe} = \text{Virustiter [IE/ml]}$$

2.2.1.6 Hemmung der Infektion durch mAk

Alle Zellen wurden am Vortag so eingesät, dass zum Zeitpunkt des Experiments ein subkonfluenter Zellrasen (Zelldichte ca. 80%) vorhanden war.

- Vorinkubation mit mAk:

Die Zellen wurden für 1 h bei 0°C mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen in PBS (20% des normalen Kulturvolumens) inkubiert. Bei tiefen Temperaturen ist die zelluläre Stoffwechselaktivität reduziert, sodass während dieses Schrittes in der Hauptsache nur die Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche stattfindet. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit kaltem PBS gewaschen.

- Infektion:

Verschiedene Verdünnungen der Viren wurden in PBS hergestellt und in 20% des normalen Kulturvolumens für 1 h bei 37°C auf die Zellen gegeben. Nach der Infektion wurden die Zellen 3 x mit vorgewärmtem PBS gewaschen, neues Medium zugegeben und 24 bis 48 h im Brutschrank weitergehalten. Anschließend erfolgte die Beurteilung des Infektionserfolgs durch den Nachweis viraler Antigene auf der Oberfläche der Zellen (s. 2.2.1.2.2).

- Berechnung der Hemmungseffizienz:

Nach Vorinkubation der Zellen mit den mAk kam es bei Verwendung der gleichen Infektionsdosis (IE/Ansatz) zu einer Reduktion der Zahl angefärbter „plaques“. Die Hemmungseffizienz wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$100 - ((100 : \text{Infektionsdosis}) \times \text{ausgezählte „plaques“}) = \text{Hemmungseffizienz}$$

Zum Großteil wurden die Experimente zur Hemmung der Virusinfektion in oben dargestellter Reihenfolge durchgeführt. Teilweise wurden die Zellen jedoch zuerst mit Virus infiziert, die Infektion fand in diesem Falle bei 0°C statt. Dadurch sollte vermieden werden, dass Viruspartikel bereits in dieser Phase durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert werden und für die später zugegebenen Antikörper nicht mehr zugänglich sind.

2.2.1.7 Transfektion von Zellen

2.2.1.7.1 Transiente Transfektion mit Hilfe von Vaccinia Virus

Für die transiente Transfektion wurden die Zellen zuerst bei 37°C mit Vaccinia Virus infiziert und anschließend mit zirkulärer Plasmid DNA transfiziert. Hierzu wurde gereinigte Plasmid DNA (2 µg/6-„well“) mit Medium ohne FCS und Antibiotika auf 50 µl aufgefüllt, mit 10 µl Superfekt-Reagens 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 500 µl Medium auf die Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und durch normales Kulturmedium ersetzt. Nach 24-stündiger Inkubation konnte die Expression der rekombinanten Proteine analysiert werden.

2.2.1.7.2 Stabile Transfektion

Für die Herstellung von stabilen Zelllinien wurde die Transfektion mit einer semikonfluenten Zellpopulation durchgeführt (Zelldichte ca. 50%). Um die Integration in das Genom der Wirtszellen zu erleichtern, wurde die Plasmid DNA vor der Transfektion mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Die Transfektion mit Superfect wurde analog zum transienten Ansatz durchgeführt. Für die Transfektion mit Effectene wurde 1 µg linearisierte Plasmid DNA mit 100 µl EC-Puffer, 1,6 µl Enhancer und 10 µl Effectene (Lösungen im Transfektionskit enthalten) 10 min bei RT inkubiert, mit 2 ml Medium auf die Zellen gegeben und dort belassen.

2.2.1.8 Herstellung stabiler Zelllinien

Nach Transfektion mit linearisierter Plasmid DNA wurden die Zellen 48 h bei 37°C inkubiert und danach zur Selektion je nach Zelllinie in bis zu 1:10.000 Verdünnungen neu ausgesät. Im Selektionsmedium befand sich 0,4 – 0,8 mg/ml G418. Nach 7 - 10 Tagen waren resistente Einzelzellklone herangewachsen, die mit Hilfe von Trypsinlösung getränkten Filterpapierstücken isoliert und in 48-„well“ Platten separat kultiviert werden konnten. Sie wurden auf Expression des rekombinanten Proteins, auf Homogenität sowie Stabilität über mehrere Passagen getestet.

2.2.1.9 Einfrieren von Zellen

Zellen wurden so in eine Ø10 cm Zellkulturschale ausgesät, dass sie am darauffolgenden Tag einen dichten aber nicht mehrschichtigen Zellrasen gebildet hatten. Nach Ablösung durch Trypsin wurden sie in inaktiviertem FCS aufgenommen, dem vorher 10% DMSO (w/v) zugesetzt wurde, und nach Aliquotieren mit Hilfe einer Einfrierbox bei -70°C eingefroren. Die Zellen wurden in einem Wasserbad (37°C) schnell aufgetaut und in Verdünnungen von 1:2 - 1:5 ausgesät, nach 2-4 h wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen. Empfindliche Zelllinien wurden vor dem Aussäen erst in Medium aufgenommen und einmal niedertourig zentrifugiert, damit das DMSO-haltige Medium sofort entfernt werden konnte.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Typisierung von monoklonalen Antikörpern (mAk)

Zur Typisierung der mAk wurde das Testsystem „Iso-strip“ (Fa. Boehringer Mannheim) verwendet. Auf den Teststäbchen sind verschiedene mAk aufgebracht, die ihrerseits die zur Differenzierung der unterschiedlichen Maus IgG Subklassen herangezogenen Strukturen erkennen und durch eine gekoppelte Farbreaktion sichtbar machen. Auf diese Weise war es möglich, die Subklasse der mAk 17, 26 und 27 durch Benetzen der Teststäbchen mit den entsprechenden Hybridomzellkulturmedien zu bestimmen.

2.2.2.2 Reinigung von mAk

Die Reinigung von mAk erfolgte im Wesentlichen nach den Vorschriften von Harlow & Lane (1988).

- Isolierung von mAk:

Lösungen: Puffer A: 1M Tris/HCl, pH 8,0
Puffer B: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0
Elutionspuffer: 3,5 M MgCl₂, pH 8,0

Überstände von Hybridomzellkulturen wurden durch Zentrifugation vorgeklärt (Sorvall RC-5B, 1 h, 5000 Upm) filtriert (Porengröße 0,45µm) und der pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen Puffer A stabilisiert. Die mAk-haltige Lösung wurde über eine Säule mit ProteinA- oder ProteinG-gekoppelter geschickt (Flussrate ca. 5 ml/min) und der Durchlauf verworfen. Bei größeren Mengen wurde die mAk-haltige Lösung über Nacht entweder über einer Säule zirkuliert oder alternativ in einem „batch“ Verfahren an das Säulenmaterial gebunden. Nach Waschen mit mehreren Säulenvolumen Puffer B konnten die adsorbierten mAk mit Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min vom Säulenmaterial abgelöst werden. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen die anschließend in der SDS-PAGE auf Anwesenheit und Reinheit der mAk überprüft wurden.

- Umpuffern und Konzentrierung von mAk:

Eluierte Antikörper, die in einer hohen MgCl₂-Konzentration vorlagen, wurden zunächst gegen 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 dialysiert. Nach Entfernung des MgCl₂ konnte die Lösung in Ultrafiltrationsröhrchen eingengt werden. Das Konzentrat wurde in PBS verdünnt und erneut eingengt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Vorgangs in demselben Ultrafiltrationsröhrchen wurde der Tris/HCl Puffer quantitativ entfernt und durch PBS ersetzt. Nach erfolgter Umpufferung wurden die Präparationen sterilfiltriert und deren Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen durch Zugabe von sterilem PBS auf 1 mg/ml gebracht.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Mikroassay)

Lösungen:

Reagenz A:	8% Na ₂ CO ₃ (w/v) , 1,6% NaOH (w/v), 1,5% Na-Tartrat (w/v), mit festem NaHCO ₃ auf pH 11,25 einstellen
Reagenz B:	4% Bichinolindicarbonsäure (BCA) (w/v), Dinatriumsalz
Reagenz C:	4% CuSO ₄ (w/v), frisch ansetzen
Reagenz D:	Reagentien A, B und C kurz vor Gebrauch im Verhältnis 50:48:2 mischen

Die proteinhaltigen Proben wurden mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 0,5 ml gebracht und mit je 0,5 ml Reagenz D vermischt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 60°C war die Farbreaktion abgeschlossen. Die Extinktion der Proben bei 562 nm wurde bestimmt und mit einer parallel mitgemessenen Eichgeraden von 0,5 bis 20 µg Protein/ml verglichen.

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Allgemeine Lösungen:

Acrylamidlösung:	40% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) (w/v)
Glycerin:	87% in H ₂ O (w/v)
APS:	10 mg/ml Ammoniumpersulfat in H ₂ O
Probenpuffer:	2% SDS (w/v), 62,5 mM Tris/HCl, 10% Glycerin (w/v), 6 M Harnstoff, 0,01% Bromphenolblau (w/v), 0,01% Phenolrot (w/v), pH 6,8; für reduzierende Bedingungen Zusatz von 5% β-Mercaptoethanol (v/v)
Färbelösung:	2,5% Coomassie blue (w/v), 40% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) in H ₂ O
Fixierlösung:	40% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) in H ₂ O

Lösungen für das Laemmli Gelsystem:

2 x Sammelgelpuffer:	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8
2 x Trenngelpuffer:	0,75 M Tris/HCl, pH 8,8
SDS-Lösung:	10% in H ₂ O (w/v)
10 x Elektrodenpuffer:	0,25 M Tris/HCl, 1,925 M Glycin, 1% SDS (w/v), pH 8,3

Lösungen für das Gelsystem nach Schägger und Jagow:

3 x Gelpuffer:	3 M Tris/HCl, 0,3% SDS (w/v), pH 8,45
10 x Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9
10 x Kathodenpuffer:	0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS (w/v), pH 8,25

Die Endkonzentration von Acrylamid im Sammelgel betrug 4%, im Trenngel bei Laemmli-Gelen 10% und bei Gelen nach Schägger und Jagow 7,5% (w/v). Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard „high molecular weight, prestained“, verwendet.

Die Elektrophoresen wurden in vertikalen Plattenapparaturen durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die proteinhaltigen Lösungen in Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend bei konstanter Spannung aufgetrennt. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte bei RT durch einstündige Inkubation der Gele mit Coomassie Färbelösung und anschließender Entfärbung mit Fixierlösung.

2.2.2.5 „Western blot“ Analyse

Die „Western blot“ Analyse ist eine Nachweismethode, bei der Proteine durch Antikörper spezifisch nachgewiesen werden können. Hierbei ist keine vorausgehende Markierung der Proteine in der Ausgangslösung notwendig. Diese Methode ist sehr sensitiv, zudem liefert sie Informationen über die Größe des entsprechenden Antigens.

<u>Lösungen:</u>	Transferpuffer:	50 mM Tris/HCl, 0,38 M Glycin, 0,1% SDS (w/v), 20% Methanol (v/v)
	Blockierlösung:	10% „Rotiblock“ (w/v), 0,5% Tween 20 (w/v) in PBS
	Waschlösung:	0,5% Tween 20 (w/v) in PBS

Nach Beendigung der SDS-PAGE äquilibrierte das Gel für 30 min in Transferpuffer. Der Nasstransfer der Proteine auf Nitrozellulosefilter fand in entsprechenden Kammern (Biorad und JLU Eigenbau) bei konstanter Spannung (25 - 100 V, 1 - 15 h) statt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran nacheinander für jeweils 1 h in Blockierlösung und mit dem ersten Antikörper inkubiert. Beide Schritte konnten auch über Nacht bei 4°C durchgeführt werden. Folgende Verdünnungen der Antikörper wurden verwendet: Zellkulturüberstände mit monoklonalen Antikörpern 1:2 bis 1:10, polyklonale Antiseren 1:500 - 1:10000 in Waschlösung. Anschließend an eine mindestens 3 x wiederholte 10-minütige Behandlung mit Waschlösung wurde die Membran für 2 h mit den Enzym-gekoppelten anti-Spezies Antikörpern (Verdünnung 1:10000 in Waschlösung) inkubiert, es folgten die gleichen Waschschrte wie zuvor. Der Nachweis der gebundenen Antikörper wurde mittels „SuperSignal Western blotting substrate“ (Fa. Pierce) durchgeführt, wobei sich die Signale der spezifischen Proteine auf einem auf die Membran aufgelegten „Biomax“ Röntgenfilm darstellten.

2.2.2.6 Immunpräzipitation

Eine weitere Methode zur Darstellung von Antigenen ist die Immunpräzipitation. Voraussetzung hierfür ist die Markierung der Proteine im Ausgangsmaterial. In der vorliegenden Arbeit geschah dies durch die Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen lebender Kulturzellen. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass keine Denaturierung der Proteine stattfindet, bevor diese mit den Antikörpern in Berührung kommen.

- Präzipitation:

Lösungen: Lyse-Puffer: 1% Triton-X 100 (w/v) in PBS
IP-Puffer: 1% Triton X 100 (w/v), 1% NaDOC (w/v), 0,1 % SDS (w/v),
0,15 M NaCl
1 mM EDTA in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Durch Zugabe der Detergentien NaDOC und SDS entstanden in Lysaten oberflächenbiotinylierter Kulturzellen IP-Puffer Bedingungen. Die folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Während einer 1 h Inkubation fand die Bindung der monoklonalen Antikörper an ihre Antigene (Verdünnung des Hybridomüberstandes 1:5) statt. Nach erneuter Filtration wurde ProteinA- bzw. ProteinG-gekoppelte Sepharose (1 µl/ml Probe) zugegeben und die Immunkomplexe unter Schwenken während einer weiteren Stunde präzipitiert. Zur Abnahme des ersten Überstands setzte sich die Sepharose durch die Schwerkraft ab, da bei einer Zentrifugation markierte Zellbestandteile, die während der Inkubationszeit ausgefallen waren, mitpelletiert werden würden. Vor dem ersten Waschen wurde die Sepharose in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach drei Waschschrten konnte die Flüssigkeit mit einer Hamilton-Pipette abgesaugt und die Sepharose in Probenpuffer aufgenommen werden.

- Biotin-Nachweis:

Die präzipitierten Proteine wurden durch die Behandlung mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose abgelöst und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das weitere Vorgehen geschah analog zur „Western blot“ Analyse, wobei die Nitrozellulosemembran statt mit 1. und 2. Antikörper lediglich mit an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Streptavidin (SAPO)

(1:10000, 30 min RT) inkubiert wurde. Die Signale der biotinylierten Oberflächenproteine wurden auf einem auf die Membran aufgelegten „Biomax“ Röntgenfilm sichtbar.

2.2.2.7 Deglykosylierung

Durch den Einsatz der Endoglykosidase PNGase F können N-Glykosylierungen von Proteinen auch in Anwesenheit von Detergentien nachgewiesen werden. Die Spaltstelle des Enzyms liegt zwischen einem Asparagin der Polypeptidkette und dem ersten Baustein komplexer Zuckerketten. Sind N-Glykosylierungen in einem Protein vorhanden, so ist dies an einer Änderung des apparenten Molekulargewichts durch den enzymatischen Abbau der Zuckerketten erkennbar.

Als Ausgangsmaterial für die Deglykosylierung wurden durch Biotin markierte Oberflächenproteine wie in 2.2.2.6 immunpräzipitiert. Da wegen der Zugänglichkeit der Substrate eine reduzierende Denaturierung der Proteine notwendig ist, wurde die Sepharose entsprechend den Angaben des Herstellers mit SDS und β -Mercaptoethanol vorbehandelt. Hierbei lösten sich die an der Sepharose gebundenen Proteine ab, sodass die eigentliche Enzymreaktion im Überstand durchgeführt werden konnte. Die enzymatisch behandelten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und das Biotin durch eine gekoppelte Enzymreaktion nachgewiesen.

2.2.2.8 Nachweis von membranständigen Proteinen durch Phasentrennung

Die Existenz von Transmembrandomänen und GPI-Ankern in Proteinen kann durch ihre Löslichkeit in dem Detergens Triton X-114 nachgewiesen werden. Ausgelöst durch Temperaturänderung findet in Triton X-114-Lösungen eine Phasentrennung statt, wobei Proteine, die hydrophobe Regionen enthalten, von löslichen Proteinen abgeschieden werden. Zur Herstellung des Ausgangsmaterials für die Phasentrennung wurden oberflächenbiotinylierte MDBK Zellen analog zu 2.2.1.4 lysiert. Der Lysepuffer enthielt lediglich Triton X-114 statt Triton X-100. Nach der Klärung der Lysate wurde die Detergenskonzentration auf 2% (w/v) aufgestockt. Während einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Lysate durch Bildung von Detergensmizellen milchig. Eine niedertourige Zentrifugation (Eppendorf 5415C, 900 Upm, 15 min) bewirkte die Trennung der Detergens-angereicherten von der Detergens-verarmten Phase. Zum Nachweis der in den beiden Phasen enthaltenen Proteine wurde jeweils ein Aliquot entnommen, 1:10 verdünnt und einer Immunpräzipitation (2.2.2.6) unterzogen.

2.2.2.9 Herstellung von Immunaффinitätsmatrices

2.2.2.9.1 Immobilisierung von IgG2a-Molekülen an ProteinA- und ProteinG-Sepharose

<u>Lösungen:</u>	Puffer A:	0,2 M Na-Borat, pH 9,0
	Puffer B:	0,2 M Ethanolamin, pH 8,0
	Puffer C:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	Puffer D:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,02% NaN ₃ (w/v)

Vorgequollene ProteinA- und ProteinG-Sepharose wurde über einer Glasfritte mit PBS gewaschen. Gereinigte mAk 17 und mAk 27 (in PBS) wurden in Konzentrationen von 2 mg mAk/ml Sepharose zugegeben und die Suspension im „batch“-Verfahren 2 h bei RT rotiert. Nach gründlichem Waschen mit Puffer A und Entnahme einer Probe (entsprechend 1 μ l Sepharose) für die SDS-PAGE wurde die Kopplungsreaktion durch Zugabe von

Dimethylpimelimidat (DMP, Endkonzentration 20 mM) gestartet. Nach 30 min Rotation wurde erneut eine Probe entnommen und die Reaktion durch Abgießen über eine Glasfritte und Waschen mit Puffer B gestoppt. Die Blockierung der konjugierten Sepharose fand während 2-16 h bei 4°C statt. Nach ausgiebigem Waschen in Puffer C wurde die Immunitätsmatrix in Puffer D aufbewahrt. Die Beladungsdichte der Matrix und die Kopplungseffizienz konnte in der SDS-PAGE überprüft werden. Vor der Kopplungsreaktion konnte die gesamte Menge der gebundenen Antikörper im Gel nachgewiesen werden, da sie mit SDS-Probenpuffer abgelöst wurden. Die Kopplung mit DMP verursacht eine kovalente Bindung, daher konnten danach nur noch geringe Mengen der leichten Antikörperkette detektiert werden.

2.2.2.9.2 Immobilisierung von IgG1-Molekülen an CNBr-aktivierte Sepharose

<u>Lösungen:</u>	Puffer A:	0,2 M NaHCO ₃ , 0,5 M NaCl, pH 8,8
	Puffer B:	0,1 M Glycin, pH 8,0
	Puffer C:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	Puffer D:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,02% NaN ₃

Vorgequollene CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia) wurde über einer Glasfritte ausgiebig mit Puffer A gewaschen, mit der mAk 26-Lösung (in Puffer A, Endkonzentration 2 mg mAk/ml Sepharose) vermischt und im „batch“-Verfahren 16 h bei 4°C rotiert. Um nachzuweisen, dass die mAk quantitativ an die Sepharose gebunden hatten, wurde der Überstand nach der Inkubationszeit in einer SDS-PAGE auf die Anwesenheit von IgG-Molekülen untersucht. Anschließend wurde die Sepharose mit Puffer B gewaschen und 2 h bei RT mit Puffer B inkubiert, um restliche aktive Gruppen abzusättigen. Die Affinitätsmatrix wurde bei 4°C in Puffer D aufbewahrt.

2.2.2.10 Überprüfung der Antigen-Bindungsfähigkeit der Affinitätsmatrixes

<u>Lösungen:</u>	Lyse-Puffer:	1% Triton X 100 (w/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	IP-Puffer:	1% Triton X 100 (w/v), 1% NaDOC (w/v), 0,1 % SDS (w/v), 0,15 M NaCl in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	IP-Puffer (Urea):	wie oben, Zusatz von 2 M Harnstoff

Für die präparative Reinigung sollte die Affinitätsmatrix mit der höchsten Antigen-Bindungskapazität ausgewählt werden. Hierzu wurden 4×10^7 oberflächenbiotinylierte MDBK Zellen in 10 ml Lysepuffer lysiert. Aliquots von je 200 µl wurden mit 800 µl IP-Puffer oder IP-Puffer (Urea) vermischt und mit verschiedenen Mengen der Affinitätsmatrixes über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Waschen der Matrixes sowie der Nachweis der Antigene, die an die Matrixes gebunden hatten, erfolgte wie bei der Immunpräzipitation. Der Überstand wurde in einer „Western blot“ Analyse auf die Anwesenheit der Antigene untersucht. Die Matrixes galten dann als gesättigt, wenn das Signal gebundener Antigene durch Steigerung der Matrix-Menge nicht mehr intensiviert werden konnte und zudem in den entsprechenden Überständen Spuren von Antigenen nachgewiesen werden konnten.

2.2.2.11 Ermittlung der Elutionsbedingungen

Lösungen: Lyse-Puffer: 1% Triton X 100 (w/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 IP-Puffer: 1% Triton X 100 (w/v), 1% NaDOC (w/v), 0,1 % SDS (w/v),
 0,15 M NaCl in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

Elutionslösungen: A: 100 mM Glycin, pH 2,5
 B: 100 mM Triethanolamin, pH 11,5
 C: 2 % NaDOC (w/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 D: 5 % NaDOC (w/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 E: 2 % SDS (w/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 F: 5 % SDS (w/v) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 G: 3,5 M MgCl₂, mit festem Tris auf pH 7,5 eingestellt
 H: 3 M LiCl in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 I: 2 M Harnstoff in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 K: 8 M Harnstoff in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 L: 2 M GdmHCl in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 M: 50% Ethylenglykol (w/v)

Je 5 µl Sepharose mit 10 µg kovalent gekoppeltem mAk 17 wurden über Nacht mit dem Lysat von $2,5 \times 10^7$ oberflächenbiotinylierten MDBK Zellen in IP-Puffer inkubiert. Auf diese Weise wurde die Affinitätsmatrix mit Antigen gesättigt. Die Waschschritte erfolgten wie bei der Immunpräzipitation (2.2.2.6). Je 100 µl der Elutionslösungen wurden danach zu jedem Ansatz zugegeben und 30 min bei RT rotiert. Bei Verwendung der Puffer A und B schloss sich eine Neutralisation an, die Ansätze mit den Puffern G,H,L und M mussten gegen 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 dialysiert werden. Nach diesen Behandlungen erfolgte die Untersuchung der Elutionslösungen (1/10 des Volumens) in einer „Western blot“ Analyse. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der lediglich mit Lyse-Puffer inkubiert worden war. Bei einer Positivkontrolle wurde die Matrix selbst in SDS-Puffer aufgenommen und 5 min auf 95°C erhitzt.

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 mit H₂O auf 1 l auffüllen

Sämtliche Bakterienstämme wurden bei 37°C unter Schütteln in LB Medium angezogen. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 mg Ampicillin pro Liter Medium. Agarplatten enthielten 15 g Agar pro Liter LB Medium.

2.2.3.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

CaCl₂ Lösung: 60 mM CaCl₂
 15% Glycerin (w/v)
 10 mM PIPES, pH 7,1

- Präparative Plasmidpräparation, „Midiprep“:

Lösungen:

P1,P2 und P3	wie bei „Miniprep“	QC:	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% EtOH (w/v)
QBT:	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15% EtOH (w/v), pH 8,0 0,15% Triton X-100 (w/v)	QF:	1,25 M NaCl 50 mM MOPS, pH 8,2 15% EtOH (w/v)

Präparative Plasmidpräparationen wurden mit dem „Qiagen-Kit“ durchgeführt. 50 ml einer Übernachtskultur wurden 15 min bei 5000 rpm (Heraeus Labofuge 400R) in 50 ml „bluecaps“ pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 ml Lösung P1 resuspendiert und 4 ml Lösung P2 zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 4 ml Lösung P3. Nach erneutem, vorsichtigem Vermischen wurde der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Denaturierte Proteine und chromosomale DNA wurden durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wurde auf die zuvor mit 3 ml Lösung QBT äquilibrierte Säule pipettiert. Nachdem die plasmidhaltige Lösung vollständig durchgelaufen war, wurde die Säule zwei mal mit je 10 ml Lösung QC gewaschen und schließlich die DNA mit 3 ml Lösung QF von der Säule eluiert. Zur Konzentration erfolgte anschließend eine Isopropanol-Fällung, wobei das Pellet zum Schluss in 50 µl H₂O aufgenommen wurde.

2.2.4.1.2 RNA-Präparation

Beim Umgang mit RNA wurde stets mit Handschuhen gearbeitet, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden.

- Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung von Lösungen:

Alle zur RNA-Präparation verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Durch diese Vorbehandlung werden RNasen inaktiviert. Doppelt destilliertes Wasser wurde mit 0,1% DEPC (w/v) versetzt und 24 h bei 37°C geschüttelt. Das DEPC konnte durch anschließendes Autoklavieren inaktiviert werden.

<u>RNA-Lysis-Mix:</u>	4 M Guanidiniumisothiocyanat 0,5% Lauryl-Sarcosinat (w/v) 25 mM Lithiumcitrat 0,1% β-Mercaptoethanol (v/v)	<u>CsCl-Lösung:</u>	5,7 M CsCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,0
-----------------------	---	---------------------	---

- Isolierung von Gesamtzell RNA:

Die pelletierten Zellen einer Kulturschale mit 10 cm Durchmesser wurden in 6 ml RNA-Lysis-Mix resuspendiert, wodurch eine Zelllyse und eine Inaktivierung von RNasen erreicht wurde (Chirgwin et al., 1979). In einem Polyallomer-Zentrifugenröhrchen wurde ein Kissen aus 4,5 ml CsCl-Lösung mit der Zellsuspension überschichtet (Beckmann, Rotor SW41). Bei der anschließenden Ultrazentrifugation (Beckmann, Rotor SW41, 32000 rpm, 20°C, 22 h) setzte sich die RNA am Boden des Röhrchens als Pellet ab. Der Boden des Röhrchens wurde

mit einem heißen Skalpell abgetrennt und die RNA in 320 μl H_2O gelöst. Anschließend erfolgte eine EtOH-Fällung und eine Konzentrationsbestimmung. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

- Präparation von mRNA

Für die Präparation von mRNA wurde das „Fast Track 2.0 mRNA Isolation Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Dieses Verfahren begründet sich auf die Bindung der polyA-Sequenz der mRNA an Oligo-dT Zellulose. Die Präparation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten 10^7 bis 10^8 Kulturzellen.

2.2.4.2 Fällungen

2.2.4.2.1 EtOH-Fällung von DNA

DNA konnte durch die Zugabe von 2,5 Volumen EtOH (abs.) und 1/10 Volumen 4 M LiCl bei -20°C innerhalb von 30 min ausgefällt werden. Danach erfolgte eine Sedimentierung durch Zentrifugation (15000 rpm, 4°C , 15 min, Hettich rapid/K). Das Salz wurde durch mehrmaliges Waschen mit 70% EtOH (w/v) entfernt, der Alkohol dekantiert und die DNA an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in H_2O aufgenommen.

2.2.4.2.2 EtOH-Fällung von RNA

Die Fällung von RNA erfolgte analog zur DNA-Fällung. Anstelle von LiCl wurde jedoch 1/8 Volumen 2M KAc, pH 5,6 zugegeben.

2.2.4.2.3 Isopropanolfällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 0,625 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen LiCl versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Sedimentation, Waschen und Trocknen erfolgte wie bei der EtOH-Fällung.

2.2.4.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA und RNA

Um Proteine, insbesondere Enzyme mit störenden Aktivitäten, aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden diese mit 1 Volumen Phenol ausgeschüttelt (Maniatis et al., 1991). Die Proteine gelangen dabei in die Phenol- oder Interphase. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (14000 rpm, RT, Eppendorf-Tischzentrifuge) beschleunigt. Die Nukleinsäure verblieb in der H_2O -Phase. Durch zweimaliges Ausschütteln mit 1,5 Volumen Chloroform wurde das restliche Phenol aus der H_2O -Phase entfernt. Nach der erneuten Phasentrennung wurde die Chloroformphase abpipettiert und die Nukleinsäure durch eine Fällung gereinigt und konzentriert.

2.2.4.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Absorptionsmaxima liegen für Nukleinsäuren im UV-Bereich bei etwa 260 nm. Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen konnte mit dem Beckmann Spektrophotometer und der „Nucleic acid software“ bestimmt werden. Die Messung erfolgte nach geeigneter Verdünnung in H_2O . Eine $\text{OD}_{260} = 1$ entspricht bei einzelsträngigen Nukleinsäuren einer

Konzentration von 37 µg/ml, bei doppelsträngigen Nukleinsäuren einer Konzentration von 50 µg/ml (Maniatis et al., 1991).

2.2.4.5 Spaltungen von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Analyse und Klonierung wurde Plasmid DNA mit Restriktionsendonukleasen des Typ II, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen, gespalten. Die Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei DNA Konzentrationen von 0,25 µg/ml nicht überschritten wurden.

2.2.4.6 Herstellung glatter Enden an DNA Molekülen

10 x Klenow Puffer 100 mM Tris/HCl, pH 8,5
 50 mM MgCl₂
 10 mM DTT

Für die Ligation nicht-kompatibler Enden nach Restriktionsenzymspaltung ist es notwendig, glatte Enden herzustellen. Hierzu wurde das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) verwendet, dem die 5'-3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Mit Hilfe der noch vorhandenen 3'-5'-Exonuklease- und der 5'-3'-Polymeraseaktivität können nicht-kompatible Enden durch Abbau des 3'-Überhangs bzw. durch Auffüllen des 5'-Überhangs in glatte Enden umgewandelt werden. Die DNA wurde in einer Konzentration bis zu 0,25 µg/µl in 1 x Klenow Puffer gelöst und mit einer Einheit Klenow-Fragment pro µg DNA bei 37°C 15 min mit dNTPs (je 125 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt.

2.2.4.7 Dephosphorylierung

In linearisierte Plasmide mit kompatiblen Enden lassen sich nur schwer DNA Fragmente einsetzen, da der größte Teil der Plasmide zurückligiert. Um diese Rückligation zu verhindern, werden die 5'-Phosphate der Plasmid DNA mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt. Die Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Beendigung der Dephosphorylierung wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt.

2.2.4.8 Ligation von DNA Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

10 x Ligasepuffer: 500 mM Tris/HCl, pH 7,8
 100 mM MgCl₂
 100 mM DTT
 10 mM ATP
 250 µg/ml BSA

Die T4-DNA-Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und Mg²⁺-Ionen die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA Molekülen. Für die Ligation wurden etwa 100 - 500 ng DNA pro Reaktionsansatz in 1 x Ligasepuffer mit 3 U T4-DNA-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 16 h bei 14°C oder für 4 h bei RT.

2.2.4.9 Radioaktive Markierung von DNA durch „Nick-Translation“

Zur radioaktiven Markierung durch „Nick-Translation“ werden durch das Enzym DNase I zufallsmäßig offene Diesterbindungen („nicks“) in einem doppelsträngigen DNA Molekül erzeugt. Mit Hilfe der 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNase I werden Nukleotide entfernt und bei der Polymerasereaktion durch neue Nukleotide ersetzt. Da die eingesetzten dCTP-Nukleotide an der α -Position ^{32}P markiert sind, wird die neu synthetisierte DNA ebenfalls radioaktiv markiert (Rigby et al., 1977).

Die Markierungsreaktion wurde mit einem „Nick-Translation-Kit“ (Amersham) durchgeführt. Das zu markierende Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert (2.2.4.11.2). 50 ng der DNA wurden mit 4 μl dNTP-Mix, 30 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP und 2 μl Enzymlösung in einem Gesamtansatz von 20 μl für 60 - 90 min bei 15 °C inkubiert. Durch Zugabe von 80 μl TES (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5% SDS (w/v)) wurde die Reaktion gestoppt und die freien Nukleotide anschließend durch Filtration über einer Sephadex G-50 Säule abgetrennt (2.2.4.10). Die so erhaltene Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung 5 min auf 95°C erhitzt, um die DNA Doppelstränge in Einzelstränge zu trennen.

2.2.4.10 Gelfiltration von Nukleinsäuren

Um einzelne Nukleinsäuren von längeren Nukleinsäuremolekülen abzutrennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt (Maniatis et al., 1991). Als Matrix wurde dazu Sephadex G50 verwendet. Matrixsuspensionen wurden dazu in 1 ml Spritzen gefüllt, deren Konus zuvor mit Glasfaserfiltern (Whatman GFC) verschlossen worden war. Nach Trockenzentrifugation der Matrix (2000 rpm, Heraeus Minifuge) konnte die Probe in einem Volumen von 100 μl aufgetragen werden. Bei erneuter Zentrifugation verblieben die Nukleotide in der Säulenmatrix, die großen Nukleinsäuremoleküle befanden sich im Durchlauf und konnten weiterverarbeitet werden.

2.2.4.11 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.2.4.11.1 Auftrennung von DNA im Agarosegel

50 x TAE: 2 M Tris
0,25 M Natriumacetat x 3 H₂O
0,05 M EDTA
pH mit Essigsäure auf 7,8 einstellen

Probenpuffer: 0,25% Bromphenolblau (w/v)
0,25% Xylencyanol FF (w/v)
0,1% Orange G (w/v)
30% Glycerin (autoklaviert) (w/v)
in autoklaviertem H₂O lösen

Die Agarosegelelektrophorese wird als Standardmethode zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA Fragmenten eingesetzt. In dieser Arbeit wurden Gele mit 1% Agarose (w/v) in 1 x TAE Puffer mit Ethidiumbromid (EtBr, Endkonzentration 100 ng/ml) verwendet. Die Agarose wurde durch Erhitzen im TAE Puffer gelöst und nach Abkühlung auf etwa 60°C in die Horizontalgelapparaturen gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit TAE Puffer (mit 100 ng/ml EtBr) überschichtet, die DNA mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt

und in die Geltaschen gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von maximal 15 V/cm Elektrodenabstand. Zum Größenvergleich wurde ein Molekulargewichtsstandard (1 kb Leiter) parallel aufgetrennt. Nach Beendigung des Gellaufs konnten die DNA Fragmente im UV Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.4.11.2 Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

Die Isolierung von DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe eines „QIAEX DNA Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Glaspartikel (Vogelstein & Gillespie, 1997). Das gewünschte DNA Fragment wurde aus dem Gel geschnitten, und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Auflösung der Agarose in einer NaJ-Lösung und Zugabe der Glasmilch erfolgten mehrere Waschstschritte und die Ablösung der DNA vom Trägermaterial durch Inkubation mit Wasser.

2.2.4.11.3 Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel

Glyoxal:

8,8 M Glyoxal in H₂O
mit SERDOLIT MB-1
entionisieren

Acridinorangelösung:

Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O lösen
zum Färben von Agarosegelen
1:300 in PBS verdünnen

Probenpuffer:

0,25% Bromphenolblau (w/v)
0,25% Xylencyanol FF (w/v)
0,1% Orange G (w/v)
30% Glycerin (autoklaviert)(w/v)
in autoklaviertem H₂O lösen

50 x Phosphatpuffer:

250 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
250 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O
pH mit NaOH auf 6,8 – 7 einstellen

Die Auftrennung von RNA im elektrischen Feld sollte entsprechend der Molekülgröße und nicht entsprechend unterschiedlicher Sekundärstrukturen erfolgen. Zur Vermeidung intramolekularer Rückfaltungen der RNA und damit verändertem Laufverhalten im Agarosegel wurde die RNA vor dem Auftragen mit Glyoxal behandelt (Carmichael & McMaster, 1980) und ein formaldehydhaltiges Agarosegel verwendet (Keil et al., 1984).

Die Glyoxylierung der RNA Proben (1 – 5 µg pro Geltasche) erfolgte in Phosphatpuffer mit 1,2 M Glyoxal. Nach 30 min bei 56°C wurde die Probe mit 1/4 Volumen Auftragspuffer versetzt.

Agarose wurde durch Kochen in Phosphatpuffer geschmolzen (1% w/v). Nach Abkühlung auf weniger als 50°C erfolgte die Zugabe von 5,5% Formaldehyd (v/v). Die Lösung wurde in Horizontalgelapparaturen in der Größe von 14 x 25 cm (Gelvolumen 150 ml) gegossen und nach dem Erkalten mit Phosphatpuffer überschichtet. Nachdem die RNA Proben in die Geltaschen gegeben worden waren, erfolgte die Elektrophorese unter ständiger Pufferumwälzung bei einer Spannung von 120 V für 3 - 4 h.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 5 - 10 min in einer Acridinorangelösung gefärbt und anschließend 3 x 15 min in Phosphatpuffer entfärbt. Die denaturierte RNA konnte im UV Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.4.12 „Northern blot“ Analyse

- Transfer von RNA auf Nylonmembranen:

Transferpuffer: 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat x 2 H₂O
 pH mit NaOH auf 7,0 einstellen

Im Anschluss an die Färbung der RNA erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran. Hierzu wurde eine Gelgießkammer mit der offenen Seite nach unten in eine große Wanne gestellt, welche etwa 1 cm hoch mit Transferpuffer gefüllt war. Auf die Gelkammer wurde ein mit Transferpuffer befeuchtetes Filterpapier (Whatman, 3 mm) gelegt, dessen Enden in die Pufferlösung tauchten. Das Gel wurde mit den Taschen nach oben auf das Filterpapier gelegt, darauf wurden ein genau zugeschnittener Nylonfilter sowie zwei mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. Es folgte ein Stapel saugfähiges Papier, der mit einem Gewicht von etwa 1 kg beschwert wurde. Durch die Kapillarkräfte des Papiers wurde die Transferlösung innerhalb von mindestens 12 h durch das Gel gesaugt und die RNA auf die Nylonmembran transferiert (Sambrook et al., 1989). Der ebenfalls bei der Elektrophorese aufgetrennte RNA Größenstandard wurde auf der Membran unter einer UV Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und mit einem Kugelschreiber markiert. Zur Fixierung der RNA und zur Deaktivierung des Glyoxal, das die Hybridisierung beeinträchtigen würde, wurde die Membran für 2 – 4 h bei 80°C im Vakuum „gebacken“.

- RNA/DNA Hybridisierung:

Hybridisierungslösung:

1 mM EDTA
 7% SDS (w/v)
 0,25 M NaH₂PO₄ x H₂O
 0,25 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O

Waschlösung:

40 mM Phosphatpuffer, pH 7,0
 1 mM EDTA
 1% bzw. 5% SDS (w/v)

Die Hybridisierung wurde in Glasröhren durchgeführt, die sich in speziellen, temperierbaren Wärmeschranken langsam drehen. Je nach Art der nachzuweisenden RNA betrug die Hybridisierstemperatur 65°C (homologe Hybridisierung) oder 50°C (heterologe Hybridisierung). Die verwendeten Lösungen wurden jeweils entsprechend vorgewärmt. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde der Nylonfilter zunächst mit Hybridisierungslösung für 2 x 20 min vorhybridisiert. Danach wurde die Lösung verworfen und durch frische Hybridisierungslösung ersetzt, die die hitzedenaturierte radioaktive Sonde enthielt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Anschließend wurde der Filter 30 min in 1% SDS (w/v) enthaltender Waschlösung und 2 x 30 min in 5% SDS (w/v) enthaltender Waschlösung gewaschen, getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

2.2.5 Weitere Nukleinsäuretechniken

2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase (RT-PCR)

Für die Durchführung einer RT-PCR wird zunächst RNA mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ in eine komplementäre cDNA umgeschrieben. Der auf diese Weise erhaltene cDNA Erststrang kann dann mittels einer Polymerasekettenreaktion in doppelsträngige cDNA überführt und amplifiziert werden.

2 x PCR-Puffer:

50 mM Tris/HCl, pH 8,3
150 mM KCl
5,0 mM MgCl₂
0,5 mM dNTPs

RT-Mix:

5,0 µl 2 x PCR-Puffer
0,5 µl RNAGuard (15 U)
0,5 µl Reverse Transkriptase (50 U)

PCR-Mix:

5,0 µl 2 x PCR-Puffer
30 pM Plusstrang-Primer
Taq-DNA-Polymerase (2 U)
mit H₂O bidest auf 7,5 µl auffüllen

2,5 µg Gesamtzell-RNA und 10 pMol Minusstrang Primer wurden mit 15 µl 2 x PCR-Puffer versetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 37,5 µl aufgefüllt. Die nachfolgenden Schritte wurden in einem Thermocycler (Fa. Perkin-Elmer) durchgeführt. Der Ansatz wurde 3 min bei 92°C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 5,5 µl RT-Mix erfolgte die reverse Transkription bei 37°C für 1 h. Anschließend wurden 7,5 µl PCR-Mix zugegeben und die PCR gestartet. Es wurden folgende Zyklusparameter verwendet:

Denaturierung:	94°C, 30 sec
Annealing:	56°C, 30 sec
Elongation:	72°C, 60 sec
Zahl der Zyklen:	5 x 50°C, 30 x 56°C

2.2.5.2 Durchsuchung („screening“) einer cDNA-Bank

In dieser Arbeit wurde eine kommerziell erhältliche Lambda Phagenbank verwendet, die cDNA „inserts“ von einer Länge bis zu 10 kB aus boviner Milzzell mRNA enthielt (Fa. Stratagene). Im Uni-ZAP XR Vektor war die bovine cDNA in 5'→3' Orientierung zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI enthalten (siehe Abbildung 1). Die zur Amplifikation der cDNA Bank benötigten Wirtszellen (*E. coli* Stamm XL1-Blue) sowie der für die „in vivo excission“ notwendige M13 Helferphage („ExAssist helper phage“) und die entsprechenden Wirtszellen (*E. coli* Stamm SOLR) wurden mit der Phagenbank mitgeliefert.

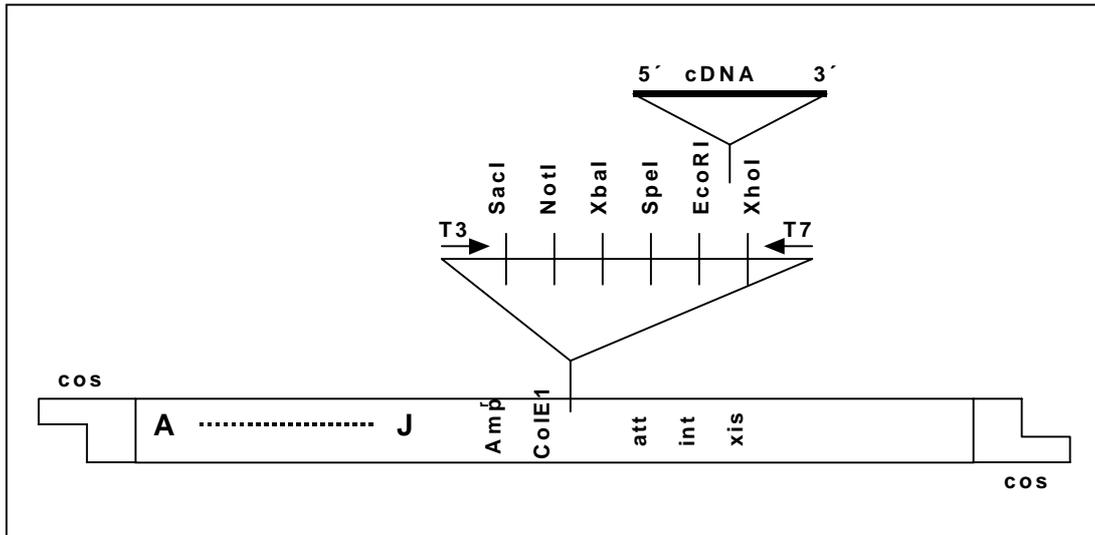


Abb. 1: Schematische Darstellung des Lambda Phagenvektors Uni-Zap XR

Darstellung des Lambda Uni-Zap XR Genoms: Die Polylinker Region, die von den RNA Polymerase Promotoren der Phagen T3 und T7 flankiert wird, ist über dem Genom vergrößert dargestellt. Die cDNA befindet sich zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI. A bis J zeigt Lage der Proteine des Lambda Phagen. Durch att, int und xis ist die Lage weiterer Proteine des Lambda Phagen (att: „attachment“, int: „integrase“ und xis: „excisionase“) angedeutet. Amp kennzeichnet die Lage des β -Lactamasegens (Ampicillin Resistenzgen). ColE1 steht für das Startsignal der Replikation („origin of replication“) des Plasmids ColE1. Cos steht für die „cohesive sites“ an beiden Endes des Lambda Uni-Zap XR Genoms.

Der Uni-ZAP XR Vektor enthält das pBluescript SK (-) Phagemid, das von den Replikationsstart- bzw. stopsignalen (ori M13 Initiator bzw. ori M13 Terminator) eines filamentösen Helferphagen flankiert ist. Auf diese Weise konnte aus Uni-ZAP XR Vektoren, die in *E. coli* XL1-Blue Zellen amplifiziert worden waren, positive cDNA durch Koinfektion mit einem M13 Phagen („ExAssist helper phage“) gewonnen werden. Dieser Phage enthält eine Mutation, die seine Replikation im *E. coli* Stamm SOLR verhindert. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass nur das ausgeschnittene pBluescript SK (-) Phagemid und nicht das M13 Phagen genom amplifiziert wird. Am Ende dieser „*in vivo* excission“ genannten Methode lagen positive cDNA „inserts“ in einem zirkulären, einsträngigen pBluescript SK (-) Plasmid vor und konnten unter Verwendung von spezifischen „primern“ direkt sequenziert werden. Eine schematische Darstellung der „*in vivo* excission“ ist in Abbildung 2 dargestellt.

- Ausplattierung der Phagenbank

Der Titer der Phagenbank auf den Wirtszellen (XL1-Blue) wurde gemäß den Herstellerangaben berechnet. Zum „screening“ wurden 600 μ l einer Wirtszell-Suspension ($OD_{600} = 0,5$) mit einer Verdünnung der Phagenbank auf 30 LB-Agarplatten 150 cm^2 ausplattiert, so dass etwa 5×10^4 pfu pro Platte enthalten waren. Nach der Bedeckung der Platten mit 6,5 ml Top-Agar wurden sie für 8 – 12 h bei 37°C inkubiert und dann für 2 h bei 4°C abgekühlt, um ein Kleben der Nitrozellulosefilter am Agar zu vermeiden.

- Transfer der Phagen-DNA auf „Replikafilter“

Denaturierungslösung:

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung:

1,5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl, pH 8,0

Waschlösungen:

A: 0,2 M Tris/HCl, pH 7,5
B: PBS

Zum Transfer wurden zugeschnittene Nitrozellulosefilter für 2 min auf die Platten aufgelegt, wobei die Orientierung durch unsymmetrische Einstiche mit einer Pipettenspitze festgehalten wurde. Durch 2-minütiges Eintauchen der Filter in Denaturierungslösung wurde die übertragene DNA denaturiert und anschließend 5 min lang neutralisiert. Nach kurzem Waschen (je 30 sec) in Waschlösung A und B wurden die Nylonfilter getrocknet und für 1,5 h bei 80°C „gebacken“. Die entsprechenden Agarplatten wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

- DNA/DNA Hybridisierung

Hybridisierungslösung:

1 mM EDTA
20 mM NaH₂PO₄
20 mM Na₂HPO₄
7% SDS (w/v)
mit NaOH pH 7,2 einstellen

Waschlösung:

1 mM EDTA
20 mM NaH₂PO₄
20 mM Na₂HPO₄
1% bzw. 5% SDS (w/v)
mit NaOH pH 7,2 einstellen

SM-Phagenpuffer:

5,8 g/l NaCl
2,0 g/l MgSO₄ x H₂O
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,01 % Gelatine (w/v)

Die Hybridisierung wurde analog zu 2.2.4.12 durchgeführt. Die Vorhybridisierung erfolgte für 2 x 1 h bei 60°C. Die hitzedenaturierte, radioaktive Sonde wurde in einer Konzentration von etwa 1x10⁷ cpm/Filter der Hybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C. Anschließend wurde der Filter 2 x 15 min in 1% SDS (w/v) enthaltender Waschlösung und 2 x 30 min in 5% SDS (w/v) enthaltender Waschlösung (vorgewärmt auf 60°C) gewaschen, getrocknet und autoradiographisch ausgewertet. Die entsprechenden positiven Phagen-„plaques“ wurden ausgestochen, in 500 µl SM-Phagenpuffer aufgenommen, 20 µl Chloroform zugegeben und die Lösung bei 4°C gelagert.

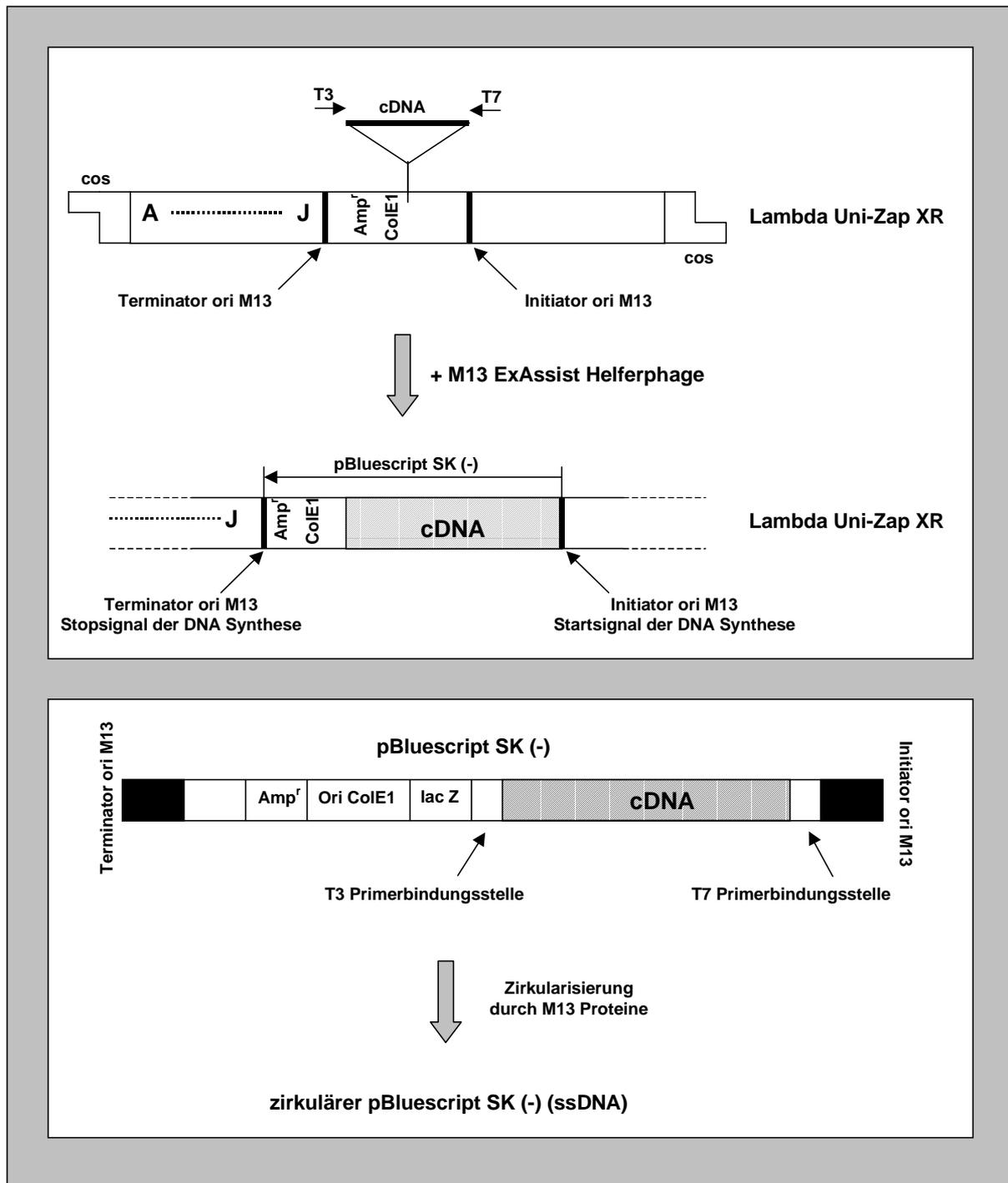


Abb. 2: Schematische Darstellung der „*in vivo* excision“

A: Darstellung des Lambda Uni-Zap XR Genoms (Bezeichnungen siehe Abb. 1). Initiator- und Terminator-ori M13 bezeichnen Signalsequenzen für den Start bzw. das Ende des M13 Phagen. Durch Genprodukte des M13 „Exassist“ Helferphagen wird die im Lambda Phagengenom enthaltene Sequenz des pBluescript SK (-) Phagemids repliziert.

B: Darstellung des Plasmids pBluescript SK (-). Die einzelsträngige cDNA ist durch T3 und T7 „primer“-Bindungsstellen von beiden Seiten für die Sequenzierung zugänglich.

- „*in vivo* excision“

Sowohl XL1-Blue Zellen als auch SOLR Zellen wurden nach Angaben des Herstellers herangezogen. In einem 15 ml „bluecap“ Röhrchen wurden 200 µl XL1-Blue Zellen, 100 µl der zuvor erhaltenen Phagenlösung und 1 µl des „ExAssist“ Helferphagen für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml LB-Medium wurde für weitere 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Abzentrifugation der Zellen gefolgt von einer Erhitzung des Überstands (15 min 70°C) zur Inaktivierung der *E. coli* Zellen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand, der den pBlueskript Vektor mit „inserts“ boviner cDNA, verpackt in Helferphagen-Partikeln, enthielt, in ein steriles 15 ml „bluecap“-Röhrchen dekantiert. 10 - 100 µl dieser Lösung wurden zu 200 µl SOLR Zellen gegeben, für 15 min bei 37°C inkubiert und auf LB-Agarplatten, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert. Über Nacht heranwachsende Kolonien enthielten den pBlueskript Vektor mit je einem klonierten „insert“ aus der cDNA boviner Milzzellen.

2.2.5.3 Sequenzierung von Plasmid DNA

Plasmid DNA wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger et al., 1977). Diese Methode beruht darauf, dass die zu sequenzierende, als Einzelstrang vorliegende DNA ausgehend von einem Oligonukleotid „primer“ durch eine DNA Polymerase zu einem Doppelstrang ergänzt wird. Bei der DNA Synthese werden durch den Einbau von Dideoxynukleotiden statistisch verteilte Kettenabbrüche gesetzt. Hierdurch erhält man alle möglichen Fragmentlängen, die mit Hilfe einer hochauflösenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese voneinander getrennt dargestellt werden können. Hier wurde das „Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Markierung der DNA erfolgte hierbei über Fluoreszenzfarbstoff-markierte „primer“. Die Sequenzierungsreaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Analyse der unterschiedlich langen DNA Fragmente erfolgte mit dem DNA Sequenzierautomaten Li-Cor 4000L (Fa. MWG Biotech). Die als Buchstabensequenz verfügbaren Daten wurden mit Hilfe von Computerprogrammen (DNA Strider, DNA Star, Megalign) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Antikörpern und Antigenen

3.1.1 Charakterisierung der Antikörper

3.1.1.1 Typisierung und Reinigung

Bei den folgenden Untersuchungen sollten definierte Mengen der mAk 17, mAk 26 und mAk 27 unter standardisierten Versuchsbedingungen eingesetzt werden. Zu diesem Zweck musste vorerst die Isolierung aus den Zellkulturüberständen und eine Anreicherung erfolgen. Hierzu müssen Kenntnisse über den Typ der entsprechenden Antikörper vorliegen. Vorläufige Experimente hatten ergeben, dass es sich bei allen drei Antikörpern um IgG Moleküle handelt. Da für die Auswahl effektiver Anreicherungsverfahren jedoch auch die Subklasse der Antikörper ausschlaggebend ist, erfolgte zunächst die Typisierung der mAk 17 (IgG2a), mAk 26 (IgG1) und mAk 27 (IgG2a) mit einem kommerziellen Maus-IgG Typisierungs-Kit (siehe 2.2.2.1). Aufgrund der spezifischen Bindungseigenschaften dieser Maus IgG-Subklassen (Harlow & Lane, 1988) ergab sich die Verwendung von ProteinA-gekoppelter Sepharose für die Isolierung von mAk 17 und mAk 27. mAk 26 konnte dagegen nur an ProteinG-gekoppelte Sepharose gebunden werden. Die Reinigung wurde wie in 2.2.2.2 beschrieben erfolgreich durchgeführt. Am Ende der Reinigungsprozedur lagen alle drei mAk in einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml vor. In Immunpräzipitations-Experimenten (siehe 2.2.2.6) konnte bestätigt werden, dass die isolierten mAk aktiv und spezifisch waren.

3.1.1.2 Infektionshemmung durch mAk 17, mAk 26 und mAk 27

Zur Bestätigung der Hemmung der BVDV Infektion (Schelp et al., 1995) wurden die oben erhaltenen Präparationen von gereinigten Antikörpern eingesetzt. Hierbei konnten die infektionshemmenden Effekte definierter Mengen der drei mAk untersucht und miteinander verglichen werden. Das hierzu verwendete System bestand aus Zellen der bovinen Nierenzelllinie MDBK und dem BVD Virus NADL. Wie im Methodenteil beschrieben (2.2.1.6) wurden die Zellen zuerst mit unterschiedlichen Konzentrationen der mAk inkubiert

und danach mit verschiedenen Verdünnungen virushaltiger Zellkulturüberstände infiziert. Die Anzahl der infektiösen Einheiten (IE) pro Ansatz wurde als Infektionsdosis bezeichnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die Infektion von MDBK Zellen mit dem BVD Virus NADL konnte wie erwartet mit allen drei mAk effektiv gehemmt werden. Es blieb jedoch sowohl bei Verwendung niedriger Infektionsdosen als auch hoher Antikörperkonzentrationen eine Restinfektiosität bestehen. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurden die Hemmungseffizienzen der mAk unter Verwendung der Infektionsdosis und den ausgezählten „plaques“ mit Hilfe der Formel

$$100 - ((100 : \text{Infektionsdosis}) \times \text{ausgezählte „plaques“}) = \text{Hemmungseffizienz}$$

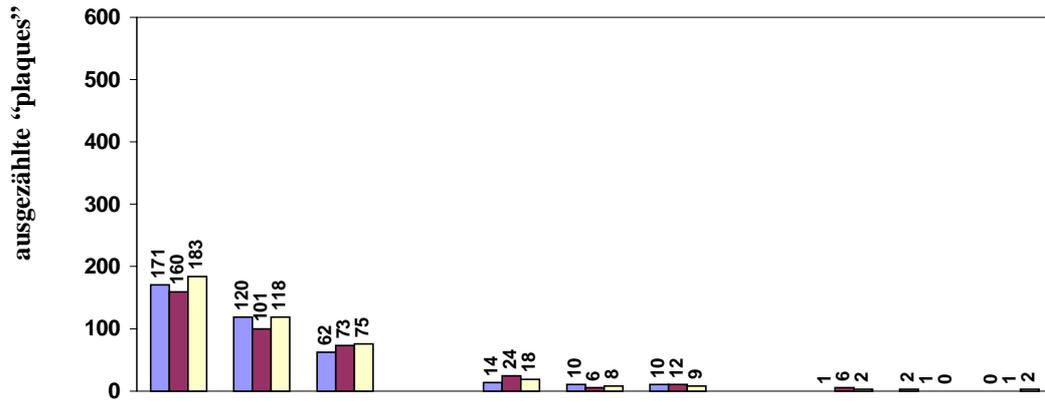
berechnet und anschließend die Mittelwerte gebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Nach der Vorinkubation von 2×10^6 Zellen mit jeweils $0,5 \mu\text{g}$ der isolierten mAk 17, mAk 26 und mAk 27 konnten bei der Verwendung von $1,7 \times 10^2$ IE Hemmungseffizienzen von 98,24%, 96,47% bzw. 97,25% ermittelt werden. Interessanterweise blieb bei konstanter Antikörpermenge die Hemmungseffizienz auch bei 10- bzw. 100-facher Infektionsdosis annähernd gleich. Sowohl bei der Infektion mit $1,7 \times 10^3$ IE als auch mit $1,7 \times 10^4$ IE lag der Infektionserfolg nach Vorinkubation mit mAk ebenfalls bei 1 - 2%. Eine vollständige Blockierung der Infektion konnte auch durch die bis zu 10-fache Steigerung der mAk-Konzentration nicht bewirkt werden, sondern es blieb eine nicht hemmbare Restinfektion bestehen.

Folgende Seite:

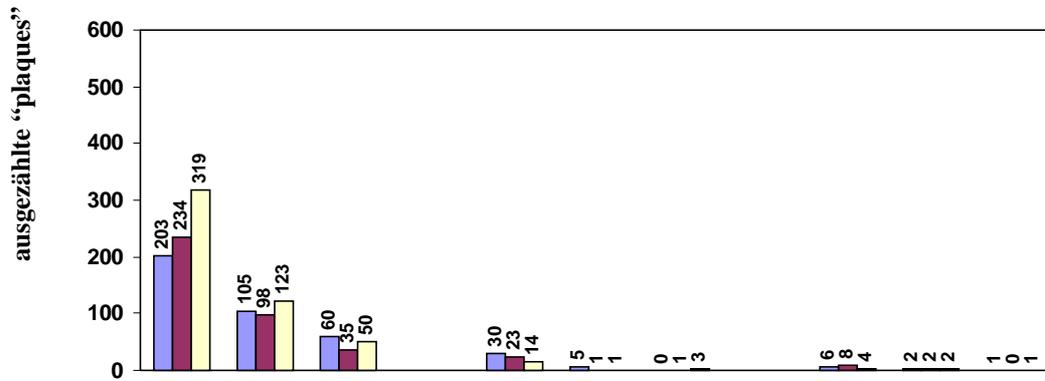
Abb. 3: Hemmung der Infektion von MDBK Zellen mit BVDV NADL durch mAk

MDBK Zellen in 12-„well“ Zellkulturschalen (2×10^6 Zellen/„well“) wurden zunächst mit $0,5$, $1,0$ und $5,0 \mu\text{g}$ mAk 17, mAk 26 und mAk 27 inkubiert und anschließend mit je $200 \mu\text{l}$ verschiedener Virusverdünnungen (BVDV NADL) infiziert. Der Ausgangstiter der Viruslösung betrug $8,5 \times 10^6$ IE/ml. Der Infektionserfolg konnte nach 24-stündiger Inkubationszeit durch den Nachweis viralen Antigens auf der Oberfläche der fixierten Zellen („plaques“) beurteilt und durch Auszählen quantifiziert werden. Die Anzahl der gezählten „plaques“ von jeweils drei Bestimmungen sind in einzelnen Balken dargestellt.

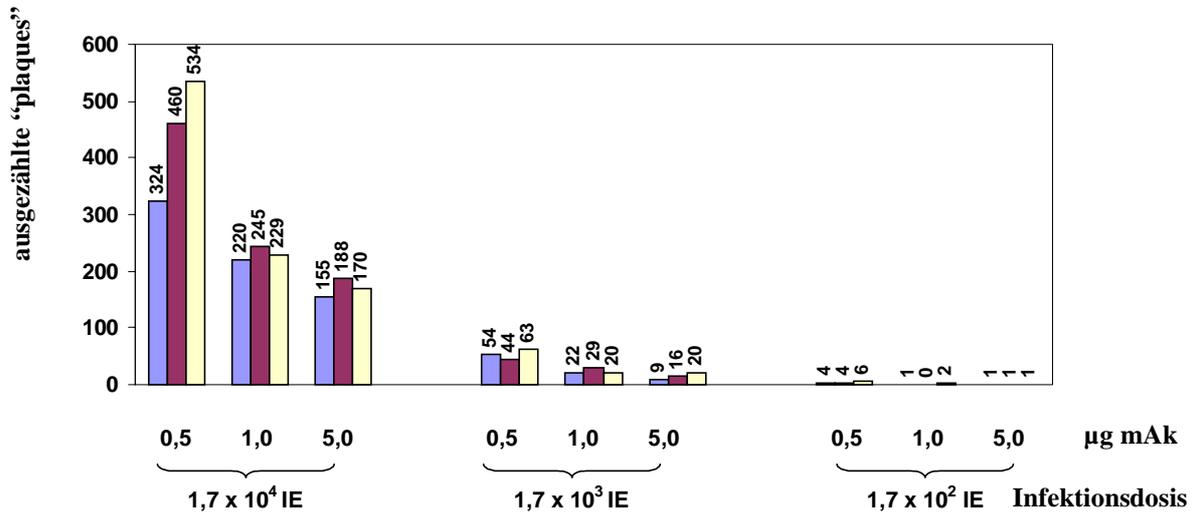
mAk 17



mAk 26



mAk 27



Tab. 2: Hemmungseffizienzen der mAk 17, mAk 26 und mAk 27 auf die Infektion mit BVDV NADL

	$\mu\text{g mAk/Ansatz}^{\text{a)}$	Hemmungseffizienz [%] ^{b)}		
		$1,7 \times 10^2 \text{ IE/Ansatz}^{\text{c)}$	$1,7 \times 10^3 \text{ IE/Ansatz}^{\text{c)}$	$1,7 \times 10^4 \text{ IE/Ansatz}^{\text{c)}$
mAk 17	0,5	98,24 (1,56)	98,90 (0,30)	98,99 (0,07)
	1,0	99,41 (0,59)	99,53 (0,12)	99,34 (0,06)
	5,0	99,41 (0,59)	99,39 (0,09)	99,59 (0,04)
mAk 26	0,5	96,47 (1,18)	98,69 (0,47)	98,52 (0,35)
	1,0	98,82 (0,00)	99,86 (0,14)	99,36 (0,08)
	5,0	99,61 (0,34)	99,92 (0,09)	99,72 (0,07)
mAk 27	0,5	97,25 (0,68)	96,84 (0,56)	97,42 (0,63)
	1,0	99,41 (0,59)	98,61 (0,28)	98,64 (0,07)
	5,0	99,41 (0,00)	99,12 (0,33)	98,99 (0,10)

a) Ein Ansatz entspricht einer Vertiefung einer 12-,well“ Zellkulturschale (2×10^6 Zellen).

b) Die Hemmungseffizienz wurde mit der Formel $100 - ((100 : \text{Infektionsdosis}) \times \text{ausgezählte „plaques“}) = \text{Hemmungseffizienz [\%]}$ berechnet (Infektionsdosis = IE/Ansatz). Bei den angegebenen Prozentwerten handelt es sich um den Mittelwert aus drei Bestimmungen. In Klammern ist die entsprechende Standardabweichung angegeben.

c) Eine infektiöse Einheit (IE) entspricht dem Volumen an virushaltiger Lösung, das auf kultivierten Zellen ein infiziertes Zellareal („plaque“) hervorruft.

Als entscheidend für eine erfolgreiche Virushemmung durch mAk erwies sich die Reihenfolge, in der die Zellen mit mAk bzw. Viruspartikeln in Kontakt gebracht wurden. Dies wurde ersichtlich, als MDBK Zellen im Gegensatz zu den oben beschriebenen Experimenten zuerst mit BVDV NADL inkubiert wurden. Dieser Schritt fand auf Eis statt, was nur die Adsorption der Viruspartikel an die Zelloberfläche, nicht aber deren aktive Aufnahme durch Endozytose zulässt. Erst danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit Antikörpern. Eine Infektionshemmung konnte in diesen Experimenten nicht beobachtet

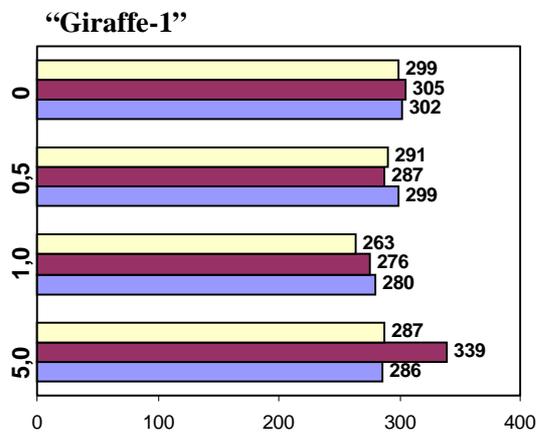
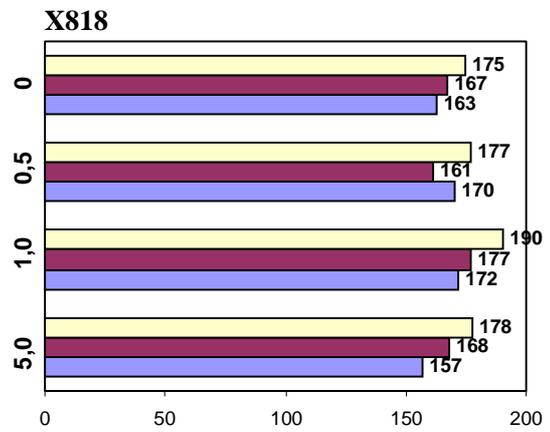
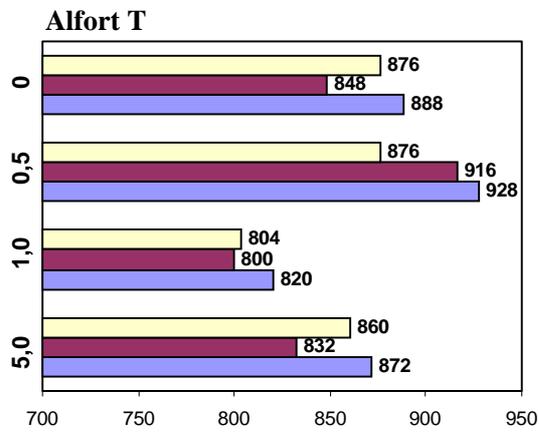
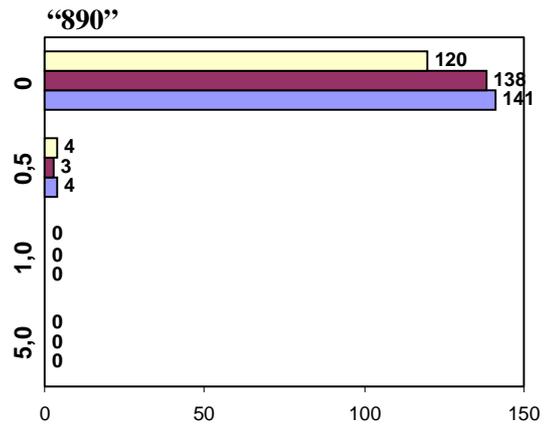
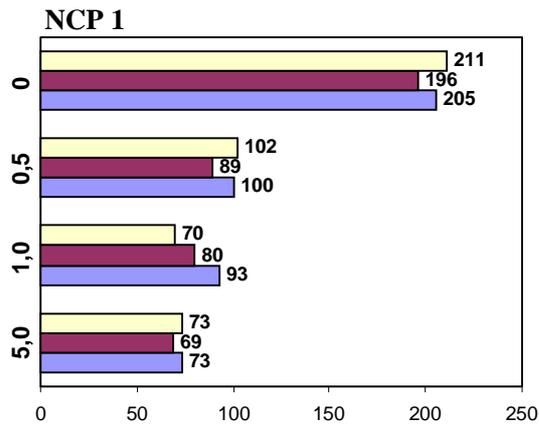
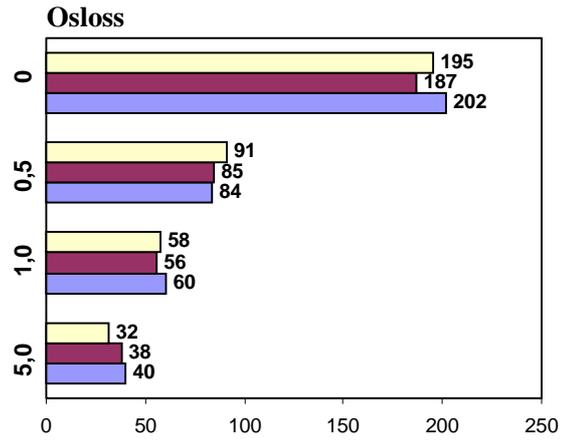
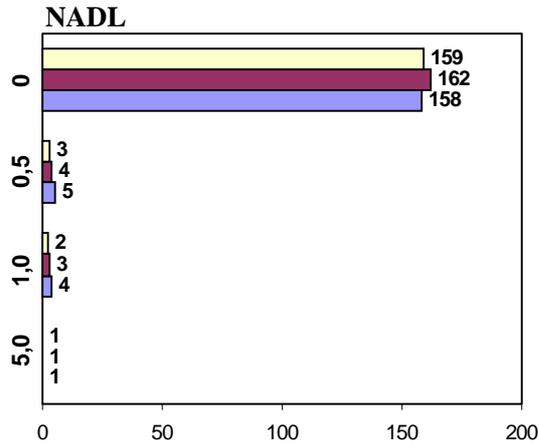
werden (Daten nicht gezeigt). Es veränderte sich jedoch die Morphologie der virusinfizierten Zellverbände, wenn die hemmenden mAk nach erfolgter Virusadsorption im Kulturmedium anwesend waren. Die virusinfizierten Zellverbände blieben in diesem Fall auch nach längerer Inkubationszeit kleiner und kompakter. In Anwesenheit der mAk konnte es nicht zu der Neuinfektion einzelner, weiter entfernt gelegener Zellen über das Kulturmedium kommen. Vielmehr schien die Ausbreitung der Infektionsherde in der Hauptsache durch Zellteilung und die Infektion direkt benachbarter Zellen stattzufinden.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob neben den von Schelp et al. (1995) beschriebenen BVDV Stämmen auch andere Virusisolate gehemmt werden, zumal nicht bekannt war, ob die Hemmung auch bei anderen Pestiviruspezies auftritt. Für die Bestimmung der Infektionshemmung verschiedener BVD Viren wurden die Stämme NADL, Osloss, und NCP 1 als Vertreter des BVDV I Genotyps sowie Stamm „890“ als Vertreter des BVDV II Genotyps untersucht. Stellvertretend für andere Pestiviruspezies wurden der porcine CSFV Stamm Alfort T, das ovine BD-Virus X818 sowie das exotische Pestivirus „Giraffe-1“ untersucht. Die Infektionsexperimente erfolgten ebenfalls unter Verwendung von MDBK Zellen, die Hemmung wurde stellvertretend mit mAk 17 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Folgende Seite:

Abb. 4: Hemmung der Infektion von MDBK Zellen mit verschiedenen Pestiviren durch mAk 17

MDBK Zellen in 24-,well“ Zellkulturschalen (10^6 Zellen/„well“) wurden zunächst mit 0,5, 1,0 und 5,0 μg mAk 17, mAk 26 und mAk 27 inkubiert und anschließend mit je 100 μl verschiedener Virusverdünnungen infiziert. Die Infektionsdosis betrug für NADL $1,60 \times 10^2$ IE/Ansatz, für Osloss $1,95 \times 10^2$ IE/Ansatz, für NCP1 $2,04 \times 10^2$ IE/Ansatz, für „890“ $1,33 \times 10^2$ IE/Ansatz, für Alfort T $8,71 \times 10^2$ IE/Ansatz, für X818 $1,68 \times 10^2$ IE/Ansatz und für „Giraffe-1“ $3,02 \times 10^2$ IE/Ansatz. Der Infektionserfolg konnte nach 24-stündiger Inkubationszeit durch den Nachweis viralen Antigens auf der Oberfläche der fixierten Zellen („plaques“) beurteilt und durch Auszählen quantifiziert werden. Die Anzahl der gezählten „plaques“ von jeweils drei Bestimmungen sind in einzelnen Balken dargestellt.



µg mAk 17

ausgezählte “plaques”

Die Infektionen von MDBK Zellen mit allen BVD Viren (NADL, Osloss, NCP1 und „890“) konnten durch mAk 17 blockiert werden, wobei ein unterschiedliches Ausmaß der Hemmung zu beobachten war. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurden die Hemmungseffizienzen berechnet (siehe oben) und in Tabelle 3 dargestellt. Von den BVDV I Viren konnte NADL annähernd vollständig (99,41%) unterdrückt werden, während für Osloss und NCP1 nur eine partielle Hemmung (81,67% bzw. 64,17%) ermittelt werden konnte. BVDV II Stamm "890" konnte vollständig blockiert werden. Dagegen hatte mAk 17 keinen signifikanten hemmenden Effekt auf die Infektion von MDBK Zellen mit dem CSFV Stamm Alfort T, dem BD-Virus X818 und dem Pestivirus „Giraffe-1“. Die hier unter Anderem auftretenden negativen Hemmungseffizienzen sind auf Messungenauigkeiten zurückzuführen (siehe Abbildung 4 und Tabelle 3).

Tab. 3: Hemmungseffizienzen von mAk 17 auf die Infektion verschiedener Pestiviren

	Virusstamm	Infektionsdosis [IE/Ansatz ^{c)}]	Hemmungseffizienz [%] ^{b)}		
			0,5µg mAk/Ansatz ^{a)}	1,0 µg mAk/Ansatz ^{a)}	5,0 µg mAk/Ansatz ^{a)}
BVDV I	NADL	1,60 x 10 ²	97,65 (0,59)	98,24 (0,59)	99,41 (0,00)
	Osloss	1,95 x 10 ²	56,67 (1,89)	71,00 (1,00)	81,67 (2,08)
	NCP1	2,04 x 10 ²	51,50 (3,50)	59,50 (5,77)	64,17 (1,15)
BVDV II	„890“	1,33 x 10 ²	97,18 (0,44)	100,00 (0,00)	100,00 (0,00)
CSFV	Alfort T	8,71 x 10 ²	-4,21 (3,13)	7,13 (1,22)	1,76 (2,36)
BDV	X818	1,68 x 10 ²	0,39 (4,72)	-5,69 (5,47)	1,37 (6,18)
„Giraffe“	„Giraffe-1“	3,02 x 10 ²	2,56 (2,04)	9,00 (2,04)	-1,33 (10,11)

^{a)} Ein Ansatz entspricht einer Vertiefung einer 24-„well“ Zellkulturschale (10⁶ Zellen).

^{b)} Die Hemmungseffizienz wurde mit der Formel $100 - ((100 : \text{Infektionsdosis}) \times \text{ausgezählte „plaques“}) = \text{Hemmungseffizienz} [\%]$ berechnet (Infektionsdosis = IE/Ansatz). Bei den angegebenen Prozentwerten handelt es sich um den Mittelwert aus drei Bestimmungen. In Klammern ist die entsprechende Standardabweichung angegeben.

^{c)} Eine infektiöse Einheit (IE) entspricht dem Volumen an virushaltiger Lösung, das auf kultivierten Zellen ein infiziertes Zellareal („plaque“) hervorruft.

In Untersuchungen von Agnello et al. (1999) konnte für Antikörper gegen „low density lipoprotein receptor“ (LDLR) ein hemmender Effekt auf die BVDV Infektion nachgewiesen werden. Um dies mit unserem System zu überprüfen, wurden mit einem käuflichen monoklonalen Antikörper gegen den humanen LDLR, der auch das bovine Homolog erkannte, entsprechende Infektionsexperimente durchgeführt. Es konnte bei Anwendung der beschriebenen Versuchsanordnung jedoch keinerlei Infektionshemmung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Erst im Nachhinein stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei dem anti-LDLR Antikörper nicht um den gleichen monoklonalen Antikörper handelte, der in den Experimenten von Agnello et al. (1999) verwendet wurde.

Die Inhibition der BVDV Infektion durch verschiedene Glykosaminoglykane (GAG) (Heparin, Fucoidan und Dermatan-sulfat) sowie durch andere polysulfatierte Moleküle mit niedriger Molmasse (z.B. Suramin) konnte in Experimenten von Iqbal et al. (2000) gezeigt werden. Aus diesem Grund wurden die Substanzen Heparin, Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Suramin in Infektionsexperimenten von MDBK Zellen mit BVDV NADL untersucht, wobei sie zur Vorinkubation der Wirtszellen verwendet wurden. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Wirtszellen vor der Infektion mit Enzymen behandelt wurden, die Zelloberflächenglykosaminoglykane spalten (Heparinase, Chondroitinase). In keinem dieser Experimente konnte jedoch eine Hemmung der Virusinfektion nachgewiesen werden. Die Vorbehandlung der Zellen mit Heparinase oder Chondroitinase führte sogar zu einer Steigerung der Infektionseffizienz (Daten nicht gezeigt). Durch eine kombinierte Behandlung der Zellen mit mAk 17 und GAG bzw. GAG-spaltenden Enzymen veränderte sich die Hemmungseffizienz des mAk 17 nicht.

3.1.2 Charakterisierung der Antigene

3.1.2.1 Darstellung der Antigene mittels Immunpräzipitation und Analyse auf N-Glykosylierung

Mit Hilfe dreier mAk, die vermutlich das gleiche Epitop erkennen, konnten von Schelp et al. (1995) zwei Proteine mit apparenten Molekulargewichten von ~60 und ~93 kD auf der Oberfläche von MDBK Zellen nachgewiesen werden. Neben der Heterogenität der durch Immunpräzipitation dargestellten Banden war deren breites Erscheinungsbild bemerkenswert. Eigene Immunpräzipitationsexperimente mit mAk 17, mAk 26 und mAk 27

bestätigten diesen Befund (Abbildung 5). Wie erwartet konnten mit allen drei Antikörpern unter gleichen Bedingungen annähernd identische Proteinbandenmuster detektiert werden. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen erscheint das Molekulargewicht etwas geringer zu sein (~55 kD und ~ 88 kD), was vermutlich durch die kompaktere Konformation des nativen Proteins verursacht wurde. Das breite Erscheinungsbild der Banden konnte weder durch das Auftrennen geringerer Probenmengen noch durch verschiedene Variationen der Bedingungen während der SDS PAGE verändert werden (Daten nicht gezeigt).

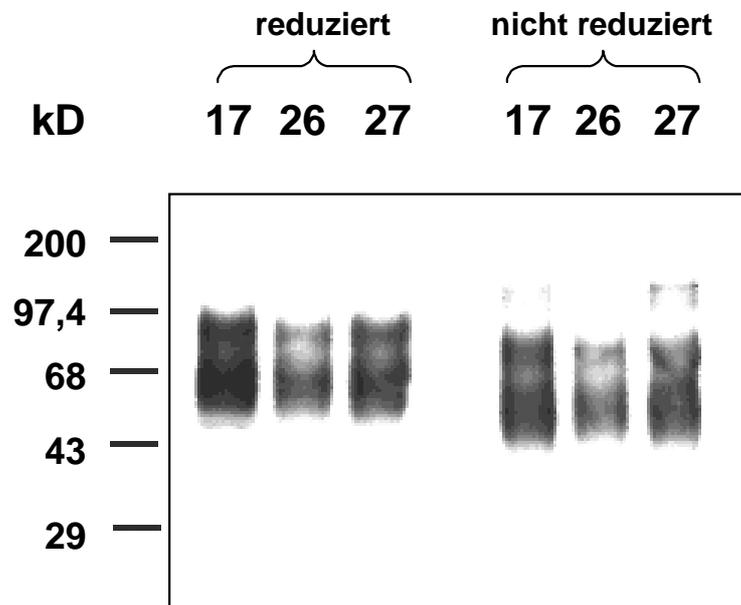


Abb. 5: Immunpräzipitation von biotinylierten MDBK Zelloberflächenmolekülen mit mAk

Die Proteine in Lysaten oberflächenbiotinylierter MDBK Zellen wurden mit drei mAk immunpräzipitiert. Bei der Anwendung von reduzierenden Bedingungen wurden die Immunpräzipitate durch Zugabe von 5% β -Mercaptoethanol und Erhitzung (5 min bei 95°C) reduziert. Die Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte in einer SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1997), wobei das Trenngel 7,5% Acrylamid enthielt. Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten Proteine erfolgte durch Nachweis von Streptavidin-Peroxidase Komplexen mit Hilfe von Chemilumineszenz, die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

Vor der Präparation großer Mengen der gesuchten Oberflächenproteine sollten einige wichtige Aspekte ihrer Struktureigenschaften, die für die Immunaффinitätschromatographie von Bedeutung sein können, untersucht werden. Zunächst stellte sich auch die Frage, weshalb in der Immunpräzipitation mehrere Proteinbanden detektiert werden konnten, obwohl einzelne mAk verwendet wurden. Das Vorkommen unterschiedlich großer Varianten eines Proteins kann durch heterogene Verteilung posttranslationaler Modifikationen wie der N-Glykosylierung verursacht werden. Plasmamembranproteine tragen häufig N-gebundene Oligosaccharide. Zusammen mit den wesentlich kürzeren O-gebundenen Oligosacchariden bilden sie die Glykocalyx. Durch den Einsatz der Endoglykosidase PNGase F können N-gebundene Zucker auch in Anwesenheit von Detergentien leicht nachgewiesen werden. Die Spaltstelle des Enzyms liegt direkt neben dem Asparagin des Polypeptidgerüsts, so dass die komplexe Zuckerkette als Ganzes entfernt wird. Sind N-Glykosylierungen in einem Protein vorhanden, so ist dies an einer Änderung („shift“) des apparenten Molekulargewichts erkennbar. Immunpräzipitate oberflächenmarkierter MDBK Zellysate wurden mit PNGase F behandelt und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.2.4). In Abbildung 6 ist die durch De-N-Glykosylierung hervorgerufene Molekulargewichtsverschiebung der Antigene unter Verwendung von Immunpräzipitaten des mAk 17 dargestellt.

Durch Spaltung mit PNGase F reduzierten sich die apparenten Molekulargewichte beider Antigenbanden des mAk 17 im Vergleich mit dem unbehandelten Immunpräzipitat um 20 - 25 kD (Abbildung 6). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass beide Antigenbanden des mAk 17 N-gebundene Oligosaccharide enthielten. Eine Erklärung für das Auftreten mehrerer Banden konnte durch die Entfernung N-gebundener Zuckerketten jedoch nicht gefunden werden, da das Erscheinungsbild der Antigene hierdurch sogar noch heterogener wurde. Während aus der 93 kD Bande offenbar zwei Banden von etwa 70 kD und 65 kD hervorgingen, betrug das Molekulargewicht der 60 kD Bande nach PNGase F Behandlung etwa 42 kD. Zusätzlich erschien eine neue, allerdings sehr schwache Antigenbande bei etwa 50 kD.

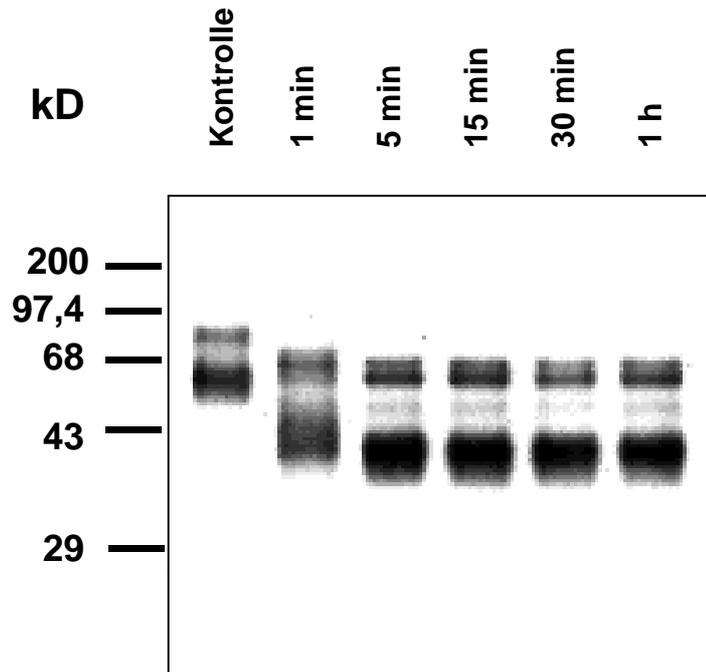


Abb. 6: Nachweis von N-gebundenen Zuckerketten in Immunpräzipitaten von mAk 17 durch PNGase F

Biotinylierte MDBK Zelloberflächenproteine wurden mit mAk 17 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden durch Zugabe von 2% SDS und 5% β -Mercaptoethanol und Erhitzung (5 min bei 95°C) denaturiert. Die Enzymreaktion wurde in verschiedenen Ansätzen durch Zugabe von PNGase F gestartet, bei 37°C inkubiert und nach 1 min, 5 min, 15 min, 30 min und 1 h durch Aufkochen gestoppt (2.2.2.7). Neben diesen Ansätzen wurde eine Probe des Immunpräzipitats vor der Zugabe von PNGase F in der SDS-PAGE aufgetrennt (Kontrolle). Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten Proteine erfolgte durch Nachweis von Streptavidin-Peroxidase Komplexen mit Hilfe von Chemilumineszenz. Die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

3.1.2.2 Analyse der Antigene bezüglich ihrer Verankerung in der Zytoplasmamembran

Für die Optimierung der Bedingungen während einer Proteinreinigung ist die Kenntnis über die Art der Wechselwirkung von Zelloberflächenproteinen mit der Zytoplasmamembran ein wichtiger Aspekt. Hierbei ist die Existenz von hydrophoben Strukturen ausschlaggebend. Diesbezüglich unterscheiden sich integrale Membranproteine (Transmembranproteine) und solche, die mittels eines Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Ankers in der Membran festgehalten werden, von peripheren Membranproteinen. Integrale Membranproteine enthalten hydrophobe Bereiche, die mit den Lipiden der Membran in

Wechselwirkung treten. GPI-Anker, die kovalent am C-Terminus des Proteins gebunden sind, bestehen aus einem glykosylierten Phosphatidylinositol, das zwei Fettsäuren trägt. Periphere Membranproteine dagegen sind durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen verbunden, enthalten aber selbst keine hydrophoben Strukturregionen. Die Existenz von Transmembrandomänen und GPI-Ankern in Proteinen kann durch ihre Löslichkeit in dem Detergens Triton X-114 (TX-114) nachgewiesen werden. Ausgelöst durch Temperaturänderung findet in TX-114 Lösungen eine Phasentrennung statt, wobei Proteine, die hydrophobe Regionen enthalten, von löslichen Proteinen abgeschieden werden (Bordier, 1981). Um untersuchen zu können, ob die gesuchten Membranproteine mittels hydrophober Wechselwirkungen in der Zellmembran verankert sind, wurden oberflächenmarkierte MDBK Zellen in TX-114-haltigem Puffer lysiert, die Lysate einer Phasentrennung unterworfen und anschließend auf den Gehalt von mAk 17 Antigenen untersucht (2.2.2.8). In Abbildung 7 ist das Ergebnis dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Antigene nach der Phasentrennung aus der Detergens-verarmten Phase verschwunden waren (Spur 2) und sich in der Detergens-angereicherten Phase konzentriert hatten (Spur 3). Zur Kontrolle wurde Zelllysat vor der Phasentrennung untersucht (Spur 1). Durch Anwendung dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Antigene mittels hydrophober Wechselwirkungen in der Plasmamembran verankert sind. Es handelt sich demnach nicht um periphere Zelloberflächenproteine, sondern um Proteine, die ein hydrophobes Strukturelement wie eine Transmembrandomäne oder einen GPI-Anker enthalten. Für die Reinigung bedeutet dies in beiden Fällen, dass die Anwesenheit von Detergens bei allen Schritten erforderlich ist.

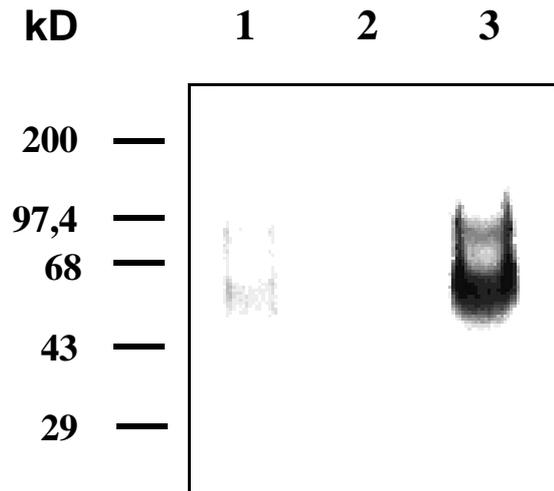


Abb. 7: Nachweis der Zytoplasmaverankerung der Antigene von mAk 17

Oberflächenbiotinylierte MDBK Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml 1% Triton X-114 lysiert und das Lysat geklärt. Eine temperaturabhängige Phasentrennung fand in 2% Triton X-114 für 10 min bei 37°C statt. Durch niedertourige Zentrifugation wurden die Phasen getrennt (800 µl Detergens-verarmte Phase, 200 µl Detergens-angereicherte Phase) (2.2.2.8). Der Nachweis der Antigene in 80 µl Detergens-verarmter Phase (Spur 2) bzw. 20 µl Detergens-angereicherter Phase (Spur 3) fand durch Immunpräzipitation mit mAk 17 und anschließender SDS-PAGE statt. Spur 1 zeigt das Immunpräzipitat von 20 µl Zelllysat vor der Phasentrennung, das zur Kontrolle mitanalysiert wurde. Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten Proteine erfolgte durch Nachweis von Streptavidin-Peroxidase Komplexen mit Hilfe von Chemilumineszenz, die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

3.1.2.3 Darstellung der Antigene in der „Western blot“ Analyse

Als Ausgangspunkt für die angestrebte Proteinreinigung sollte zunächst eine Darstellungsmethode gefunden werden, die den Nachweis der gesuchten Proteine auf einfache Weise ermöglicht. Bislang war nur der Nachweis der markierten Proteine nach einer Immunpräzipitation gelungen (Schelp et al., 1995). Wünschenswert war indes eine Nachweismethode, die keine vorausgehende Markierung erfordert, da bei einer Proteinreinigung zum Zwecke der Aminosäuresequenzierung mit großen Mengen an Ausgangsmaterial gerechnet werden muss. Nach wie vor stellte sich auch die Frage nach der Ursache für das Auftreten zweier Proteinbanden. Im Vorfeld der Reinigung sollte abgeklärt werden, ob das Epitop der mAk in beiden Banden enthalten war, oder ob aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen die Kopräzipitation eines Fremdproteins stattfand. Zur Beantwortung beider Fragestellungen bot sich die Verwendung der mAk in einer „Western blot“ Analyse an. Allerdings war zuvor berichtet worden, dass „Western blot“ Analysen mit

den mAk nicht erfolgreich gewesen waren (Schelp et al., 1995). Die Proben wurden zunächst mittels SDS denaturiert, wobei sowohl reduzierende als auch nicht-reduzierende Bedingungen gewählt wurden, und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Immobilisierung der Proteine auf Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion mit Hilfe der mAk 17, mAk 26 und mAk 27. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt.

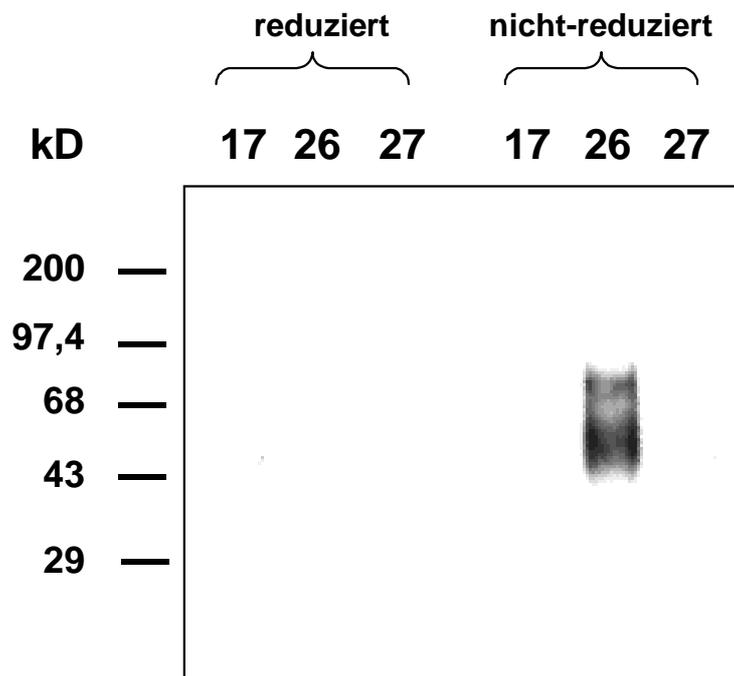


Abb. 8: „Western blot“ Analyse von MDBK Zellysaten

MDBK Zellen wurden lysiert und in 2% SDS („nicht-reduziert“) bzw. 2% SDS + 5% β -Mercaptoethanol („reduziert“) aufgekocht (5 min 95°C) und in jeweils 3 Spuren einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran entsprechend der Spuren in Streifen geschnitten und mit Hybridomüberstand der mAk 17, mAk 26 und mAk 27 inkubiert. Die Detektion der gebundenen mAk erfolgte über Bindung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Spezies Antikörpers und anschließende Chemilumineszenz. Die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

Wenn die Proteine der MDBK Zellen unter nicht-reduzierenden Bedingungen denaturiert worden waren, konnte mAk 26, nicht aber mAk 17 und mAk 27, mit den immobilisierten Antigenen reagieren (Abbildung 8). Mit mAk 26 konnten Proteinbanden detektiert werden, die sowohl im Muster als auch in ihren Molekulargewichten den Signalen entsprachen, die durch Immunpräzipitation der nicht-reduzierten Antigene erhalten werden konnten (siehe auch 3.1.2.2 Abbildung 5). Im Gegensatz zu einer Immunpräzipitation, bei der es zu einer Kopräzipitation nicht-spezifischer Proteine kommen kann, werden die Proteine bei der „Western blot“ Methode zuerst nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt und kommen erst dann mit den mAk in Berührung. Daher kann aufgrund der Darstellung beider Proteinbanden in der „Western blot“ Analyse davon ausgegangen werden, dass das Epitop von mAk 26 auf beiden Proteinspezies vorhanden ist. Nach einer Reduktion des Zelllysats mittels β -Mercaptoethanol war jedoch auch mit mAk 26 keine Erkennung mehr möglich. Hieraus kann geschlossen werden, dass es sich um ein strukturelles Epitop handelt, das durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert wird.

3.1.2.4 Analyse verschiedener Zelllinien und Gewebe auf die Expression der Antigene

• Zelllinien verschiedener Spezies

Infektionsexperimente zeigten, dass neben bovinen Zellen auch porcine Zellen infiziert werden können, wenn auch mit deutlich geringerer Effizienz (siehe auch Abschnitt 3.5). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die potentiellen Virusrezeptorproteine durch Immunpräzipitation mit mAk 17 auch auf Zellen anderer Spezies, insbesondere des Schweins, nachgewiesen werden können. Hierzu wurden Zelllinien der Spezies Schwein (PK15, 38A₁D), Hamster (BHK-21), Maus (L-Zellen), Affe (CV1) und Mensch (HeLa) verwendet. Bei keiner dieser Zelllinien konnten die Antigene nachgewiesen werden (Abbildung 9).

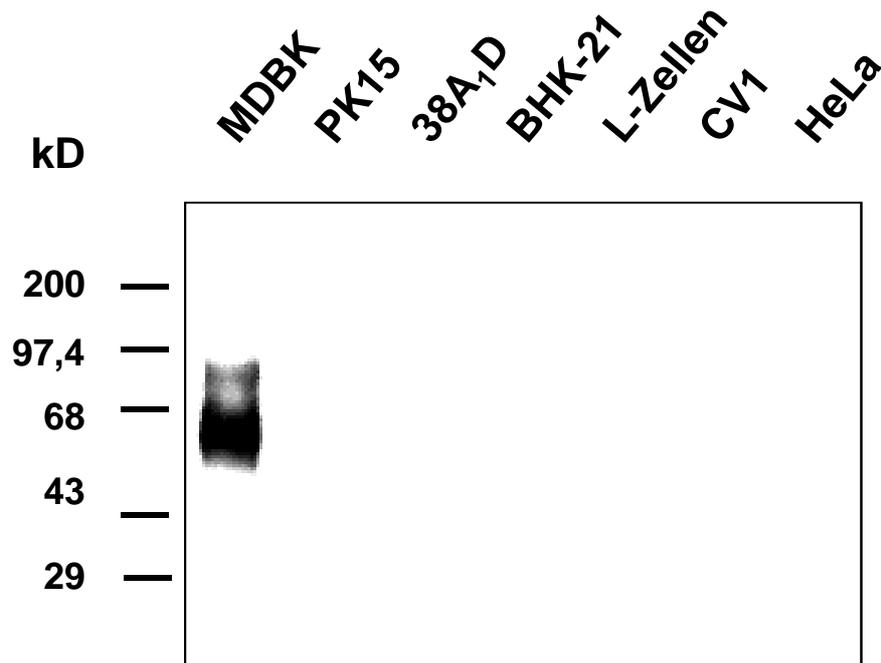


Abb. 9: Immunpräzipitation von biotinylierten Zelloberflächenproteinen verschiedener Spezies

Biotinylierte Oberflächenproteine aus Lysaten von Zellen verschiedener Spezies wurden mit mAk 17 immunpräzipitiert. Die Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte in einer SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1997). Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten Proteine erfolgte durch Nachweis von Streptavidin-Peroxidase Komplexen mit Hilfe von Chemilumineszenz. Die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

• Sekundäre Zellen aus verschiedenen bovinen Organen

Bei BVDV ist die Infektion nicht auf verschiedene Zelltypen beschränkt. Dementsprechend sollten Zelloberflächenproteine, die beim Eintritt der Viren in die Zelle eine Rolle spielen, weit verbreitet sein. In diesem Zusammenhang erfolgte die Untersuchung der Antigenexpression in unterschiedlichen Zelltypen. Hierzu wurden sekundäre Zellen verwendet, die aus Organen eines Kälberembryos isoliert worden waren. Es handelte sich hierbei um Zellen aus der Lunge („bovine embryo lung“, BEL), dem Gehirn („bovine fetal brain“, BFB), dem Knochenmark („bovine fetal bone marrow“, BFBM), dem Darm („bovine fetal gut“, BFG), der Niere („bovine fetal kidney“, BFK) und der Milz („fetal bovine spleen“, FBS). Die in Abbildung 10 dargestellte Immunpräzipitation markierter Oberflächenproteine mit mAk 17 zeigt, dass auf allen verwendeten Zellen entsprechende Antigene nachzuweisen waren. Die Expressionsstärke der 60 kD Bande schien bei allen Zellen ähnlich zu sein,

während die 93 kD Bande teilweise schwächer ausgeprägt war und bei den Zellen des Darms nicht detektiert werden konnte.

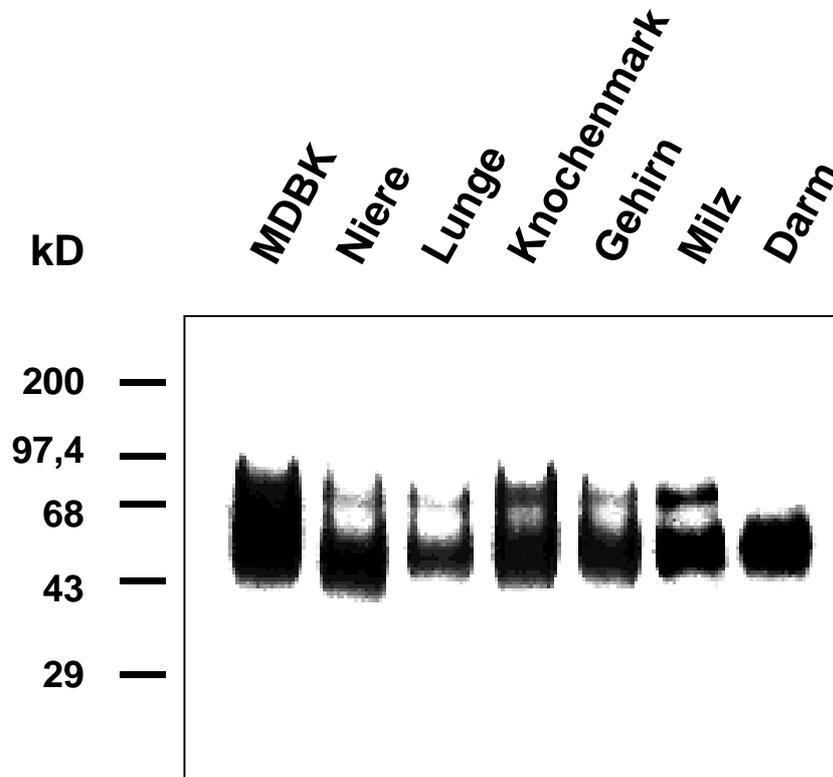


Abb. 10: Immunpräzipitation biotinylierter Oberflächenproteine von fötalen Zellen verschiedener boviner Organe

Biotinylierte Oberflächenproteine aus Lysaten von fötalen Zellen verschiedener Organe eines Kälberembryos wurden mit mAk 17 immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurde MDBK Zelllysat mit mAk 17 immunpräzipitiert. Die Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE. Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Nachweis von Streptavidin-Peroxidase Komplexen mit Hilfe von Chemilumineszenz. Die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

• Rinderorgane und Milch

Zur Analyse der Antigenpräsenz in verschiedenen Organen ausgewachsener Rinder wurden Thymus, Herz, Leber, Niere und Milz frisch geschlachteter Rinder in einer „Western blot“ Analyse mit mAk 26 untersucht. Auch Kuhmilch wurde in diese Analyse mit eingeschlossen. Der Anlass hierzu ergab sich während der Ausarbeitung der „Western blot“ Methode. Da die Verwendung von Trockenmilchpulver zur Blockierung der Trägermembran

in starken Hintergrundsignalen resultierte, wurde die Anwesenheit der Antigene auch in Kuhmilch vermutet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

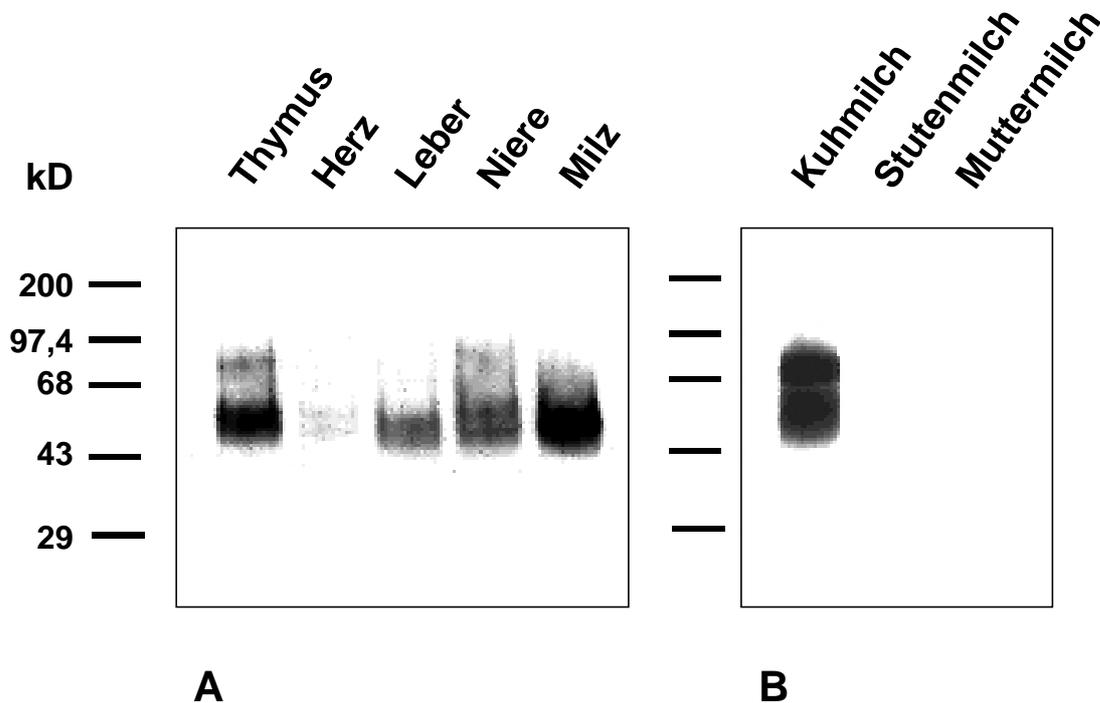


Abb. 11: „Western blot“ Analyse boviner Organe und Milch mit mAk 26

A: Proteine aus den Organen eines Rindes wurden extrahiert und in einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. **B:** Milch verschiedener Spezies wurde 1:1 mit nicht-reduzierendem Probenpuffer versetzt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Größenmarker wurde jeweils ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und mit mAk-haltigem Kulturüberstand der Hybridomzelllinie BVDV/CA 26 inkubiert. Die Detektion der gebundenen mAk erfolgte über Bindung eines Peroxidasegekoppelten anti-Spezies Antikörper und anschließende Chemilumineszenz. Die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

Die gesuchten Oberflächenproteine konnten in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Bedingt durch die unterschiedliche Feinstruktur (z.B. Gehalt an Fett und Bindegewebe) konnte die Expressionsstärke der Proteine in den verschiedenen Organen nicht miteinander verglichen werden. Es fiel jedoch auf, dass sich die relative Intensität der beiden Banden je nach Organgewebe unterschied (Abbildung 11A). Zudem konnte das Vorkommen der Antigene in Kuhmilch bestätigt werden, während in der Milch von Pferd und Mensch kein Protein mit mAk 26 reagierte (Abbildung 11B).

3.2 Isolation der mutmaßlichen Rezeptorproteine und Bestimmung interner Aminosäuresequenzen

Zur eindeutigen Identifizierung der mutmaßlichen Virusrezeptorproteine stand zunächst deren Isolierung aus tierischem Material im Vordergrund. Zum Zweck der angestrebten Aminosäuresequenzierung ist die Bereitstellung größerer Mengen der gereinigten Proteine notwendig. Da geeignete monoklonale Antikörper zur Verfügung standen, bot sich für die präparative Reinigung eine Immunaффinitätschromatographie an.

Grundsätzlich ist die Immunaффinitätschromatographie ein einfaches und erfolgversprechendes Verfahren. Bei der Ausarbeitung der Methode sind in der Hauptsache die Wahl des antigenhaltigen Ausgangsmaterials sowie die Bestimmung der Bindungseigenschaften der immobilisierten Antikörper an ihr Epitop von Bedeutung. Die notwendigen Bedingungen während der Antigenbindung, den Waschschriffen und der Elution können im Einzelfall stark variieren und müssen daher empirisch ermittelt werden.

3.2.1 Extraktion der Antigene aus MDBK Zellen und Kalbsthymus

Für die Durchführung der präparativen Immunaффinitätschromatographie wurde einerseits die bovine Nierenzelllinie MDBK, andererseits Organmaterial von geschlachteten Tieren verwendet. Bei dieser Methode müssen die Proteine in wässriger Lösung vorliegen. Wie bereits gezeigt wurde, handelt es sich bei den Antigenen um Membranproteine mit hydrophobem Anteil (3.1.2.2). Solche Proteine können nur in Anwesenheit von amphiphilen Detergentien in eine stabile wässrige Lösung überführt werden. Andernfalls besteht die Gefahr der Aggregation aufgrund hydrophober Wechselwirkungen.

Die Extraktion der MDBK Zellen erfolgte durch einfache Lyse in einer 1%-igen Lösung des nichtionischen Detergens Triton X-100 in PBS (2.2.1.4). Die Aufarbeitung des Thymusgewebes gestaltete sich dagegen deutlich aufwändiger. Hier mussten mehrere, im Folgenden detailliert beschriebene Reinigungsschritte vorgeschaltet werden. Das schlachfrische Thymusorgan eines Kalbes mit dem Gewicht von etwa einem Kilogramm wurde nur zum Teil sofort weiterverarbeitet. Die Lagerung des verbliebenen Materials erfolgte nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C . Das Organmaterial wurde von Fett und außen anhaftendem Bindegewebe befreit, in Würfel geschnitten und unter Zugabe von eiskaltem PBS mechanisch zerkleinert. Das entstandene Organhomogenat wurde in einem Gesamtvolumen von 13,3 l eiskaltem PBS, das 2% Triton X-114 (Endkonzentration) enthielt,

aufgenommen. Durch eine Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge konnten grobe Partikel aus der Detergens Lösung entfernt werden. Für die Extraktion der Membranproteine wurde eine wiederholte, temperaturabhängige Phasentrennung durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Phasentrennung derartig großer Volumina am effektivsten in 5 l Messzylindern durchgeführt werden konnte. Nachdem die Organsuspension mit Hilfe von Wasserbädern oder in Brutschränken auf 37°C erwärmt worden war, trennten sich die Phasen unter Einwirkung der Schwerkraft über Nacht. Die obere, Detergens-verarmte Phase wurde abgezogen und verworfen. Die untere, Detergens-angereicherte Phase konnte nach Abkühlung auf 0°C erneut dieser Prozedur (Zentrifugation, Auffüllen des Volumens mit PBS, Erwärmung und Phasentrennung über Nacht) ausgesetzt werden. Nach Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation wurde die Detergens-angereicherte Phase anschließend mit dem gleichen Volumen eiskalten Azetons versetzt. Die in der Mischung enthaltenen Proteine fielen aus und konnten nach 30 min auf Eis abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, das gefällte Material mehrmals mit Aceton gewaschen und anschließend in etwa 1 l 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 8 M Harnstoff, 1% Triton X-100 gelöst. Vor der Verwendung dieser Lösung in der Immunaффinitätschromatographie fand eine 8-fache Verdünnung sowie eine Ultrafiltration statt. In Abbildung 12 ist ein Ablaufschema der Aufarbeitung von Kulturzellen und Thymusgewebe dargestellt.

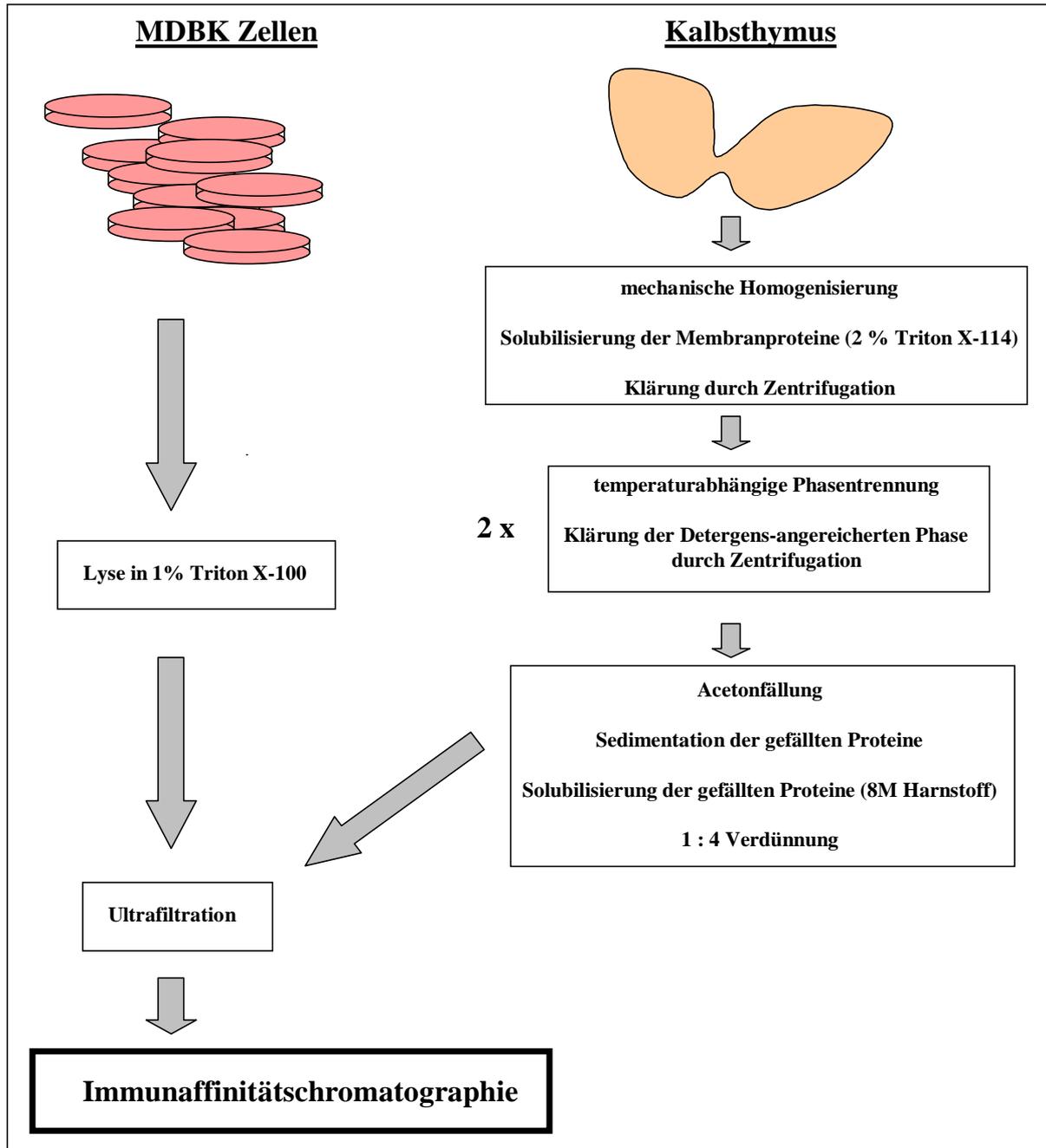


Abb. 12: Extraktion von Membranproteinen aus Kulturzellen und Organewebe

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Proteinreinigungsschritte, die der Immunaffinitätschromatographie vorangingen. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Schritte ist im Text zu finden.

Wie oben beschrieben waren bei Verwendung von Kalbsthymus als Antigenquelle umfangreiche Vorreinigungsschritte notwendig. Um überprüfen zu können, welche Auswirkung diese Behandlung auf die gesuchten Proteine hatte, wurden Proben der verschiedenen Präparationsstufen in einer „Western blot“ Analyse mit mAk 26 untersucht (Abbildung 13). Wie erwartet, reicherten sich die Antigene quantitativ in der Triton X-114 Phase an, wobei es weder zu nennenswerten Verlusten noch zu einer nachweisbaren Veränderung der Antigene während der gesamten Präparation kam.

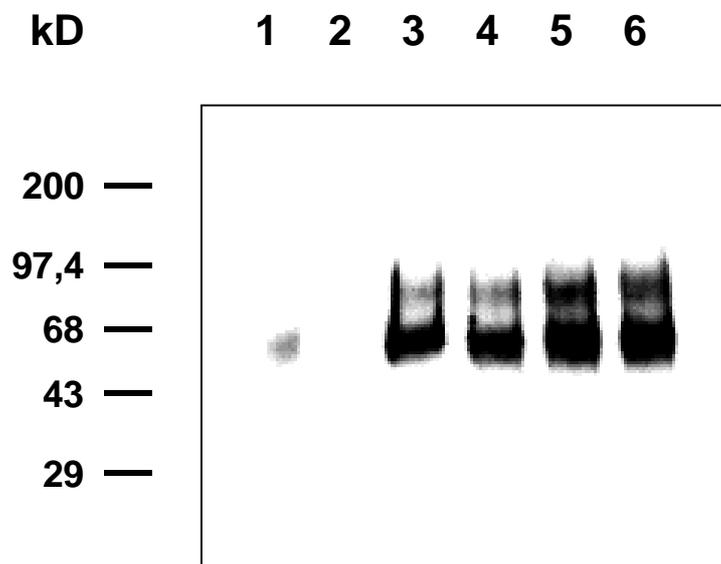


Abb. 13: Reinigung der Antigene aus Kalbsthymus: „Western blot“ Analyse von Proben der Vorreinigungsschritte mit mAk 26

Proben der antigenhaltigen Lösung wurden zwischen den Reinigungsschritten abgenommen und in einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Durch Verwendung unterschiedlicher Probenvolumina wurde der Verdünnungsgrad der Präparation berücksichtigt. Spur 1: 20 µl Gesamthomogenat; Spur 2: 18 µl Detergens-verarmte Phase; Spur 3: 2 µl Detergens-angereicherte Phase; Spur 4: 2 µl nach Azetonfällung und Resuspendierung; Spur 5: 8 µl nach Verdünnung in IP-Puffer; Spur 6: 8 µl nach Ultrafiltration. Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrozellulosemembran wurden die immobilisierten Proteine mit Kulturüberstand der Hybridomzelllinie BVDV/CA 26 inkubiert. Die Detektion der gebundenen mAk erfolgte über Bindung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Spezies Antikörper und anschließende Chemilumineszenz. Die Positionen der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

3.2.2 Immunaффinitätschromatographie

3.2.2.1 Säulenmaterial

Die monoklonalen Antikörper mAk 17 und mAk 27 wurden an ProteinA-Sepharose, mAk 26 dagegen an ProteinG-Sepharose kovalent gebunden. Die Effizienz der Kopplung konnte in einer gelelektrophoretischen Analyse nachgewiesen werden (siehe 2.2.2.9.1). Hierdurch fand auch eine Überprüfung der Beladungsdichte des Säulenmaterials statt. MAk 17 und mAk 27 ließen sich in einer Konzentration von 2 mg/ml Sepharose an die Matrix koppeln. Da sich herausstellte, dass mAk 26 nur in Konzentrationen von etwa 0,1 mg/ml an ProteinG-Sepharose band, wurde für die Immobilisierung dieses Antikörpers alternativ CNBr-aktivierte Sepharose verwendet. Auch hier wurde eine Beladungsdichte von 2 mg Antikörper pro ml Sepharose angestrebt. Eine Überprüfung der Beladungsdichte ist bei diesem Trägermaterial jedoch nur indirekt möglich. Die Säulenmaterialien wurden in Immunpräzipitationsexperimenten auf ihre Antigenbindungsfähigkeit untersucht (2.2.2.10). Die an ProteinA-Sepharose immobilisierten mAk 17 und mAk 27 banden ihre Antigene mit vergleichbar hohen Effizienzen, während die Sepharose mit gebundenem mAk 26 eine erheblich geringere Bindungskapazität aufwies. Dies lag wahrscheinlich in der Art seiner Kopplung an das Trägermaterial begründet. Anders als bei der Verwendung von ProteinA- oder ProteinG-Sepharose kommt es bei der Bindung von mAk an CNBr-aktivierte Sepharose nicht zu einer sterisch günstigen Ausrichtung der Moleküle, ein Teil der Epitope verliert daraufhin seine Antigenbindungsfähigkeit. Mit den ProteinA-Sepharose/mAk 17 und ProteinA-Sepharose/mAk 27 Matrices standen jedoch zufriedenstellende Affinitätsmaterialien zur Verfügung, sodass auf die weitere Verwendung von mAk 26 verzichtet wurde.

3.2.2.2 Säulenbeladung

Bei den bisher durchgeführten Immunpräzipitationsexperimenten lagen die Antigene in Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) vor. Dieser Puffer enthielt neben 1% Triton X-100 die ionischen Detergentien NaDOC (1%) und SDS (0,1%) sowie 150 mM NaCl. Bei diesen Bedingungen konnten Verunreinigungen durch die unspezifische Bindung anderer Proteine minimiert werden. Da die Proteinreinigung als Einstufenverfahren geplant und daher die ausschließliche Bindung der Antigene an die Matrix erwünscht war, lag es nahe, IP-Puffer

auch für die Bindung der Antigene während der präparativen Immunaffinitätschromatographie einzusetzen. Auch die nachfolgenden Waschschrte erfolgten mit IP-Puffer, wobei lediglich die NaCl-Konzentration zum Teil auf 1 M erhöht wurde. Als kritisch erwies sich das Verfahren, mit Hilfe dessen die Antigene mit den immobilisierten mAk inkubiert wurden. Bei den bisher durchgeführten analytischen Arbeiten hatte sich das sogenannte „batch“-Verfahren bewährt, bei dem das Säulenmaterial mit der antigenhaltigen Lösung bei ständiger Durchmischung inkubiert wird. Bei größeren Versuchsvolumina konnten auf diese Weise jedoch nur geringe Mengen an Antigen an die Matrix gebunden werden. Dies wurde dadurch ersichtlich, dass bei der Proteinanalyse der mit Antigen gesättigten Matrix nur mAk 17 nachzuweisen war. Die Antigene banden auch dann nicht quantitativ an die Matrix, wenn die Inkubationszeit auf mehrere Tage ausgedehnt wurde. Eine Säulenchromatographie, durch die eine wesentlich höhere Bindungskapazität erreicht werden konnte, erwies sich daher für die präparative Isolation als geeigneter. Hierbei wurde 1 ml ProteinA-Sepharose verwendet, an die 2 mg mAk 17 kovalent gekoppelt worden waren. Das Durchflussverfahren ermöglichte auch die Überprüfung des Beladungszustandes der Affinitätssäule. Der Durchlauf wurde fraktioniert gesammelt und die enthaltene Menge an Antigenen in einer „Western blot“ Analyse ermittelt. Durch den Vergleich der Signalintensitäten zwischen Durchlaufraktion und Ausgangslösung konnte zudem abgeschätzt werden, ob das Säulenmaterial bereits die Sättigung erreicht hatte oder ob weiterhin Antigene gebunden werden konnten. Im Rahmen dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass auch die Durchflussrate ein wichtiger Parameter für eine effektive Beladung der Säule darstellte. Eine Durchflussrate von 100 µl antigenhaltiger Lösung pro Minute erwies sich als optimal.

Antigene aus Zellkultur-Lysaten: Für die präparative Immunaffinitätschromatographie der Antigene aus kultivierten Zellen wurde das Lysat von etwa 10^{10} MDBK Zellen auf 1% NaDOC und 0,1% SDS sowie 0,15 M NaCl eingestellt. Nach der Beladung der Immunaffinitätssäule mit der gesamten Menge des antigenhaltigen Materials konnten auch in den letzten Durchflussfraktionen, verglichen mit der Ausgangslösung, nur geringe Mengen an Antigen nachgewiesen werden. Hierdurch zeigte sich, dass mit der aus Kulturzellen bereitgestellten Antigenmenge die Sättigung der Affinitätsmatrix nicht erreicht werden konnte.

Antigene aus Kalbsthymus: Der Membranproteinextrakt aus 1 kg Kalbsthymus lag nach den in 3.2.1 beschriebenen Vorreinigungsschritten in 1 l 8 M Harnstofflösung vor. Vor der Beladung der Affinitätsmatrix wurde dieser Extrakt mit 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1% Triton X-100, 0,1% PMSF auf eine Harnstoffkonzentration von 1 M verdünnt. In Immunpräzipitationsexperimenten konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Harnstoffs die Bindung der Antigene an die immobilisierten Antikörper nicht beeinträchtigte (siehe 2.2.2.10). Für die präparative Isolierung von Antigenen aus Kalbsthymus standen demnach 8 l Lösung zur Verfügung, die zunächst durch Zentrifugation und Filtration geklärt werden mussten. Aufgrund der niedrigen Flussrate von 100 µl/min ergab sich aus diesem Volumen eine Gesamtbeladungszeit von 55 Tagen. Durch die regelmäßige Detektion des Antigensignals in den Durchflussfraktionen, das nach 31 Tagen in seiner Intensität dem der Ausgangslösung entsprach, wurde die vollständige Sättigung der Affinitätsmatrix nach dem Durchfluss von 4,5 l Antigenlösung ermittelt und die Beladung beendet.

3.2.2.3 Waschschritte

Nach der Beladung wurden die Affinitätssäulen mit etwa 100 Säulenvolumen (100 ml) gewaschen, wobei für die Präparation aus MDBK Zellen IP-Puffer, für die Präparation aus Kalbsthymus IP-Puffer mit 1 M Harnstoff verwendet wurde. Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration in weiteren 20 Säulenvolumen (20 ml) auf 1 M sollte weitere unspezifisch gebundene Proteine entfernen. Die letzte Waschlösung (100 ml) enthielt neben den Puffersubstanzen 0,1% SDS.

3.2.2.4 Elution der Antigene

Die geeigneten Bedingungen für die Elution, d. h. die Ablösung der Antigene von den am Säulenmaterial kovalent gebundenen Antikörpern, müssen für jede Antigen-Antikörper Wechselwirkung empirisch ermittelt werden. In der Literatur wird hierzu eine Vielzahl von Lösungen vorgeschlagen, die unterschiedliche physikalische Effekte ausnutzen (Harlow & Lane, 1988).

Im vorliegenden Fall wurden 12 verschiedene Elutionslösungen im analytischen Maßstab verglichen (siehe 2.2.2.11). Mit den meisten gängigen Elutionsmitteln ließen sich die Antigene jedoch nicht ablösen. Weder mit einer sprunghaften Veränderung des pH-Werts

in den sauren (pH 2,5) bzw. alkalischen (pH 11,5) Bereich noch durch die Verwendung von hochkonzentrierten Salzlösungen (3,5 M MgCl₂, 3 M LiCl), dissoziierenden Agentien (2-8 M Harnstoff, 2 M Guanidiniumhydrochlorid), dem organischen Lösungsmittel Ethylenglykol (50%) und dem ionischen Detergens NaDOC (2-5%) gelang eine effektive Ablösung der Antigene. Positiv verlief die Elution nur bei der Verwendung von hohen SDS-Konzentrationen (2-5%), zudem waren bei höherer Temperatur größere Ausbeuten zu verzeichnen. Dies deutet auf eine ungewöhnlich starke Wechselwirkung zwischen Epi- und Paratop hin. Erschwerend könnte sich bei diesen analytischen Untersuchungen die geringe Menge an gebundenem Antigen (siehe 3.2.2.2) ausgewirkt haben, was bei einer Teilablösung möglicherweise zu einer Unterschreitung der Nachweisgrenze geführt haben könnte. Die Elution der Antigene in der präparativen Proteinreinigung wurde durch die Inkubation in 5%-iger SDS Lösung bei RT (25°C) herbeigeführt.

Zur Elution wurde die „batch“-Methode angewendet, wobei ein möglichst geringes Volumen (5 ml) der Elutionslösung zu dem gesamten, beladenen Immunaффinitätsmaterial direkt in die Säule gegeben wurde. Nach Verschluss beider Enden der Säule folgte unter ständiger Durchmischung eine 30-minütige Inkubationszeit. Der Überstand, der die abgelösten Antigene enthielt, konnte anschließend direkt in einen Dialyseschlauch überführt werden. Durch zweifache Wiederholung dieses Vorgang wurde die vollständige Ablösung der isolierten Proteine sichergestellt. Die drei verschiedenen Elutionsfraktionen wurden in der nachfolgenden Dialyse und Konzentrierung voneinander getrennt behandelt.

3.2.2.5 Dialyse der Elutionsfraktionen

Für die weiteren Analysen war es notwendig, die isolierten Antigene zu konzentrieren. Dies war wegen der hohen SDS-Konzentration nicht direkt möglich. Deshalb wurde die SDS-Konzentration durch eine Dialyse von 5% auf 0,1% reduziert. Aufgrund der Eigenschaft von SDS, große Mizellen zu bilden, musste diese Dialyse über einen langen Zeitraum erfolgen (Hjelmeland, 1990), wobei der Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,02% NaN₃, 0,1% SDS) sechsmal innerhalb von 72 h gewechselt wurde. Der verbleibende Anteil von 0,1% SDS im Dialysepuffer verhinderte die Aggregation der exponierten hydrophoben Strukturbereiche der gereinigten Membranproteine.

3.2.2.6 Konzentrierung und Bestimmung der Ausbeute

Die Entfernung der hohen SDS-Konzentrationen aus der Lösung ermöglichte die Konzentrierung der isolierten Proteine durch Ultrafiltration. Die hierzu verwendeten Membranen wiesen eine definierte Porengröße auf, die nur für globuläre Moleküle mit einer molaren Masse unter 10 kD durchlässig sind. Auf diese Weise konnten die Antigene bei gleichbleibender Pufferzusammensetzung etwa 10-fach aufkonzentriert werden.

Die Ausbeute an isolierten Proteinen wurde durch eine Proteinkonzentrationsbestimmung ermittelt. Es zeigte sich, dass bei der Verwendung von etwa 10^{10} kultivierten MDBK Zellen die Proteinmenge unter der Nachweisgrenze lag. Trotzdem in allen drei Elutionsfraktionen nach Dialyse und Konzentrierung starke Signale in der „Western blot“ Analyse erhalten wurden, konnten keine messbaren Proteinmengen detektiert werden.

Ein anderes Bild ergab sich bei der Isolierung der Antigene aus Kalbsthymus. Nach Dialyse und Konzentrierung befanden sich die Proteine aus Elution 1 in 0,86 ml, aus Elution 2 in 0,52 ml und aus Elution 3 in 0,55 ml Pufferlösung. Die in den Präparationen enthaltenen Proteinkonzentrationen betragen für Elution 1 1,8 mg/ml, für Elution 2 0,85 mg/ml und für Elution 3 0,2 mg/ml.

3.2.2.7 Nachweis des Reinigungserfolgs

Um den Reinigungserfolg abschätzen zu können, wurden die in den Elutionen enthaltenen Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE mit dem Farbstoff Coomassie „brilliant blue“ sichtbar angefärbt (Abbildung 14). Die Hauptbande lag hierbei im Molekulargewichtsbereich von 55 - 60 kD. Eine Proteinbande im Bereich von etwa 90 kD erschien nur als schwach gefärbtes Signal (Abbildung 14, Spur 1). Eine weitere Proteinbande, die in dieser Präparation enthalten war, lag im Größenbereich von etwa 22 kD. In der parallel durchgeführten „Western blot“ Analyse, bei der nur 0,1% des Eluats eingesetzt wurde, konnte mit mAk 26 ein starkes Signal deckungsgleich mit der Coomassie-gefärbten Hauptbande detektiert werden (nicht gezeigt). Das Protein mit der Größe von etwa 22 kD war auch hier vorhanden. Diese Proteinbande wurde aber auch dann sichtbar, wenn die Nitrozellulosemembran der „Western blot“ Analyse nur mit dem zweiten, Maus-IgG-spezifischen Antikörper inkubiert wurde. Vermutlich handelte es sich hierbei um die leichte Kette des mAk 17, die während der Elution durch 5% SDS von der Affinitätsmatrix abgelöst

wurde. Das Auftreten der 22 kD Bande kann also als Reinigungsartefakt angesehen werden. Während jedoch eine Verunreinigung dieser Größe abtrennbar ist, musste eine Kontamination mit der schweren Antikörperkette ausgeschlossen werden, da hierdurch die Aminosäureanalyse im MW-Bereich von 60 kD empfindlich gestört werden würde. Da die mAk bei der Herstellung der Affinitätsmatrix mit ihrer F_c-Region (= schwere Polypeptidketten) kovalent an die ProteinA-Sepharose gekoppelt wurden, war es unwahrscheinlich, dass auch diese Strukturelemente der mAk in die Elutionslösung gelangen konnten (siehe auch 2.2.2.9.1). Dies konnte durch die Behandlung der Elutionsfraktionen mit dem Enzym PNGase F untersucht werden. Hierbei konnte die durch die Abspaltung N-glykosidisch gebundener Zuckerketten hervorgerufene charakteristische Molekulargewichtsverschiebung der Antigene um 20 - 25 kD beobachtet werden (Abbildung 14, Spur 2). Als Kontrolle wurde auch eine Probe des isolierten mAk 17 mit PNGase F deglykosyliert (Abbildung 14, Spuren 3 und 4). Bei der schweren Polypeptidkette des mAk 17 trat hierbei nur eine Molekulargewichtsverschiebung von etwa 5 kD auf. Da keine entsprechende Proteinbande in der mit PNGase F behandelten Elutionsfraktion vorhanden war, konnte eine Verunreinigung der Antigenpräparation durch die schwere Polypeptidkette des mAk 17 ausgeschlossen werden.

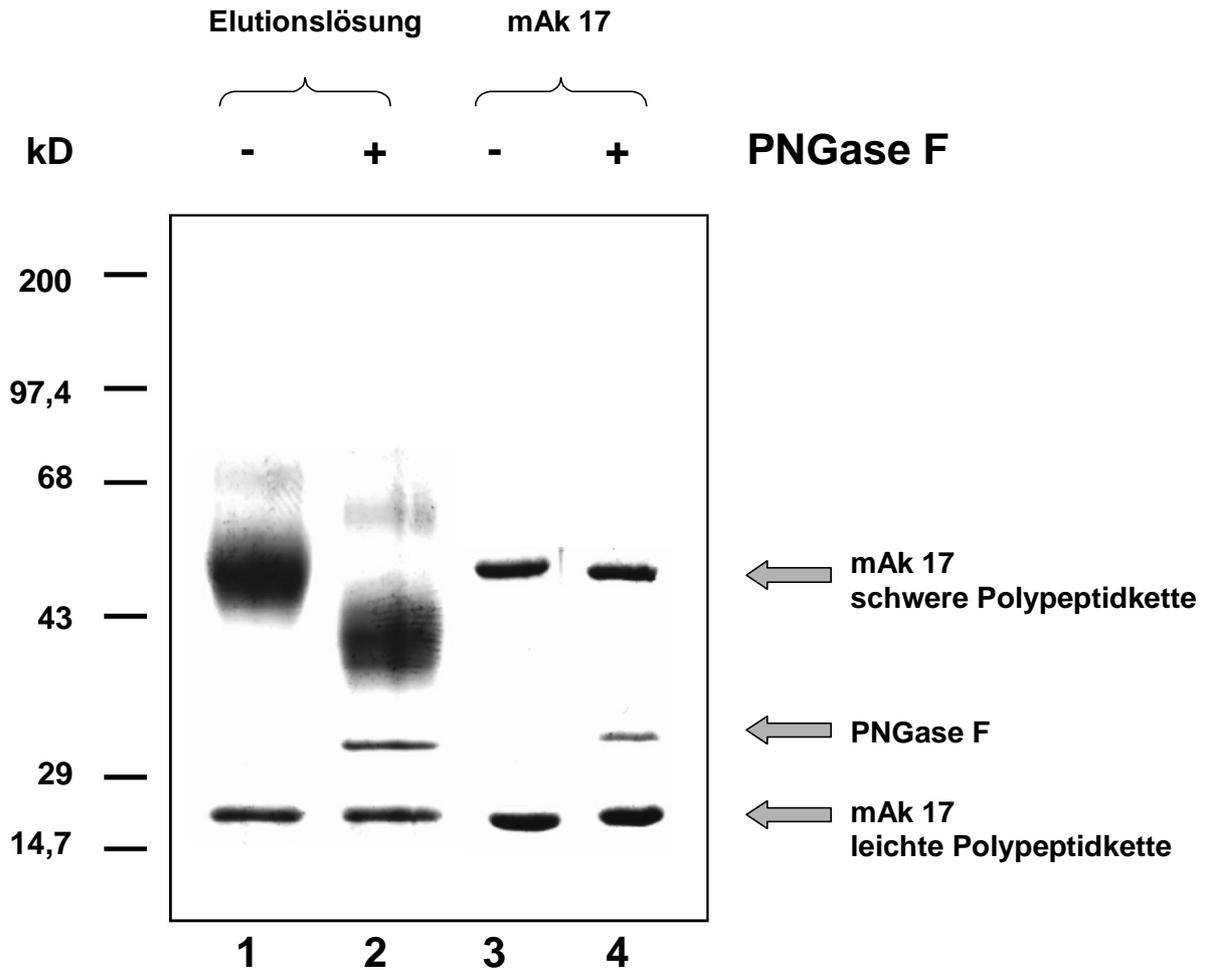


Abb. 14: Darstellung der gereinigten Proteine in der SDS-PAGE und Überprüfung des Reinheitsgrades der Präparation durch Behandlung mit PNGase F

Je 10 μ l der konzentrierten Elutionsfraktion 1 wurden denaturiert, reduziert und in Ab- bzw. Anwesenheit von PNGase F über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde isolierter mAk 17 der gleichen Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die Auftrennung in einer SDS-PAGE nach Laemmli, wobei das Trenngel 10% Acrylamid enthielt. Als Größenmarker wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Fa. Gibco BRL) in einer separaten Gelspur aufgetrennt. Durch Färbung mit Coomassie „brilliant blue“ wurden die fixierten Proteine sichtbar gemacht. Die Positionen der schweren bzw. leichten Polypeptidkette des mAk 17 sowie des Enzyms PNGase F sind mit Pfeilen markiert.

3.2.3 Bestimmung interner Aminosäuresequenzen

3.2.3.1 Sequenzierung

Durch die Immunaффinitätschromatographie war es gelungen, mehr als ein Milligramm der gesuchten Proteine zu isolieren. Der größte Teil der Proteinmenge wurde durch die Bande im Molekulargewichtsbereich von 55-60 kD repräsentiert. Dieses Protein, das im Folgenden als gp55-60 (Glykoprotein der Größe von 55-60 kD) bezeichnet werden soll, stand daher zur Identifizierung durch Aminosäuresequenzierung in ausreichender Menge zur Verfügung.

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz eines Proteins erfolgt üblicherweise ausgehend vom N-Terminus durch zyklischen, automatisierten Edman-Abbau. Dies setzt eine freie, nicht modifizierte Aminogruppe am N-Terminus voraus. Sequenzierungsversuche am N-Terminus des gp55-60 verliefen jedoch nicht erfolgreich, was eine chemische Modifizierung der N-terminalen Aminosäure vermuten lässt. Daher sollte gp55-60 zunächst enzymatisch in Fragmente gespalten, die resultierenden Peptide isoliert und ihrerseits zur Sequenzierung verwendet werden. Als Ausgangsmaterial wurden 50 µg Protein aus der ersten Elutionsfraktion (Abbildung 14, Spur 1) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie „brilliant blue“ angefärbt. Die Bande des gp55-60 konnte daraufhin ausgeschnitten und den nachfolgenden Analysen zugeführt werden. Diese Arbeiten erfolgten als Auftragsarbeit durch ein kommerzielles Labor (Eurosequence, Groningen, NL). Hierzu gehörten die enzymatische Spaltung mit Trypsin, eine Isolierung der entstandenen Peptide durch „high pressure liquid chromatography“ (HPLC) und die Aminosäuresequenzierung einzelner, interner Peptide. Dabei konnte zunächst nur von einem Peptid eine eindeutige Sequenz von 18 Aminosäuren ermittelt werden. Diese Sequenz (A18) ausgehend vom Aminoterminus des internen Peptids lautete:

A18: H₂N-Cys-Val-X-Pro-Ala-Ile-Glu-His-Gly-Thr-Ile-Val-Ser-Gly-Phe-Gly-Pro-Lys-COOH

Weitere Sequenzen stammten aus Gemischen interner Peptide und konnten daher nicht als gesichert angesehen werden. Die Sequenzen B21, C10 und D13 dienten jedoch der zusätzlichen Bestätigung der mit Hilfe der A18 Sequenz erreichten Identifizierung der gesuchten Proteine.

B21: H₂N-Phe/Ser-Val-Ser-Met-Lys-Pro-Gln-Gly-Thr-Leu-Lys-Pro-Ser-Tyr-Ser-Pro-Gly-Glu-Gln-Ile-Val/Gly-COOH

C10: H₂N-Thr/Val-Glu/Phe-Glu-Tyr-Asn-Glu-Val-Val-Leu/Thr-Tyr-COOH

D13: H₂N-Ile-Leu-X-Gln-Pro-Pro-Pro-Glu-Ile-Gln-Asp-Gly-Lys-COOH

3.2.3.2 Datenbanksuche

Für die computergestützte Suche nach möglichst ähnlichen Sequenzen in nicht redundanten Datenbanken wurde die Sequenz A18 (CVXPAIEHGTIVSGFGPK) verwendet. Die Durchführung der Suche mit dem Programm FASTA3 (Pearson & Lipman, 1988) ergab, dass die eingegebene Sequenz nicht mit einer bereits deponierten identisch war. Bei gp55-60 handelte es sich vermutlich um ein noch nicht beschriebenes Protein. Für die Charakterisierung eines unbekanntes Proteins sind aber auch Informationen über ähnliche Sequenzen von großem Nutzen. In Abbildung 15 sind verschiedene Proteinsequenzen aufgeführt, die mit Hilfe des Programms FASTA3 gefunden wurden. Es handelt sich um homologe Sequenzen aus den Proteinen „C4-binding protein“ (C4bp) und „membrane cofactor protein“ (MCP) verschiedener Spezies, die mehr als 50% Aminosäureidentität mit der Eingabesequenz aufwiesen. Weitere bei der Datenbanksuche aufgefundenen Proteinsequenzen, die wesentlich weniger identische Aminosäuren enthielten, sind in Abbildung 15 nicht aufgeführt.

Sequenz	Protein	AS Identität
C V X P A I E H G T I V S G F G P K	Eingabesequenz	100%
C R K P D V S H G E M V S G F G P I	C4bp Mensch	58,82%
C V Q P V V K D G K I T S G F G P I	C4bp Rind	58,82%
C P Y C V V P N G E I V S G F G S K	MCP Schwein	58,82%
C R F P V V E N G K Q I S G F G K K	MCP Mensch	52,94%
C S Q P N I L H G V I V S G Y K A T	C4bp Maus	50%
C P W P K V L H G T I N S G F K H T	C4bp Ratte	50%

Abb. 15: Vergleich der bovinen Peptidsequenz A18 mit Sequenzen aus einer allgemein zugänglichen Datenbank

Die Peptidsequenz A18 aus dem gereinigten bovinen Protein (Eingabesequenz) wurde mit Hilfe des Programms FASTA3 (Pearson & Lipman, 1988) mit bereits bekannten Proteinen verglichen (C4bp: „C4-binding protein“; MCP: „membrane cofactor protein“). Mit der Eingabesequenz identische Aminosäuren sind umrandet dargestellt.

Bei C4bp und MCP, das in der Liste der Zell-Differenzierungsmarker auch als CD46 bezeichnet wird, handelt es sich um zwei miteinander verwandte Proteine. Sie gehören zu der Familie der Regulatoren der Komplementaktivierung („regulators of complement activation“, RCA) (Hourcade et al., 1989), deren Vertreter in einem Gen-„cluster“ auf dem 1q Arm des humanen Chromosom 1 kodiert sind (Liszewski et al., 1991).

Da die bereits deponierte Sequenz des bovinen C4bp nicht mit der Peptidsequenz des gp55-60 identisch war, konnte eine Übereinstimmung beider Proteine ausgeschlossen werden. Auch die zelluläre Lokalisation des C4bp, das in Form eines Multimers (7 disulfidverbrückte Untereinheiten) von Leberzellen in den extrazellulären Raum sezerniert wird, sowie seine Größe von ca. 600 Aminosäuren pro Monomer standen im Widerspruch zu den Eigenschaften der gesuchten Antigene. Das Zelloberflächenprotein CD46 hingegen war ein guter Kandidat für ein Homologes des gp55-60. Besonders auffallend ist sein heterogenes Erscheinungsbild in der SDS-PAGE, das dem Proteinbandenmuster der gesuchten Antigene sehr ähnlich ist.

3.3 Literaturrecherche

3.3.1 Eigenschaften des humanen CD46

3.3.1.1 Vorkommen, Funktion und Struktur

Bei der Analyse des isolierten mutmaßlichen Virusrezeptors konnten Peptidsequenzen gewonnen werden, die Ähnlichkeiten mit dem humanen CD46, das auch zur Differenzierung von Leukozyten herangezogen wird (Hadam, 1990), aufwies. Durch eine Literaturrecherche sollten zunächst Kenntnisse über die bekannten Eigenschaften des CD46 zusammengetragen werden.

Das Typ 1 Membranprotein CD46, das auch als „membrane cofactor protein“ (MCP) bezeichnet wird, ist ein weit verbreitetes Protein der Zytoplasmamembran. Es konnte bisher auf allen untersuchten kernhaltigen Zellen nachgewiesen werden (Liszewski et al., 1991). Als Angehöriger der Familie der Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) schützt es körpereigene Gewebe durch Bindung der aktivierten Komplementkomponenten C3b und C4b vor der unspezifischen Selbstzerstörung (Liszewski & Atkinson, 1992). Das humane CD46 ist gut charakterisiert. Eine schematische Darstellung der Strukturelemente ist in Abbildung 16 gezeigt. Die N-terminale, extrazelluläre Domäne enthält vier für RCA Proteine typische Sequenzen („short consensus repeats“, SCR). Es handelt sich hierbei um 60 – 70 Aminosäuren lange Abschnitte (Reid et al., 1986), die jeweils vier hoch konservierte Cysteine und ein ebenso konserviertes Tryptophan enthalten (Hourcade et al., 1989). In dieser Region sind drei potentielle N-Glykosylierungsstellen vorhanden. Anschließend folgt eine Region, die überdurchschnittlich viele Serine, Threonine und Proline enthält und stark O-glykosyliert ist (STP-Region), und eine kurze Sequenz unbekannter Bedeutung (U). Die Verankerung in der Plasmamembran wird durch eine hydrophobe Transmembranregion bewirkt, auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich eine kurze C-terminale Domäne (Abbildung 16).

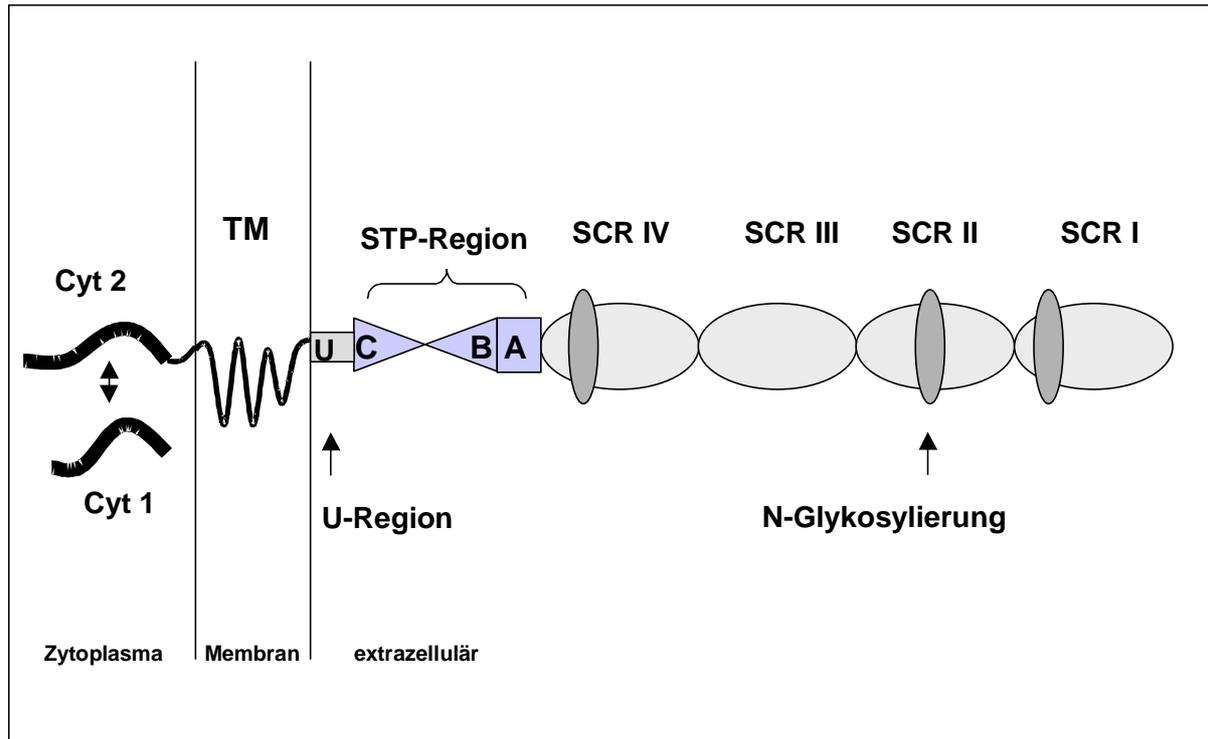


Abb. 16: Schematische Darstellung der Struktur des humanen CD46 (nach Liszewski & Atkinson, 1992)

Der extrazelluläre Anteil des Proteins beginnt mit vier SCR-Domänen („short consensus repeats“), an denen sich drei potentielle N-Glykosylierungsstellen befinden. Die STP-Region (Serin/Threonin/Prolin-reiche Region) setzt sich aus drei verschiedenen Sequenzbereichen A, B und C zusammen, die in verschiedenen Isoformen des CD46 in unterschiedlicher Kombination vorkommen. U: Region unbekannter Funktion. TM: Transmembrandomäne. Der intrazelluläre Anteil des CD46 wird in der Regel durch eine der beiden zytoplasmatischen Domänen Cyt 1 oder Cyt 2 gebildet (siehe Text).

3.3.1.2 Spleissvarianten

Eine auffallende Besonderheit des CD46 ist das Vorkommen von unterschiedlich großen Isoformen, die durch alternatives Spleissen zustande kommen. Für das humane CD46 sind mindestens 14 verschiedene Proteinsequenzen beschrieben worden (Russell et al., 1992). Diese Spleissvarianten unterscheiden sich unter Anderem durch die variable Transkription verschiedener Exons in der STP Region, die zu unterschiedlichen Kombinationen der drei Abschnitte A, B und C führt. Am C-Terminus befindet sich in den häufigsten Isoformen eine der beiden Zytoplasmadomänen Cyt1 (16 AS) und Cyt2 (23 AS) (Post et al., 1991). Eine dritte Zytoplasmadomäne Cyt3 kommt in Spleissvarianten vor, die zudem unterschiedliche Sequenzen in der C-terminalen Hälfte der Transmembranregion aufweisen (Seya et al., 1999). Die gleichzeitige Expression von hauptsächlich vier verschiedenen Spleissvarianten in

den meisten Zelltypen führt zu einem heterogenen Erscheinungsbild nach elektrophoretischer Auftrennung, wobei den Isoformen STP(BC)+Cyt1/Cyt2 die größere Bande (59-68 kD) und den Isoformen STP(C)+Cyt1/Cyt2 die kleinere Bande (50-58 kD) zugeordnet wurde (Post et al., 1991). Der apparente Größenunterschied beider Banden, der nicht auf die unterschiedlich lange Aminosäuresequenz der STP(BC) und STP(C) Formen zurückgeführt werden kann, erklärt sich durch extensive O-Glykosylierung in diesem Bereich (Liszewski & Atkinson, 1992).

3.3.2 Homologien des CD46 verschiedener Spezies

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren cDNA Sequenzen der Homologe verschiedener Spezies bekannt. Hierzu gehören neben dem Menschen und diversen Primaten (Lublin et al., 1988) das Hausschwein (Toyomura et al., 1997) und verschiedene Nagetiere (Maus, Meerschwein, Ratte) (Miwa et al., 1998; Tsujimura et al., 1998; Mead et al., 1999). Detaillierte Kenntnisse über Sequenzen von Spleissvarianten sind allerdings nur für das menschliche CD46 vorhanden. Bei Homologieuntersuchungen, die sich über die gesamte Länge des Proteins erstrecken, würden unterschiedliche Isoformen miteinander verglichen werden, die in ihrer STP Region stark variieren. Die SCR Domänen, die durch die stark konservierten Cysteine und Tryptophane leicht identifiziert werden können, sind jedoch in allen Isoformen identisch. Da sie einen Großteil des Proteins ausmachen (über 70% der Aminosäuresequenz des humanen CD46, siehe auch Abbildung 16), wurde für Sequenzvergleiche nur dieser Strukturbereich verwendet. Das Ergebnis eines Sequenzvergleichs der SCR Domänen verschiedener CD46 Homologe ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Aminosäureidentitäten des CD46 verschiedener Spezies innerhalb der SCR Domänen^{a)}

Mensch	Tamarin	Green monkey	Maus	Ratte	Schwein	
100%	77%	87%	51%	52%	50%	Mensch
	100%	78%	50%	49%	50%	Tamarin
		100%	53%	51%	49%	Green monkey
			100%	77%	41%	Maus
				100%	43%	Ratte
					100%	Schwein

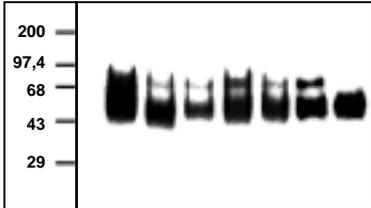
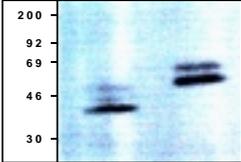
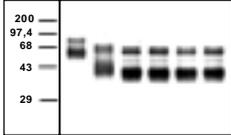
^{a)} Aminosäureidentitäten wurden mit Hilfe des Programms BLASTP (Altschul et al., 1997) errechnet.

Der Gehalt an identischen Aminosäuren im Bereich der vier SCR beträgt etwa 80% bei nahe verwandten Spezies (innerhalb der Primaten bzw. Nagetiere). Bei entfernter verwandten Spezies ist der Anteil identischer Aminosäuren wesentlich geringer. Bei Maus und Mensch sind nur 51% der Aminosäuren in diesem Bereich identisch, bei Maus und Schwein sogar nur 41% (Tabelle 4). Im Vergleich hierzu sind alle 295 Aminosäuren des hoch konservierten Lamininrezeptors 1 bei Maus und Hamster identisch, das humane und bovine Homolog unterscheiden sich hiervon nur in jeweils zwei Aminosäuren (Wang et al., 1992). Bei CD46 handelt sich demnach um ein wenig konserviertes Protein. Aufgrund der identischen Position von 16 hoch konservierten Cysteinen, die Disulfidbrücken ausbilden, liegen jedoch Übereinstimmungen in der Proteinstruktur vor.

3.3.3 Übereinstimmungen des gereinigten bovinen Proteins mit CD46

Die oben zusammengetragenen Merkmale des humanen CD46 wurden mit den in 3.1.2 beschriebenen Eigenschaften der gesuchten bovinen Proteine verglichen (Tabelle 5).

Tab. 5: Vergleich der bovinen Antigene mit humanem CD46

	humanes CD46	bovine Antigene
zelluläre Lokalisation	Typ 1 Membranprotein der Plasmamembran	Zelloberflächenprotein mit Verankerung in der Zytoplasmamembran ^{a)}
Vorkommen	alle kernhaltigen Zellen ^{b)}	alle untersuchten Zellen und Gewebe ^{c)}
Darstellung in der SDS-PAGE	heterogen mit zwei Hauptbanden bei 50-58 kD bzw. 59-68 kD ^{d)} 	zwei unscharfe Banden um 60 bzw. 93 kD ^{e)} 
Molekulargewichts-„shift“ durch Abspaltung der N-Glykane	beide Proteinbanden ca. 20 kD ^{f)} 	beide Proteinbanden ca. 20 – 25 kD ^{g)} 

^{a)} siehe 3.1.2.2; ^{b)} Liszewski et al. (1991); ^{c)} siehe 3.1.2.4; ^{d)} Post et al. (1991); ^{e)} siehe 3.1.2.1; ^{f)} Liszewski & Atkinson (1992), Abb. aus Nanche et al., (1992); ^{g)} siehe 3.1.2.1

Neben den Übereinstimmungen in der Größe und dem Ausmaß der N-Glykosylierung war die Heterogenität der CD46 Proteinbanden, die durch das Vorkommen unterschiedlicher Isoformen hervorgerufen wird, besonders bemerkenswert. Da es sich um verschiedene Isoformen handelt, die in einem Großteil der Aminosäuresequenz jedoch identisch sind,

werden auch hier mehrere Proteinbanden von einem einzigen monoklonalen Antikörper erkannt. Auch das unscharfe Erscheinungsbild der beiden Banden des humanen CD46, das auf das Vorkommen von variabler O-Glykosylierung in der STP-Region zurückgeführt wird (Ballard et al., 1988), tritt bei den bovinen Antigenen in ähnlicher Form auf, wobei die Molekulargewichte jedoch abweichen. In der Peptidsequenz A18 des gereinigten bovinen Proteins wurden nur 50 - 60% Aminosäuren gefunden, die mit entsprechenden CD46 Sequenzen identisch waren. Da es sich bei CD46 um ein nicht hoch konserviertes Protein handelt, sind keine höheren Aminosäureidentitäten des bovinen Homologs zu erwarten.

Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass durch die Literaturrecherche keine Eigenschaften des CD46 zutage traten, die mit den bisher bekannten Daten über die bovinen Zelloberflächenproteine unvereinbar gewesen wären. Die naheliegende Hypothese, dass es sich bei den gesuchten mutmaßlichen Virusrezeptoren um Spleissvarianten des bovinen CD46 handelte, sollte im Folgenden durch Klonierung und Sequenzierung der entsprechenden cDNA bewiesen werden.

3.4 Identifizierung des bovinen CD46

3.4.1 Klonierung und Sequenzierung des Gens für das bovine CD46

Zur Überprüfung der Annahme, dass das gereinigte und teilsequenzierte bovine gp55–60 Varianten des bovinen CD46 repräsentiert, sollte das entsprechende Gen kloniert und sequenziert werden. Ausgehend von der aus der Teilsequenzierung bekannten internen Aminosäuresequenz A18 (CVXPAIEHGTIVSGFGPK) ließen sich Oligonukleotide ableiten, die grundsätzlich als Sonden für die Durchsuchung einer bovinen cDNA Bank geeignet gewesen wären. Als methodisch einfacherer Ansatz bot sich jedoch eine andere Vorgehensweise an.

Wie bereits erwähnt standen cDNA Sequenzen des CD46 verschiedener Spezies zur Verfügung. Der Anteil identischer Aminosäuren innerhalb der SCR Domänen des CD46 spiegelt den Verwandtschaftsgrad der Spezies wieder. Sowohl zwischen den Primaten als auch den Nagetieren sind 70 - 80% der Aminosäuren identisch. Der Anteil identischer Aminosäuren zwischen Angehörigen wenig verwandter Spezies beträgt jedoch nur um die 50%, im Falle des Schweins teilweise sogar noch deutlich weniger. Zwischen Schwein und

Rind, die beide den Paarhufern angehören, besteht allerdings eine engere phylogenetische Verwandtschaft. Folglich war zu fordern, dass zwischen bovinem und porzinem CD46 eine höhere Übereinstimmung besteht. Mit Hilfe der bereits bekannten Nukleinsäuresequenz des porzinen CD46 sollte versucht werden, das bovine CD46 in einer entsprechenden cDNA Bank aufzufinden.

3.4.1.1 „Northern blot“ Analyse

Zunächst musste abgeklärt werden, ob sich die bovine mRNA mit Hilfe einer aus der porzinen cDNA stammenden Sonde in einer „Northern blot“ Analyse nachweisen ließe. Nur in diesem Fall könnte die Durchsuchung einer bovinen cDNA Bank mit einer porzinen Sonde zum Erfolg führen. Die Klonierung des porzinen cDNA Fragments erfolgte über eine „polymerase chain reaction“ mit reverser Transkriptase (RT-PCR) ausgehend von mRNA der Schweine-Nierenzelllinie PK15. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

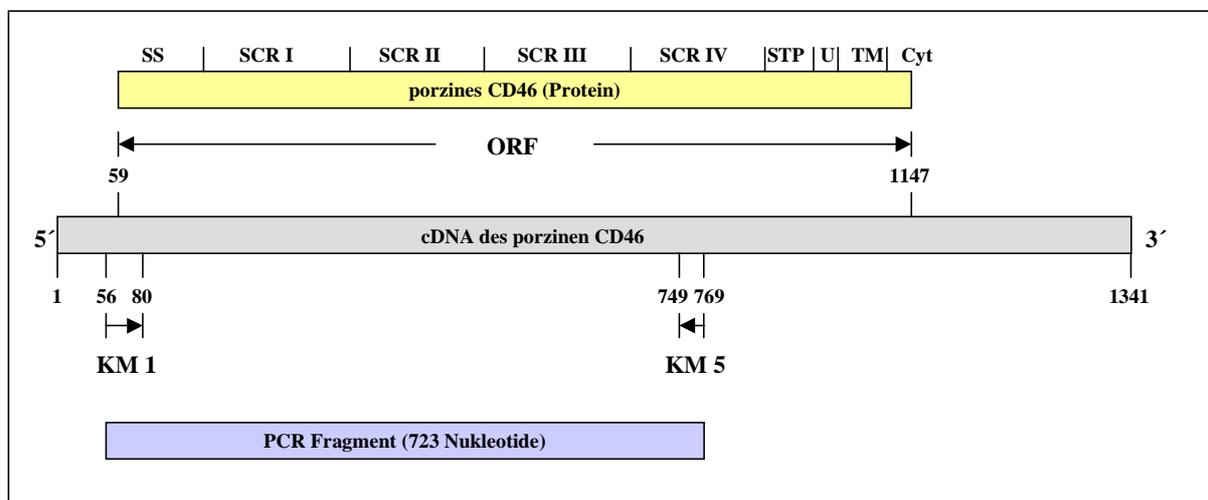


Abb. 17: Schematische Darstellung zur Herstellung der Hybridisierungssonde

Im mittleren Teil der Abbildung ist die Nukleotidsequenz der porzinen CD46 cDNA dargestellt (Toyomura et al., 1997), Nucleotidpositionen sind durch Ziffern gekennzeichnet. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz mit den entsprechenden Strukturbereichen ist im oberen Teil zu sehen (ORF: „open reading frame“; SS: „signal sequence“; SCR: „short consensus repeat“; STP: „serine/threonine/proline rich region“; U: „region of unknown function“; TM: „transmembrane domain“; Cyt: „cytoplasmic domain“). Im unteren Teil der Abbildung ist die Lage und die Orientierung der „primer“ KM 1 und KM 5 (Pfeile) sowie das resultierende PCR Fragment dargestellt.

Die zur Klonierung benötigten „primer“ wurden von der publizierten cDNA des porzinen CD46 (Toyomura et al., 1997) abgeleitet. Als Minusstrang „primer“ diente das Oligonukleotid KM5 (5'-ACATTTGACCACTTTACTC-3'), das im kodierenden Strang der porzinen CD46 cDNA den Nukleotidpositionen 769-749 entsprach. Das Oligonukleotid KM1 (5'-TTTGAATTCAAATGATGGCGTTTTGCGCGCTGC-3'), das als „primer“ für die Plusstrang Synthese verwendet wurde, enthielt im 3'-Bereich eine Sequenz von 24 Nukleotiden, die am Anfang des translatierten Bereichs (Nukleotidpositionen 56-80) der porzinen cDNA lokalisiert war. Die zusätzlich am 5'-Ende dieses „primers“ enthaltene Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI sollte spätere Klonierungsschritte erleichtern. Das durch die RT-PCR Reaktion synthetisierte cDNA Fragment hatte eine Länge von 723 Nukleotiden und deckte die 5'-Hälfte der kodierenden Sequenz des Gens ab. Auf Aminosäureebene entspricht dies etwa drei Viertel der extrazellulären Domäne des Typ-I Membranproteins (siehe Abbildung 17).

Das auf diese Weise synthetisierte PCR Fragment wurde phosphoryliert, mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten und in ein mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SmaI geschnittenes, dephosphoryliertes pBluescript SK Plasmid ligiert (pporcKM1). Die Identität des auf diese Weise klonierten DNA Fragments konnte in den resultierenden Klonen durch Sequenzierung verifiziert werden. Anschließend wurde das Fragment aus dem Plasmid geschnitten und durch „Nick-translation“ radioaktiv markiert. Dieses Fragment mit porziner, CD46-spezifischer Nukleotidsequenz wurde als Sonde in einer „Northern Blot“ Analyse verschiedener RNAs verwendet. Hierzu diente sowohl Gesamtzell-RNA als auch isolierte mRNA (polyA-RNA) aus porzinen PK15 Zellen und bovinen MDBK Zellen. Zusätzlich wurden beide RNA Präparationen von „baby hamster kidney“ Zellen (BHK-21) in die Untersuchung mit eingeschlossen. Um nicht nur die CD46 mRNA des Schweins sondern auch die homologe mRNA vom Rind detektieren zu können, wurden hierbei unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen verwendet. Das Ergebnis der „Northern blot“ Analyse ist in Abbildung 18 dargestellt.

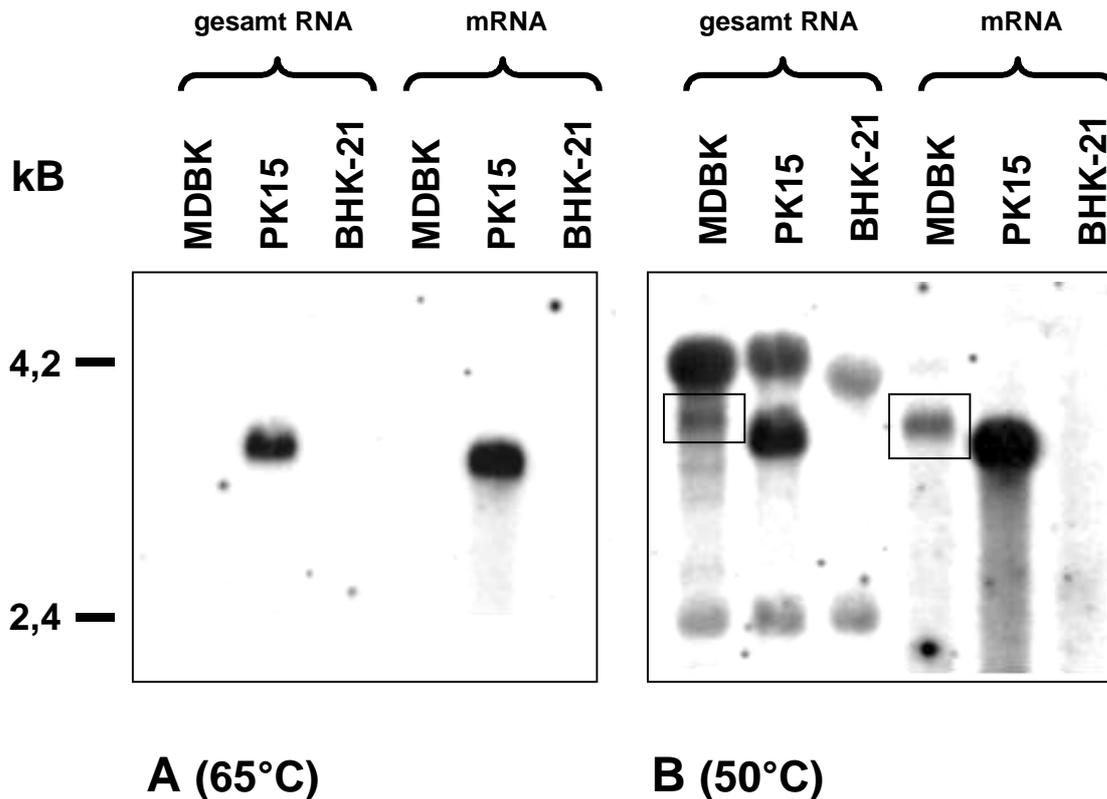


Abb. 18: „Northern blot“ Analyse der Gesamtzell-RNA und mRNA von Zellen verschiedener Spezies

Die Spuren mit Gesamtzell-RNA enthalten je 10 μ g, die Spuren mit polyA-RNA je 1 μ g Ribonukleinsäure. Die Hybridisierung fand in **A** bei 65°C, in **B** bei 50°C statt. Die zur Hybridisierung verwendete Sonde enthielt einen Teil der extrazellulären Domäne des porcinen CD46 (siehe Abb. 15). Die Zahlen am linken Rand geben die Größe unspezifisch erkannter, ribosomaler RNA an (4,2 kB: 28S RNA; 2,4 kB: 18S RNA). Die in **B** umrandeten Banden in den Spuren mit RNA von MDBK Zellen repräsentieren die spezifisch erkannte mRNA des bovinen CD46.

Bei hoher Hybridisierungsstringenz (65°C) konnte nur in den Spuren mit porciner RNA ein spezifisches Signal in der Höhe von etwa 3,6 kB für das CD46 detektiert werden. Eine Kreuzhybridisierung mit RNA aus Rinder- und Hamsterzellen fand hier nicht statt (Abbildung 18 A). Da es sich bei CD46 um ein wenig konserviertes Protein handelt, waren auch in den homologen Nukleinsäuresequenzen geringere Übereinstimmungen zu erwarten. Um dennoch eine spezifische Reaktion der porcinen Sonde mit boviner mRNA zu erreichen, wurden weniger stringente Hybridisierungsbedingungen gewählt. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C gelang der Nachweis einer etwa 3,8 kB großen Bande in den Spuren mit RNA aus bovinen Zellen. Bei diesen Bedingungen kam es auch zu einer unspezifischen Reaktion der markierten Sonde mit 28S RNA und 18S RNA aller drei

Spezies. In den Spuren, in denen isolierte mRNA aufgetragen wurde, ist jedoch eindeutig zu erkennen, dass eine spezifische Hybridisierung der Sonde aus porciner CD46 RNA mit der bovinen CD46 mRNA stattfand. Der Nachweis einer entsprechenden RNA Spezies aus BHK-21 Zellen gelang erwartungsgemäß nicht (Abbildung 18 B).

3.4.1.2 Durchsuchung einer bovinen cDNA Bank mit heterologer Sonde

Aufgrund der Kreuzhybridisierung einer CD46-spezifischen, porcinen cDNA Sonde mit der entsprechenden bovinen mRNA waren die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Durchsuchung („screening“) einer bovinen cDNA Bank gegeben. Es wurde eine kommerziell erhältliche cDNA Bank aus boviner Milz (Fa. Stratagene) verwendet. Es handelte sich hierbei um gerichtet klonierte und gröbenselektierte cDNA (5'-EcoRI-cDNA-polyA-XhoI-3', max. 10 kB) im Phagenvektor Lambda UniZap XR. Die Phagenbank wurde entsprechend den Angaben des Herstellers titriert und mit einer Dichte von $5 \times 10^4 / 150 \text{ cm}^2$ ausplattiert. Die auf Nylonmembranen übertragenen Phagen Genome wurden denaturiert und mit Hilfe von UV Strahlen immobilisiert. Anschließend fand die Hybridisierung mit der heterologen, CD46-spezifischen Sonde bei 50°C statt. Nach der Analyse von etwa $1,5 \times 10^6$ Phagen-„plaques“ gelang die Isolierung von zwei cDNA Klonen (pbovKM1, pbovKM2), deren DNA mit der verwendeten Sonde spezifisch interagierten. Nach weiterer Aufreinigung durch erneutes „screening“ erfolgte das Isolieren der cDNA „inserts“ aus den Phagen Genomen durch „*in vivo* excision“. Die hierbei entstandenen pBluescript Plasmide enthielten „inserts“ von 3,2 kB (pbovKM1) und 3,5 kB (pbovKM2).

3.4.1.3 Analyse von Teilsequenzen des Gens für das bovine CD46

Durch Sequenzierung sollte eine nähere Charakterisierung der bovinen cDNA aus pbovKM1 und pbovKM2 erfolgen. Die „inserts“ dieser Plasmide wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markierten T7 und T3 „primern“ mit Hilfe eines Sequenzierautomaten analysiert (2.2.5.3), wobei jeweils etwa 1000 Nukleotide bestimmt werden konnten. Die hierdurch erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden unter Zuhilfenahme der publizierten cDNA Sequenz des porcinen CD46 untersucht. Eine schematische Darstellung der homologen Bereiche der bovinen cDNA Klone pbovKM1, pbovKM2 und der porcinen cDNA ist in Abbildung 19 gegeben.

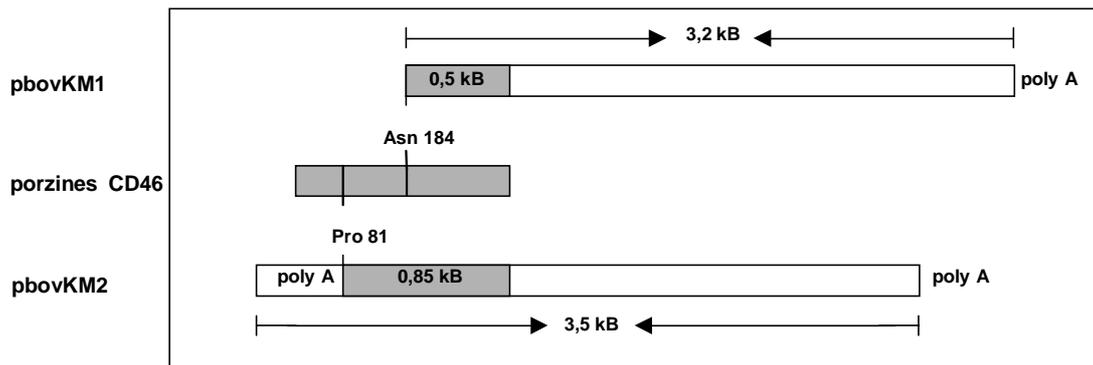


Abb. 19: Schematische Darstellung von bovinen cDNA Klonen

In der Abbildung ist die Lage der CD46-kodierenden Nukleotidsequenzen in den cDNA Klonen pbovKM1 und pbovKM2 schematisch dargestellt. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die bekannte Nukleotidsequenz der porcinen CD46 cDNA (Toyomura et al., 1997).

Die Sequenzanalyse von Klon pbovKM1 ergab am 3'-Ende eine kurze polyA Sequenz, die aus dem 3'-Ende der mRNA stammte. Am 5'-Ende konnte eine dem porcinen CD46 homologe Sequenz bestimmt werden. Verglichen mit der porcinen Sequenz begann sie bei Kodon 184 (Asn) und führte das Leseraster bis zum Stopkodon weiter. Innerhalb dieses Leserasters konnte die durch N-terminale Sequenzierung bestimmte Peptidsequenz unzweifelhaft aufgefunden werden (Kodons 237 (Cys) - 245 (Lys) der porcinen Sequenz, siehe auch Abbildung 20). Hierdurch bestätigte sich die Vermutung, dass es sich bei dem gereinigten Protein um bovines CD46 handelte. Der Vergleich mit der CD46 cDNA des Schweins legte nahe, dass am 5'-Ende dieser cDNA vermutlich etwa 550 Nukleotide der kodierenden Sequenz fehlten.

Die Sequenzanalyse des Klons pbovKM2 ergab ein „open reading frame“ (ORF), das sich, wiederum gemessen an der porcinen cDNA, von Kodon 81 (Pro) bis zum Stopkodon erstreckte. Dieser Klon wies eine ungewöhnliche Struktur auf, da die CD46 kodierende Sequenz an ihrem (nicht authentischen) 5'-Ende von einer nicht-identifizierbaren Sequenz flankiert wurde. Zwischen diesen Sequenzen lag eine kurze polyA Sequenz. Vermutlich handelt es sich bei pbovKM2 um eine chimäre cDNA, die aus der Ligation von zwei verschiedenen cDNA Molekülen hervorgegangen sein kann.

Die Analyse der beiden cDNA Fragmente, deren Sequenzen mit der porcinen CD46 cDNA verglichen werden konnten, hatte ergeben, dass Teile der cDNA des bovines CD46 erfolgreich kloniert worden waren. Eine vollständige Kopie der mRNA lag jedoch nicht vor.

Aus dem Größenvergleich der bovinen mRNA in der „Northern Blot“ Analyse (3,8 kB) und der Größe der cDNA von pbovKM1 (3,2 kb) ergab sich eine fehlende Sequenz von etwa 600 Nukleotiden. Die CD46-kodierende Sequenz von Klon pbovKM2 erstreckte sich im Vergleich zu Klon pbovKM1 etwa 300 Nukleotide weiter in Richtung des 5'-Endes, jedoch fehlten auch hier noch etwa 300 Nukleotide bis zum authentischen 5'-Ende.

3.4.1.4 Durchsuchung einer bovinen cDNA Bank mit homologer Sonde

Um eine vollständige Kopie der CD46 mRNA zu erhalten, wurde dieselbe cDNA Bank erneut analysiert. Hierbei wurde eine homologe Sonde mit Nukleotidsequenzen des bovinen CD46 eingesetzt, die mit Hilfe von Sequenzen aus dem Vektor pbovKM2 generiert wurde. Ein 441 Basenpaare großes Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzymen HindIII und PvuII isoliert und wiederum durch „Nick-Translation“ radioaktiv markiert. Da das „insert“ von pbovKM2 um etwa 300 Basenpaare näher als das „insert“ des pbovKM1 an dem noch nicht bekannten, authentischen 5'-Ende der kodierenden Sequenz lag, bestand so eine größere Chance für die Isolierung eines „volle-Länge“-Klons des bovinen CD46. Im Verlauf des „screenings“, das methodisch analog zu 3.3.1.2 durchgeführt wurde, konnten mehrere cDNA Klone isoliert werden. Der längste cDNA Klon pbovKM3 wies eine Länge von 3,8 kB auf, was der Länge der mRNA in der „Northern blot“ Analyse entsprach.

Da im vorliegenden Zusammenhang nur die für das Protein kodierende Nukleotidsequenz von Interesse war, wurde ein Teilstück dieser cDNA aus pbovKM3 herausgeschnitten, wobei am 5'-Ende die BamHI Schnittstelle aus der MCS des pBluescript SK Plasmids und am 3'-Ende eine interne EcoRI-Schnittstelle verwendet wurde. Die Lage der EcoRI-Schnittstelle hinter dem Stopcodon war bereits aus den Klonen pbovKM1 und pbovKM2 bekannt, sodass sich eine Gesamtlänge des „inserts“ von 2324 bp ergab. Dieses cDNA Fragment wurde in ein pBluescript SK Plasmid ligiert und anschliessend doppelsträngig sequenziert. Neben Standard-„primern“ wurden hierbei spezifische „primer“ verwendet, die an internen Sequenzen der bovinen CD46 cDNA banden. Für den Plusstrang handelte es sich um das Oligonukleotid BVD6i (5'-GGCCAGATGAATATTCCTTG-3'), für den Minusstrang um das Oligonukleotid BVDR7i (5'-ACTACTCCATTCACCATTTCC-3'). Über den ORF hinaus konnten etwa 90 Nukleotide der nicht-translatierten Region am 5'-Ende und über 1000 Nukleotide im Bereich des nicht-translatierten 3'-Endes analysiert werden. Diese Nukleotidsequenz ist im Anhang angegeben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit bekannten CD46-Proteinsequenzen anderer Spezies

verglichen. Ein „alignment“ von CD46 Sequenzen von Rind, Schwein, Mensch und Maus ist in Abbildung 20 dargestellt.

Der Vergleich der aus dem klonierten bovinen Gen resultierenden Aminosäuresequenz mit den Sequenzen des porzinen, murinen und humanen CD46 (Abbildung 20) ergab, dass es sich bei dem gesuchten bovinen Membranprotein tatsächlich um das entsprechende Homologe handelte. Alle bekannten Strukturmerkmale des CD46 konnten in der Sequenz des bovinen Zelloberflächenproteins lokalisiert werden. Der Signalsequenz für Membrantransport folgte die Sequenz der vier SCR, wobei alle stark konservierten Cysteine, die für intramolekulare Disulfidbrücken notwendig sind, identifiziert werden konnten. In Abbildung 18 sind diese Cysteine an den Positionen 51, 80, 97, und 111 (SCR1); 116, 144, 158 und 175 (SCR2); 180, 209, 228, und 241 (SCR3) sowie 246, 274, 288 und 301 (SCR4) zu finden. Analog befinden sich die konservierten Tryptophane an den Positionen 103, 168, 234 und 294. Auffallend war auch die konservierte Sequenz CKVVKC (Positionen 241-246), die bei allen Proteinen vorhanden war. Die bei der Datenbanksuche verwendete Eingabesequenz A18 (CVYPAIEHGTIVSGFGPK) konnte in SCR4 an Position 246-263 aufgefunden werden. Auch die anderen, aus Peptidgemischen des gereinigten Proteins stammenden Sequenzen waren enthalten: B21 (FVSMKPQGTLKPSYSPGEQIV) befand sich in SCR1 an Position 57-77, C10 (VFEYNEVVTY) in SCR3 an Position 198-207 und D13 (ILCQPPPEYQNGK) ebenfalls in SCR3 an Position 178-190. Obwohl bei dem „alignment“ die kürzeste der menschlichen CD46 Spleissvarianten verwendet wurde, war der Bereich der STP- und der U-Region beim bovinen Homolog kürzer. Wie bei der Transmembranregion waren auch hier kaum Homologien erkennbar. Am C-Terminus konnte jedoch neben der in Abbildung 20 dargestellten zytoplasmatischen Sequenz (Isoform 1) eine weitere, um 7 Aminosäuren längere Sequenz (Isoform 2) ermittelt werden (siehe Abbildung 21).

1 M X A X C X - L X X X L P C R R E X P F S S - - F - - - W - - - G V L L X A L majority
 10 20 30 40

1 M R A S C T P L K A P L R - R P E R L A S S G R F A - - - W - - - V L L L A P Rind
 1 M M A F C A - L R K A L P C R P E N P F S S R C F V E I L W - - - V S L - A L Schwein
 1 M E P - - - - - - - P G R R E C P F P S - - - - - W R F P G L L L A A M Mensch
 1 M T A A P L M P D S T H P C R R R K S Y T F - - - - - F W C S L G V Y A E A L Maus

31 V L L L P X X S D A C D E P P X F E A M E L O G T L K P X Y X P G E R V E Y E C majority
 50 60 70 80

← B21 →

33 L L L L P T S S D A C D D P P R F V S M K P Q G T L K P S Y S P G E Q I V Y E C Rind
 35 V F L L P M P S D A C D E P P K F E S M R P Q - F L N T T Y R P G D R V E Y E C Schwein
 25 C L L L Y S F S D A C E E P P T F E A M E L I G K P K P Y Y E I G E R V D Y K C Mensch
 35 L F L L S H L S D A C E L P R P F E A M E L K G T P K L F Y A V G E K I E Y K C Maus

71 K K G F O Y X X P - L X T X X V C O D N N T W S P L S D E G C X K X X C P X L X majority
 90 100 110 120

SCR 1

73 H L G F Q P V T P G Q V L A L V C Q D N N T W S S L - Q E G C K K R R C P T L A Rind
 75 R P G F Q P M V P A L P T F S V C Q D D N T W S P L - Q E A C R R K A C S N L P Schwein
 65 K K G Y F Y I P P - L A T H T I C D R N H T W L P V S D D A C Y R E T C P Y I R Mensch
 75 K K G Y L Y L S P - Y L M I A T C E P N H T W V P I S D A G C I K V Q C T M L Q Maus

110 D P L N G Q V X Y X N G X X E F G S X A H F T C N E G Y Y L I G X E I L Y C E V majority
 130 140 150 160

SCR 2

112 D P T N G Q V I L V N G N T E F G S E V H Y V C N N G Y Y L L G T N I S Y C E V Rind
 114 D P L N G Q V S Y P N G D M L F G S K A Q F T C N T G F Y I I G A E T V Y C Q V Schwein
 104 D P L N G Q A V P A N G T Y E F G Y Q M H F I C N E G Y Y L I G E E I L Y C E L Mensch
 114 D P S F G K V Y Y I D G S F S W G A R A K F T C M E G Y Y V V G M S V L H C V L Maus

150 S G G X X A X W S G X P P X C E K I L C X P P P E I K N G K H T N S H K D V F E majority
 170 180 190 200

← D13 →

152 S S G T G V N W S D N P P T C E K I L C Q P P P E I Q N G K Y T N N H K D V F E Rind
 154 S - G N V M A W S E P S P L C E K I L C K P P G E I P N G K Y T N S H K D V F E Schwein
 144 K G S V - A I W S G K P P I C E K V L C T P P P K I K N G K H T F S E V E V F E Mensch
 154 K G D D E A Y W N G Y P P H C E K I V C L P P P K I K N G T H T L T D I N V F K Maus

190 Y N E A V T Y S C D P S P G P D E F S L V G E S X L F C I G N X E W S S X P P E majority
 210 220 230 240

C10 → SCR 3

192 Y N E V V T Y S C D P S N G P D E Y S L V G E S K L T C I G N G E W S S Q P P Q Rind
 193 Y N E V V T Y S C L S S T G P D E F S L V G E S S L F C I G K D E W S S D P P E Schwein
 183 Y L D A V T Y S C D P A P G P D P F S L I G E S T I Y C G D N S V W S R A A P E Mensch
 194 Y H E A V S Y S C D P T P G P D K F S L V G T S M I F C A G H N T W S N S P P E Maus

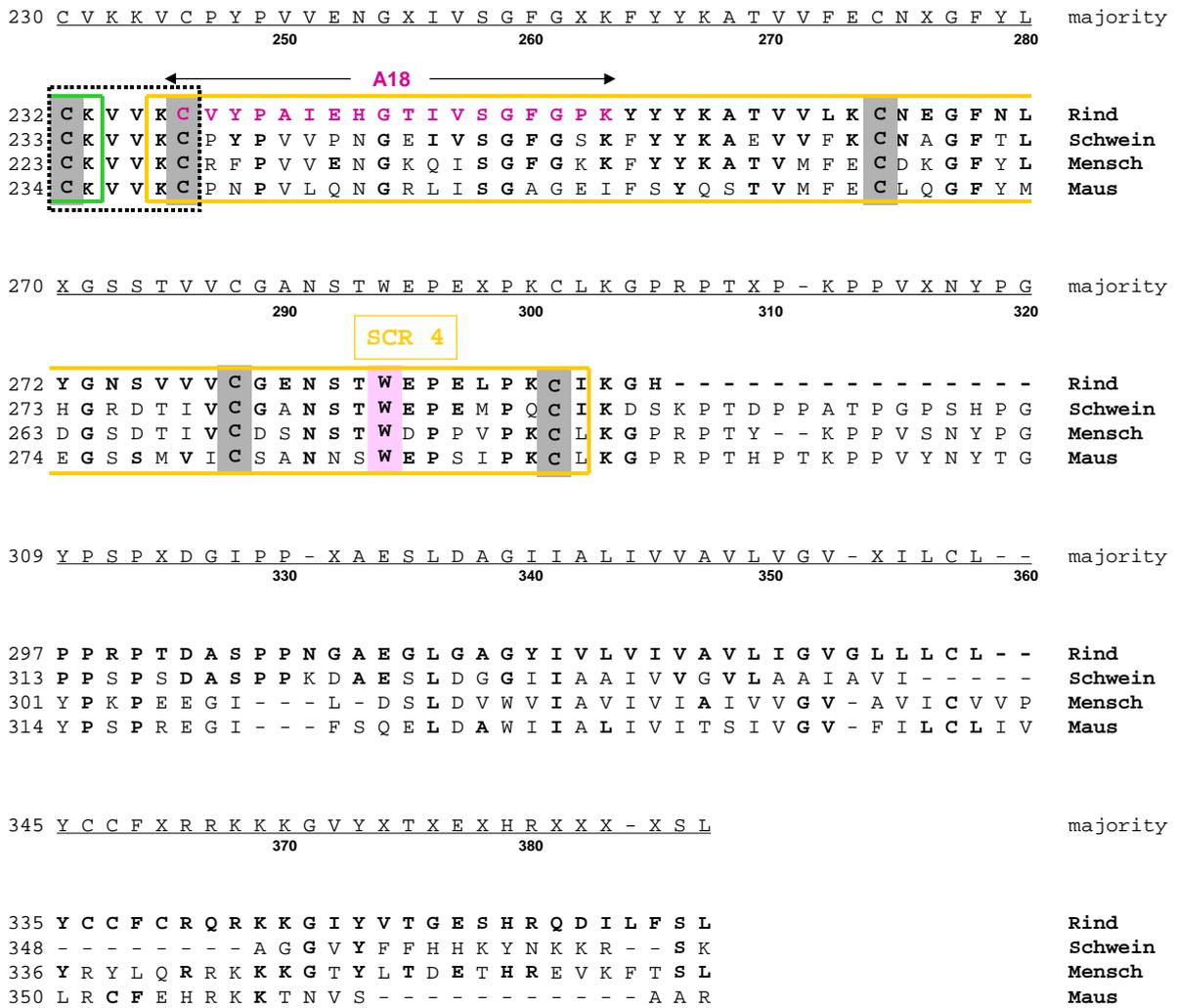


Abb. 20: „Alignment“ von CD46 Aminosäuresequenzen von Rind, Schwein, Mensch und Maus

Beim humanen CD46 wurde die kürzeste der bekannten Spleissvarianten verwendet. Die mit der Bezeichnung „majority“ dargestellte Sequenz beinhaltet Aminosäuren, die in mindestens zwei der abgebildeten Aminosäuresequenzen identisch sind. Aminosäuren, die mit der bovinen CD46 Sequenz übereinstimmen, sind fett gedruckt. Die SCR-Domänen („short consensus repeats“) sind durch farbliche Umrahmung markiert. Die jeweils darin enthaltenen konservierten Cysteine und Tryptophane sind farblich unterlegt. Markiert ist ebenso die konservierte Sequenz CKVVKC. Farbige Buchstaben kennzeichnen die durch Aminosäuresequenzierung gewonnenen Peptidsequenzen A18, B21, C10 und D13 (siehe 3.2.3).

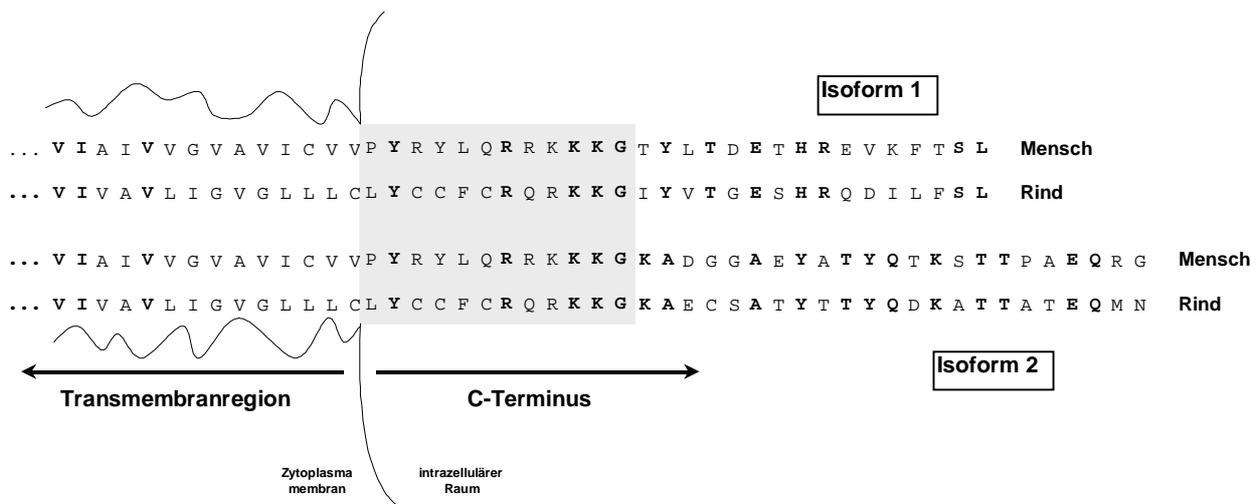


Abb. 21: „Alignment“ verschiedener zytoplasmatischer Domänen von Rind und Mensch

Dargestellt sind die C-terminalen Sequenzen je zweier Isoformen (1 und 2) des CD46 von Mensch und Rind. Identische Aminosäuren der homologen Proteine sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Der an der Plasmamembran gelegene Bereich, der bei beiden Isoformen identisch ist, ist grau unterlegt.

Isoform 1, die in den cDNA Klonen pbovKM2 und pbovKM3 kodiert war, enthielt am C-Terminus die Sequenz **H₂N...LYCCFCRQRKKGIYVTGESHRQDILFSL-COOH**. Die C-terminale Sequenz von Klon pbovKM1 lautete dagegen **H₂N...LYCCFCRQRKKGKAEC SATYTTYQDKATTATEQMN-COOH** (Isoform 2). Ein Vergleich mit C-terminalen Sequenzen von verschiedenen Spleissvarianten des humanen CD46 ließ erkennen, dass die beiden bovinen CD46 Isoformen in ihrer Länge mit humanen Sequenzen übereinstimmten und entsprechende Homologien zeigten. Ein „alignment“ des C-terminalen Sequenzabschnitts der bovinen und humanen CD46 Isoformen ist in Abbildung 21 dargestellt. Abgesehen von der C-terminalen Region enthielten die drei isolierten bovinen cDNA Klone keine unterschiedlichen Spleissvarianten.

Ein Vergleich der vier SCR Domänen des bovinen CD46 mit den entsprechenden Sequenzen anderer Spezies ergab, dass das bovine CD46 dem porzinen Homolog tatsächlich am ähnlichsten ist (Tabelle 6). 60 % der Aminosäuren stimmen in diesen beiden Homologen überein. Im Vergleich hierzu sind nur knapp 50 % der im bovinen CD46 vorkommenden Aminosäuren auch in Primatensequenzen vorhanden (Mensch 47%, Tamarin 47%, Green

monkey 50%), die Übereinstimmungen mit Nagersequenzen sind noch geringer (Maus 41%, Ratte 43%).

Tab. 6: Aminosäureidentitäten des CD46 verschiedener Spezies innerhalb der SCR Domänen^{a)}

Mensch	Tamarin	Green monkey	Maus	Ratte	Schwein	
50%	47%	50%	41%	43%	60%	Rind

^{a)} Aminosäureidentitäten wurden mit Hilfe des Programms BLASTP (Altschul et al., 1997) errechnet.

3.4.2 Expression des bovinen CD46 im T7-Vaccinia-Expressionssystem

Um die Rolle von CD46 bei den frühen Schritten einer BVDV Infektion untersuchen zu können, stand als nächster Schritt die Expression des Proteins in nicht-infizierbaren Zellen an. Hierzu war zunächst die Umklonierung der kodierenden Sequenz in einen geeigneten Expressionsvektor notwendig. Hierzu wurde das pcDNA3 Plasmid verwendet, das unter anderem einen T7-RNA-Polymerase-Promotor enthält. Dies ermöglichte eine Expression der bovinen CD46 cDNA in eukaryotischen Zellen mit Hilfe des rekombinanten Vaccinia Virus VTF7-3.

Aus dem Vektor pbovKM3 wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI ein 2,4 kb großes, den gesamten ORF des bovinen CD46 enthaltendes Fragment isoliert und in ein entsprechend geschnittenes pcDNA3 Plasmid ligiert. Das resultierende Expressionsplasmid trug den Namen pbovKM4. Zur heterologen Expression wurden BHK-21 Zellen verwendet. Zunächst wurde das bovine CD46 durch immunhistochemischen Nachweis mit mAk 17 in den fixierten Transfektanten detektiert. Nicht-transfizierte BHK-21 Zellen sowie solche, die zur Kontrolle nur mit dem pcDNA3 Vektor transfiziert worden waren, wurden von mAk 17 nicht erkannt. Dagegen konnten die mit pbovKM4 transfizierten Zellen auf diese Weise sehr stark angefärbt werden (nicht gezeigt).

Da die Signalsequenz für die Oberflächenlokalisierung des CD46 in der bovinen cDNA enthalten war, war die Voraussetzung der Lokalisation des exprimierten Proteins auf der Oberfläche der transfizierten Zellen gegeben. Um dies nachweisen zu können, wurden die Oberflächenstrukturen der transfizierten BHK-21 Zellen unmittelbar vor der Lyse mit Biotin markiert und anschließend einer Immunpräzipitation mit mAk 17 unterzogen. Durch die Behandlung der mAk 17 Immunpräzipitate mit der N-Glykosidase PNGase F sollte zudem untersucht werden, ob eine korrekte N-Glykosylierung des CD46 stattgefunden hatte. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

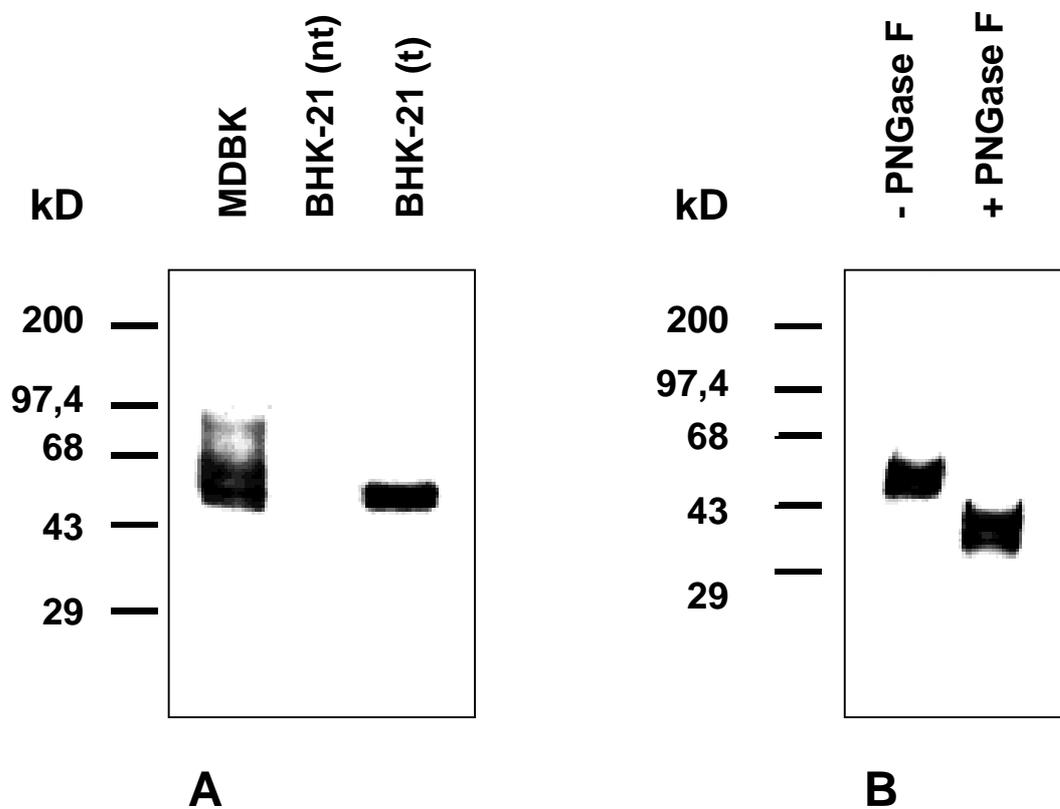


Abb. 22: Expression von bovinem CD46 in BHK-21 Zellen

BHK-21-Zellen wurden mit dem rekombinanten Vacciniavirus VTF7-3 infiziert und anschließend mit Plasmid pbovKM4 transfiziert (s. 2.2.1.7.1). Vor der Zellyse wurden die Proteine auf den Zelloberflächen biotinyliert und anschließend mit mAk 17 immunpräzipitiert. **A:** Immunpräzipitate von MDBK Zellen (Positivkontrolle), nicht-transfizierten BHK-21 Zellen (nt, Negativkontrolle) und transfizierten BHK-21 Zellen (t) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. **B:** Das Immunpräzipitat transfizierter BHK-21 Zellen wurde in An- und Abwesenheit von PNGase F inkubiert und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte durch den Nachweis von Streptavidin-Peroxidase Komplexen mit Hilfe von Chemilumineszenz. Die Positionen des als Größenmarker in einer separaten Gelspur aufgetrennten, gefärbten Molekulargewichtsstandards (Fa. Gibco BRL) wurden nach der Exposition auf den Röntgenfilm übertragen.

In den Lysaten der mit dem Expressionsplasmid pbovKM4 transfizierten BHK-21 Zellen konnten Antigene des mAk 17 nachgewiesen werden (Abbildung 22 A). Die Proteinbande befand sich in der gleichen Höhe wie die 60 kD Bande des Immunpräzipitats aus MDBK Zellen, das zur Kontrolle in der linken Spur aufgetrennt wurde. Im Erscheinungsbild unterschieden sich die Proteinbanden jedoch voneinander. Das in BHK-21 Zellen exprimierte Protein war klarer definiert und schien sich zudem als Doppelbande darzustellen. Die Untersuchung der N-Glykosylierung ergab weitere Übereinstimmung des heterolog exprimierten Proteins mit dem authentischen bovinen Protein, da durch Inkubation mit PNGase F eine ähnliche Molekulargewichtsverschiebung hervorgerufen werden konnte (Abbildung 22 B, siehe auch Abbildung 6). Das nicht gespaltene Protein ist in der linken Spur aufgetrennt, die rechte Spur zeigt die Bande des Proteins nach Inkubation mit PNGase F. Auch hier wurde deutlich, dass sich das Protein, das einer einzigen cDNA entstammt, in der SDS-PAGE nicht in einer Einzelbande darstellt.

3.5 Heterologe Expression des bovinen CD46 und funktionelle Untersuchungen

Im Verlauf der bisherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Antigenen der mAk 17, mAk 26 und mAk 27 um verschiedene Isoformen des bovinen Zelloberflächenproteins CD46 (CD46_{bov}) handelte. Da die infektionshemmende Eigenschaft der drei mAk (siehe 3.1.1.2) auf eine Beteiligung des CD46_{bov} bei den frühen Schritten der BVDV Infektion hinweist, konnte nunmehr eine funktionelle Untersuchung dieses Proteins erfolgen. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Zelllinien, die durch BVD Viren nicht oder nur sehr ineffektiv infizierbar sind, durch die heterologe Expression des CD46_{bov} modifiziert.

3.5.1 Herstellung stabiler Zelllinien

In Abschnitt 3.3.2.2 war bereits die transiente Expression des Gens für das CD46_{bov} in Hamsterzellen mit Hilfe des T7-Vaccinia-Systems erfolgt. Für funktionelle Untersuchungen war hingegen die Etablierung von Zelllinien notwendig, die das fremde Gen über einen längeren Zeitraum gleichmäßig exprimieren. Auch die Überinfektion mit Vaccinia Viren sollte bei diesen Experimenten vermieden werden. Eine stabile Expression kann durch Integration des Fremdgens in der chromosomalen DNA der Zellen erreicht werden.

In diesem Fall wurde der Vektor pbovKM4 verwendet, der die Sequenz des CD46_{bov} sowie das Resistenzgen für das Zellgift G418 unter Kontrolle des „immediate early“ Promotors des humanen Cytomegalovirus (ie-hCMV) Promotors enthielt. Die Integration des Plasmids pbovKM4 in die chromosomale DNA wurde durch Linearisierung mit Hilfe des Restriktionsenzym PvuI erleichtert. Stabil transfizierte Zellen konnten durch den Zusatz von 400 µg/ml G418 im Wachstumsmedium selektiert werden. Durch immunhistologischen Nachweis mit mAk 17 konnte auch die Expression des CD46_{bov} bestätigt werden.

Bei den ersten Versuchen zur Herstellung stabiler, CD46_{bov}-exprimierender Zelllinien wurden zunächst nur BHK-21 Zellen verwendet. Es stellte sich heraus, dass der Vektor pbovKM4 hierfür nicht geeignet war. Schon nach fünf bis zehn Passagen der G418-resistenten Zelllinien ging die Expression des CD46_{bov} teilweise oder ganz verloren, was an einer inhomogenen Verteilung antigenpositiver Zellen erkennbar war. Da der im pcDNA3 Vektor verwendete ie-hCMV-Promotor eine sehr starke Transkription der ihm nachgeschalteten Gene verursacht, lag der Verdacht nahe, dass die hohe Überexpression des CD46_{bov} toxische Effekte hatte und einen Selektionsnachteil verursachte. Aus dem pcDNA3 Vektor wurde daher der ie-hCMV-Promotor mit Hilfe der Restriktionsenzyme SmaI und HindIII entfernt. Der schwächere Promotor für den humanen Elongationsfaktor 1 α (EF-Promotor) (Mizushima & Nagata, 1990), wurde mit den Restriktionsenzymen NruI und HindIII aus dem Plasmid pEF321 geschnitten und an Stelle des ie-hCMV Promotors in das pcDNA3 Plasmid kloniert. Zu diesem Zweck mussten an den SmaI und NruI Schnittstellen der entsprechenden DNA Moleküle glatte Enden hergestellt werden. In die „multiple cloning site“ (MCS) des resultierenden Plasmids wurde das Gen für das bovine CD46 analog zu 3.4.2 kloniert und erhielt anschließend den Namen pbovKM5. Nach der Transfektion mit pbovKM5 konnten Zellklone isoliert werden, die sich sowohl durch die Resistenz gegen G418 als auch durch die stabile Expression des CD46_{bov} auszeichneten. Alle Zellklone zeigten bei mindestens vier bis zehn Passagen eine gleichmäßige Expression des Antigens.

3.5.2 Steigerung der Infektionseffizienz von BVDV NADL durch Expression des bovinen CD46

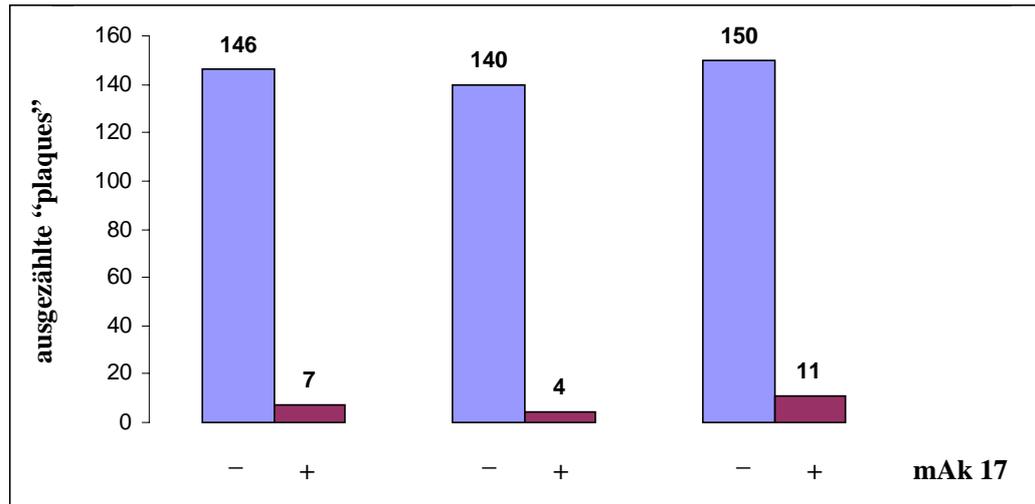
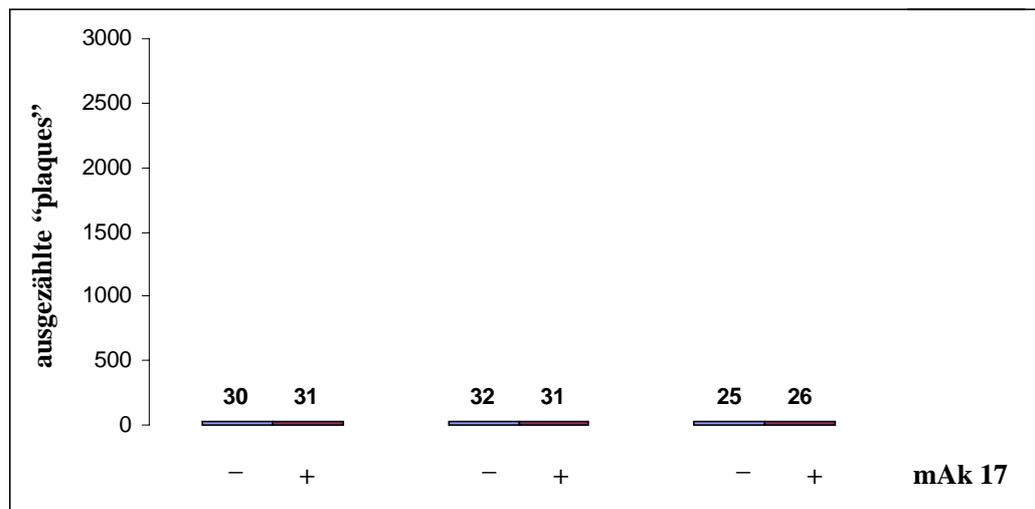
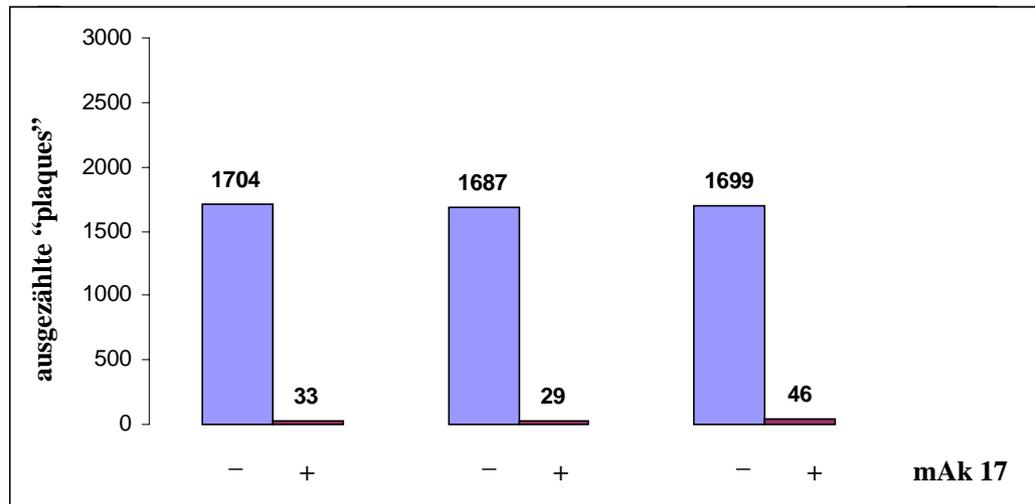
Zur Untersuchung der Funktion des CD46_{bov} bei der Infektion mit BVDV NADL dienten vier Zelllinien unterschiedlicher Spezies. Hamster-Nierenzellen (BHK-21), humane

Zellen aus einem Cervix Karzinom (HeLa) und Mäuse-Lymphomzellen (L-Zellen) können mit diesem Virus nicht infiziert werden. Anders verhielt sich diesbezüglich die porcine Nierenzelllinie PK15. Die Infektion dieser Zellen mit BVDV NADL ist prinzipiell möglich. Im Vergleich mit den bovinen MDBK Zellen wird jedoch eine höhere Virusmenge benötigt, um die gleiche Anzahl an virusinfizierten Zellarealen hervorzurufen (T. Rümenapf, persönliche Mitteilung). Nach Transfektion dieser vier Zelllinien mit dem linearisierten Plasmid pbovKM5 und G418-Selektion konnten jeweils mehrere unabhängige Zellklone isoliert werden, die das CD46_{bov} gleichmäßig auf der Oberfläche exprimierten.

Um die Empfänglichkeit der genetisch veränderten Zellen für BVDV zu untersuchen, wurden Infektionsexperimente durchgeführt. Zunächst wurden Zellklone verwendet, die aus den Zelllinien BHK-21, HeLa und L-Zellen hervorgingen. Da diese Zellen normalerweise nicht mit BVD Viren infizierbar sind, wäre eine erfolgreich verlaufende Infektion eine sehr starke Evidenz für die Bedeutung des CD46_{bov} als zellulärer Rezeptor. Im Verlauf der Experimente zeigte sich jedoch, dass ein solcher Effekt nicht zu beobachten war. Bei jeweils mehreren unterschiedlichen Zellklonen CD46_{bov}-exprimierender BHK-21, HeLa und L-Zellen fand auch bei Verwendung hoher Infektionsdosen keine Produktion infektiöser Virusnachkommen statt. Auch durch immunhistochemischen Nachweis konnte kein virales Antigen in den Zellen detektiert werden.

Anders verhielt sich diesbezüglich jedoch die Schweine-Nierenzelllinie PK15. Die Empfänglichkeit nicht-transfizierter Zellen für BVDV NADL war nicht vollständig blockiert, aber die Effektivität der Infektion war um den Faktor 500 bis 1000 niedriger als bei den bovinen MDBK Zellen. PK15 Zellen, die das CD46_{bov} auf ihrer Oberfläche exprimierten, sollten in Infektionsexperimenten untersucht werden. Käme es hierbei zu einer Steigerung der Infektionseffektivität, die durch mAk 17 verhindert werden kann, so wäre dies als ein Hinweis darauf zu werten, dass das CD46_{bov} eine wichtige Rolle beim Eintritt von BVD Viren in die Zielzellen spielt.

Für diese Versuche wurden zwei unabhängige CD46_{bov}-exprimierende PK15 Zellklone (D5/1 und K4) sowie unveränderte PK15 Zellen und MDBK Zellen verwendet. Aufgrund der niedrigen Infektionseffektivität von BVDV NADL auf porcinen Zellen wurde hier eine 100-fache Virusmenge eingesetzt. Im gleichen Experiment sollte auch die Wirkung des mAk 17 auf die Virusinfektion der unterschiedlichen Zellen untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

MDBK**PK15****D5/1**

(Fortsetzung nächste Seite)

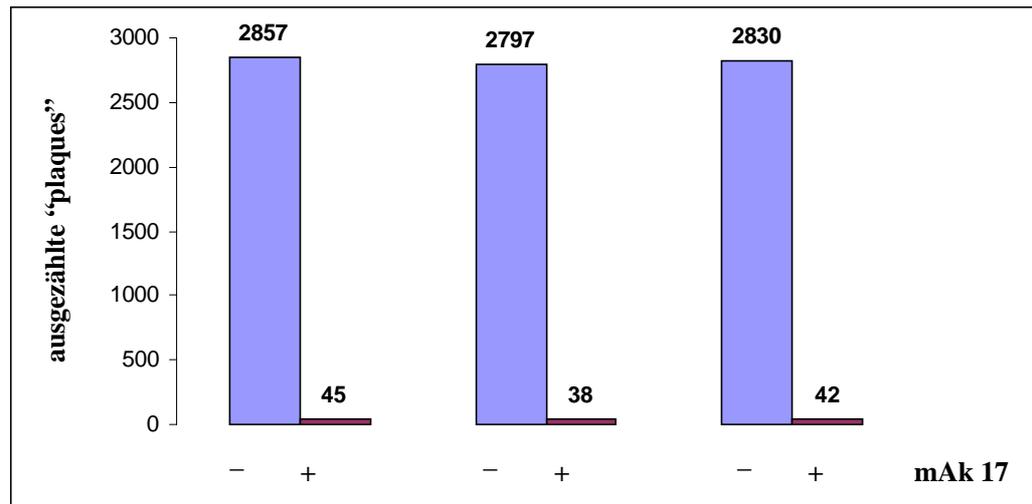
K4

Abb. 23: Effekt der Expression von CD46_{bov} auf die Infektion mit BVDV NADL, Hemmung der Infektion durch mAk 17

Subkonfluente MDBK Zellen, PK15 Zellen und die CD46_{bov}-exprimierenden PK15 Zellklone D5/1 und K4 in 12-, „well“ Zellkulturschalen (Zelldichte ca. 80%) wurden mit PBS (-) oder 1 µg mAk 17 in PBS (+) inkubiert und anschließend mit je 200 µl BVDV NADL inkubiert. Der Ausgangstiter der Viruslösung betrug $7,3 \times 10^6$ IE/ml auf MDBK Zellen. Für MDBK Zellen wurde eine 10^{-4} Verdünnung, für PK15, D5/1 und K4 Zellen eine 10^{-2} Verdünnung verwendet. Der Infektionserfolg konnte nach 24-stündiger Inkubationszeit durch den Nachweis viralen Antigens auf der Oberfläche der fixierten Zellen („plaques“) beurteilt und durch Auszählen quantifiziert werden. Die Anzahl der gezählten „plaques“ von jeweils drei Bestimmungen sind in einzelnen Balken dargestellt.

Zunächst konnte bei der Infektion von MDBK und PK15 Zellen mit BVDV NADL wie erwartet beobachtet werden, dass die Infektionseffizienz des Virus bei PK15 Zellen wesentlich geringer war. Trotz des Einsatzes der 100-fachen Infektionsdosis traten hier sogar weniger „plaques“ auf als bei MDBK Zellen. Bei den transfizierten PK15 Zellklonen D5/1 und K4 hingegen, die das CD46_{bov} auf der Zelloberfläche exprimierten, kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Infektionseffizienz. Verglichen mit nicht-transfizierten PK15 Zellen stieg die Anzahl der ausgezählten „plaques“ etwa um den Faktor 60 (D5/1) bzw. 100 (K4). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Virusinfektion der CD46_{bov}-exprimierenden PK15 Zellen D5/1 und K4 mit mAk 17 ebenso effektiv gehemmt werden konnte wie bei MDBK Zellen. Auf die Infektion nicht-transfizierter PK15 Zellen hatte mAk 17 dagegen keinen hemmenden Effekt (Abbildung 23).

Zur besseren Beurteilung der Auswirkungen der CD46_{bov}-Expression auf die Infektion mit BVDV NADL wurden unter Verwendung der Mittelwerte der drei Bestimmungen (Abbildung 23) sowohl die Infektionseffizienz als auch die

Hemmungseffizienzen von mAk 17 berechnet. Die Infektionseffizienz wurde mit Hilfe der Formel

$$(100 : \text{Infektionsdosis}) \times \text{ausgezählte „plaques“} = \text{Infektionseffizienz [\%]}$$

berechnet. Da für die Berechnung der Hemmungseffizienz in diesem Fall nicht die Infektionsdosis sondern die ausgezählten „plaques“ ohne Vorinkubation mit mAk zugrunde liegen sollten, galt die Formel

$$100 - ((100 : \text{„plaques“} (- \text{mAk})) \times \text{„plaques“} (+\text{mAk})) = \text{Hemmungseffizienz [\%]}.$$

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 7: Steigerung der Infektionseffektivität durch bovines CD46, Hemmung durch mAk 17

	Infektionsdosis [IE/Ansatz] ^{a)}	Ø ausgezählte „plaques“ nach Vorinkubation ^{b)}		Infektions- effizienz [%] ^{c)}	Hemmungs- effizienz [%] ^{d)}
		- mAk 17	+ mAk 17		
MDBK	1,45 x 10 ²	145	7	100,23 (3,47)	95,01 (2,24)
		146	4		
		140	11		
PK15	1,45 x 10 ⁴	30	31	0,20 (0,02)	-1,40 (3,94)
		32	31		
		25	26		
D5/1	1,45 x 10 ⁴	1704	33	11,70 (0,06)	97,88 (0,52)
		1687	29		
		1699	46		
K4	1,45 x 10 ⁴	2857	45	19,50 (0,21)	98,53 (0,11)
		2797	38		
		2830	42		

^{a)} Eine infektiöse Einheit (IE) entspricht dem Volumen an virushaltiger Lösung, das auf kultivierten Zellen ein infiziertes Zellareal („plaque“) hervorruft; ein Ansatz entspricht einer Vertiefung einer 12-„well“ Zellkulturschale (2 x 10⁶ Zellen).

^{b)} Jeder Ansatz wurde vor der Infektion entweder mit PBS (- mAk 17) oder 1 µg mAk 17 in PBS (+ mAk 17) inkubiert. Die ausgezählten „plaques“ dreier Bestimmungen sind aufgeführt.

^{c)} Die Infektionseffizienz wurde mit Hilfe der Formel **(100 : Infektionsdosis) x ausgezählte „plaques“ = Infektionseffizienz [%]** berechnet und der Mittelwert aus drei Bestimmungen gebildet. In Klammern ist die entsprechende Standardabweichung angegeben.

^{d)} Die Hemmungseffizienz wurde mit Hilfe der Formel **100 - ((100 : ausgezählte „plaques“ (-mAk 17)) x ausgezählte „plaques“ (+mAk 17)) = Hemmungseffizienz [%]** berechnet und der Mittelwert aus drei Bestimmungen gebildet. In Klammern ist die entsprechende Standardabweichung angegeben.

Aus Tabelle 7 wird ersichtlich, dass die Infektionseffizienz des BVD Virus NADL auf porzinen Zellen durch Expression des CD46_{bov} deutlich gesteigert werden konnte. Verglichen mit MDBK Zellen konnten bei nicht-transfizierten PK15 Zellen bei gleicher Infektionsdosis nur 0,20% der „plaques“ gezählt werden. Bei den CD46_{bov}-exprimierenden Zellklonen hingegen stieg diese Zahl auf 11,75% (D5/1) bzw. 19,50% (K4) der bei MDBK Zellen aufgetretenen „plaques“. Zudem konnte die Steigerung der Infektionseffizienz durch Vorinkubation der Zellen mit mAk 17 rückgängig gemacht werden. Mit 97,88 % (D5/1) und 98,53% (K4) handelte es sich hierbei um die gleichen Hemmungseffizienzen wie bei den zur Kontrolle mitbehandelten MDBK Zellen (Tabelle 7).

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Oberflächenproteinen auf Rinderzellen, die für die Infektion mit dem Pestivirus BVDV eine entscheidende Rolle spielen. Wie im Ergebnisteil beschrieben, gelang die Identifizierung des bovinen CD46 als Rezeptor durch die Verwendung von infektionshemmenden monoklonalen Antikörpern.

Die Beschreibung mutmaßlicher Virusrezeptoren durch Immunaффinitätsreinigung ist ein Verfahren, das bereits in vielen Fällen erfolgreich gewesen ist (Greve et al., 1989; Delmas et al., 1992; Wang et al., 1992; Nanche et al., 1993; Huber et al., 1994; Bearzotti et al., 1999). Die Eigenschaften der verwendeten mAk sind hierbei von zentraler Bedeutung. Mit den von Schelp et al. (1995) isolierten mAk 17, mAk 26 und mAk 27 waren erfolgversprechende Werkzeuge vorhanden. Sie waren im Rahmen einer Untersuchung generiert worden, die ursprünglich auf die Isolierung neutralisierender, also gegen das Virus gerichteter, Antikörper abzielte. Für die Immunisierung diente eine teilgereinigte Viruspräparation (Stamm BVDV NADL), die lediglich durch Ultrazentrifugation konzentriert worden war und daher erhebliche Mengen an Zelltrümmern enthielt. Auf diese Weise konnten drei mAk isoliert werden, die alle dasselbe Bandenmuster boviner Zelloberflächenmoleküle erkannten und das Virus effektiv hemmten. MAk 26 und mAk 27 reagierten nur mit bovinen Zellen. MAk 17 zeigte dagegen Kreuzreaktionen mit Zellen anderer Spezies (Schaf, Ziege), die aber ebenfalls für das BVD Virus empfänglich sind (Schelp et al., 1995). Auch eigene Experimente wiesen darauf hin, dass es sich tatsächlich um unabhängige Hybridomzelllinien handelte. MAk 26 zeichnete sich dadurch aus, dass er als einziger mit SDS-denaturiertem Antigen in der „Western blot“ Analyse reagierte. Zudem gehörte mAk 26 als IgG1 Molekül einer anderen Antikörper-Subklasse an als mAk 17 und mAk 27, die beide als IgG2a-Moleküle typisiert werden konnten. Die Entstehung dreier verschiedener mAk gegen das gleiche Protein, das eigentlich nur als Kontamination in der Viruspräparation enthalten war, unterstützen die Vermutung, dass es sich hierbei um ein an der Invasion von BVD Viren beteiligtes Protein handelt.

Bei den hier beschriebenen Experimenten war zu beobachten, dass sich die infektionshemmende Wirkung der mAk nicht entfalten konnte, wenn die Wirtszellen zuvor mit Viruspartikeln in Kontakt gebracht wurden. Durch tiefe Temperatur (0°C) wurde

sichergestellt, dass es während dieser Vorinkubation nicht zu einer rezeptorvermittelten Endozytose kommen konnte. Hatte die Adsorption der Virionen bereits stattgefunden, so waren die mAk unwirksam. Dieser Befund und eine veränderte Morphologie der Infektionsherde bei Anwesenheit der mAk im Kulturmedium sind gute Hinweise darauf, dass tatsächlich die initiale Bindung an einen zellulären Rezeptor betroffen ist, und nicht nachgeschaltete Prozesse behindert werden.

Die von Schelp et al. (1995) veröffentlichten Experimente zeigten die vollständige Blockierung der Infektion von MDBK Zellen mit dem BVDV Stamm NADL durch Vorinkubation mit mAk 17. In eigenen Untersuchungen konnte jedoch stets eine nicht hemmbare Restinfektion nachgewiesen werden. Eine Erklärung für diese Diskrepanz liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Nachweismethode der Virusinfektion begründet. Der von Schelp et al. verwendete Infektionsnachweis beruhte auf einem „enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA), der unter Zuhilfenahme einer gekoppelten Farbreaktion spektroskopisch ausgewertet wurde. In der hier beschriebenen Untersuchung wurden infizierte Zellen zunächst ebenfalls durch eine gekoppelte Immunreaktion angefärbt, die Auswertung fand aber durch das Zählen von Infektionsherden unter dem Mikroskop statt. Hierdurch wird sogar der Nachweis einzelner infizierter Zellen ermöglicht. Die hierfür erforderliche, geringe Antigenmenge liegt weit unterhalb der Nachweisgrenze eines ELISA. Die so bestimmte Infektionshemmung betrug auch bei Verwendung hoher Infektionsdosen einen Faktor größer als 97,4. Die nicht hemmbare Restinfektiosität konnte auch nicht durch die Verwendung hoher mAk-Konzentrationen unterdrückt werden.

Vermutlich existieren weitere Rezeptoren für BVDV auf Rinderzellen, zumal mehrere infektionsrelevante Faktoren bereits beschrieben worden waren. Die von Xue et al. (1993) isolierten Antikörper unterdrückten die BVDV Infektion in unterschiedlichem Ausmaß je nach untersuchtem Virusstamm, wobei ein bisher nicht charakterisiertes Zelloberflächenprotein von 50 kD auf MDBK Zellen erkannt wurde. Eine weitere Veröffentlichung befasste sich mit mutierten Zelllinien, die aus einer mit einem zytopathogenen BVD Virus (Singer-zp) infizierten Population von MDBK Zellen hervorgegangen waren (Flores & Donis, 1995). Diese sogenannten „cells resistant to BVDV infection“ (CRIB Zellen) waren in Folge weder für BVDV noch für das nahe verwandte Virus der klassischen Schweinepest (CSFV), das bovine Zellen normalerweise infizieren kann, empfänglich. Dieser Befund führte zu der Annahme, dass BVDV und CSFV den gleichen zellulären Faktor zur Infektion boviner Zellen benötigen (Flores et al., 1996). Aufgrund anderer Experimente wurde postuliert, dass das virale Glykoprotein E2 von CSFV

mit den gleichen zellulären Rezeptormolekülen auf der Oberfläche von bovinen und porzinen Zellen interagieren, da die Infektion von CSFV und BVDV durch Vorinkubation der Zellen mit gereinigtem CSFV E2 inhibiert werden konnte (Hulst & Moormann, 1997). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von anti-CD46 Antikörpern die Infektion von bovinen Zellen mit KSP Viren und anderen Pestiviren (BDV, Giraffe) nicht gehemmt werden. Bei dem gemeinsamen zellulären Faktor, der für den Eintritt sowohl von BVDV als auch von CSFV in bovine Zellen benötigt wird, kann es sich demnach nicht um CD46 handeln.

Pestiviren im Allgemeinen und BVD Viren im Speziellen sind in der Lage, die Speziesgrenze zu überwinden und verschiedene Wirte der Ordnung *Artiodactyla* zu befallen (Doyle & Heuschele, 1983; Dahle et al., 1987; Nettleton, 1990). Dieses Verhalten gilt auch bei der experimentellen Infektion von Kulturzellen, wobei die Infektionseffizienzen auf heterologen Zellen variabel sind (Moennig, 1990; Roehle & Edwards, 1994; Bolin et al., 1994). Die Infektion von Zellen der porzinen Nierenzelllinie PK15 mit BVDV NADL war in unseren Experimenten, verglichen mit MDBK Zellen, stets um den Faktor 100 weniger effektiv. Auffallend war hierbei, dass es sich um den gleichen Faktor handelte, der bei der Hemmung der Infektion auf homologen Zellen durch die mAk auftrat. Bei der Infektion mit derselben Virusverdünnung konnten etwa gleich viele Infektionsherde bei PK15 Zellen nachgewiesen werden wie bei MDBK Zellen, die vorab mit mAk 17 inkubiert worden waren. Untersuchungen zur Hemmung der BVDV Infektion von PK15 Zellen konnten mit den vorhandenen Reagentien nicht durchgeführt werden, da mAk 17, mAk 26 und mAk 27 keine Kreuzreaktionen mit porzinen Zelloberflächenproteinen zeigten. Dies erklärt sich durch die wenig ausgeprägte Sequenzhomologie zwischen dem bovinen und dem porzinen CD46. Unter der Voraussetzung, dass die rezeptorbindenden BVD Virusproteine das porzine CD46 ebensowenig erkennen und daher nicht als Rezeptor verwenden können, entspräche die wesentlich niedrigere Infektionseffizienz auf PK15 Zellen der auf MDBK Zellen beobachteten, CD46-unabhängigen Restinfektion.

Die Virusrezeptor-Eigenschaft eines Proteins gilt erst dann als gesichert, wenn seine Expression in nicht-infizierbaren Zellen die erfolgreiche Infektion bzw. die Bindung von Virionen an die Zelloberfläche vermittelt. Deshalb ist die Klonierung des entsprechenden Gens unumgänglich. Wenn keine zusätzlichen Informationen wie zum Beispiel die Chromosomenlokalisierung des Gens (Dörig et al., 1993) oder die spezifische Expression des Proteins auf bestimmten Zelltypen (Dalglish et al., 1984) vorliegen, kann die Auffindung

von Gensequenzen nur durch die Bestimmung der Aminosäuresequenz stattfinden, was die Isolierung des Proteins aus tierischem Material notwendig macht.

Vor der Präparation großer Proteinmengen sollten einige wichtige Strukturaspekte der Antigene von mAk 17 untersucht werden. Durch Behandlung von Immunpräzipitaten mit der Endoglykosidase PNGase F konnten N-gebundene Zuckerketten in beiden Antigenbanden detektiert werden. Eine Erklärung für das Auftreten mehrerer Banden konnte hierdurch aber nicht gefunden werden, da das Erscheinungsbild der Antigene nach Entfernung der Modifikation sogar noch heterogener war. Ein solches Verhalten könnte durch weitere posttranslationale Modifikationen (z.B. O-Glykosylierung, Acetylierung) hervorgerufen werden, was aber aufgrund des Größenunterschieds und der klaren Definition der Proteinbanden bei höheren Molekulargewichten unwahrscheinlich erschien. Die Heterogenität der Banden nach De-N-Glykosylierung deutete eher auf die Existenz von Proteinen mit unterschiedlich langen Polypeptidketten hin. Beispielsweise könnte es sich um Spleissvarianten handeln, die das gleiche Epitop tragen. Zudem konnte durch temperaturabhängige Phasentrennung mit dem Detergens Triton X-114 ein hydrophober Strukturanteil nachgewiesen werden, was für die Proteinreinigung von entscheidender Bedeutung war.

Ein weiterer vorbereitender Schritt zur Proteinreinigung ist die Auswahl einer geeigneten Antigenquelle. Da sich herausgestellt hatte, dass es sich um ubiquitäre Proteine handelte, standen neben bovinen Zelllinien auch eine Reihe von leicht verfügbaren Rinderorganen zur Auswahl. Bei den Untersuchungen zur „Western blot“ Analyse, bei der verschiedene Substanzen zur Blockierung der Nitrozellulosemembran nach dem Transfer getestet wurden, ergab sich auch der Nachweis von CD46 in Kuhmilch. Bei Verwendung von Trockenmilchpulver erkannte mAk 26 anschließend die gesamte Membranfläche als spezifisches Signal. Wurde in einem weiteren Experiment gelöstes Trockenmilchpulver in der SDS-PAGE aufgetrennt, so konnte mit mAk 26 das charakteristische Bandenmuster detektiert werden. Es handelte sich nicht um eine sezernierte Variante, da durch TX-114 Phasentrennung auch bei diesem Protein ein hydrophober Anteil bestätigt wurde. Das Vorhandensein eines Zellmembranproteins in der Milch als einem Sekretionsprodukt erscheint zunächst ungewöhnlich. Milch enthält jedoch einerseits aufgrund der mit Membranverlust einhergehenden Sekretion von Fetttropfen, andererseits durch das Vorkommen von Leukozyten Zellmembranen, die natürlich auch Membranproteine enthalten.

Aufgrund seiner Verfügbarkeit wurde auch Kuhmilch als Kandidat für einen Antigenlieferanten untersucht. Von großen Mengen 20-fach aufkonzentrierter Frischmolke

konnte durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung ein Großteil der typischen Milchproteine abgetrennt werden, ohne dass das Antigen-Signal verloren ging. Bei darauffolgenden Immunpräzipitationsexperimenten stellte sich jedoch heraus, dass nur ein geringer Teil der in „Western blot“ Analysen nachweisbaren Antigene unter den angelegten Bedingungen an die Affinitätsmatrix banden. Möglicherweise lagen sie in der aufkonzentrierten Molke in Komplexen vor, wodurch viele der Epitope nicht für eine Bindung frei waren. Von dem Gebrauch von Kuhmilch als Antigenquelle wurde daher abgesehen. Mehrere Gründe hingegen sprachen für die Verwendung der bovinen Nierenzelllinie MDBK. MDBK Zellen sind leicht zu kultivieren und vermehren sich schnell. Zudem erfolgte der erste Nachweis der Antigene in diesen Zellen (Schelp et al., 1995). Als Ausgangsmaterial für eine Proteinisolierung sind Kulturzellen besonders günstig, da durch einfache Lyse mit einem Detergens die Membranproteine in Lösung gebracht werden können. Andererseits sind die Materialmengen, die durch Laborkulturen bereitgestellt werden können, begrenzt. Anders gelagert waren die Vor- und Nachteile bei der Verwendung von Organmaterial als Antigenquelle. In den fünf untersuchten Rinderorganen konnten die Oberflächenproteine nachgewiesen werden. Kalbsthymus wurde den Organen Herz, Leber, Niere und Milz als Antigenquelle vorgezogen, da durch die bindegewebsarme Feinstruktur und den hohen Zellgehalt (Thymozyten, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Mastzellen) eine leichte Verarbeitung möglich war. Organmaterial konnte in unbegrenzter Menge beschafft werden, durch das Vorhandensein von Fett und Bindegewebe mussten jedoch eine Reihe von Reinigungsschritten vorgeschaltet werden. Neben üblichen Schritten des Zellaufschlusses wie Homogenisierung und Zentrifugation war die Solubilisierung der Membranproteine mit dem Detergens Triton X-114 von großem Nutzen, da sie anschließend durch die temperaturabhängige Trennung der Phasen weiter gereinigt und aufkonzentriert werden konnten. Die durch die Zugabe von Aceton aus der Triton X-114 Phase ausgefallenen Proteine konnten in einer hohen Harnstoffkonzentration resolubilisiert werden, wobei die Struktur des Epitops keinen nachweisbaren Schaden nahm.

Sowohl das Lysat von MDBK Zellen als auch aufbereitetes Thymusgewebe wurden als Ausgangsmaterialien zur Immunaффinitätschromatographie verwendet. Im Verlauf der Experimente stellte sich heraus, dass aus Kulturzellen nicht genügend Antigen bereitgestellt werden konnte, so dass die Proteinreinigung ausschließlich aus Organgewebe stattfand. Die Ausarbeitung der Methode gestaltete sich als schwierig und zeitaufwändig, insbesondere, weil sich im analytischen Maßstab erarbeitete Versuchsbedingungen nicht problemlos auf ein deutlich vergrößertes Versuchsvolumen („scale up“) übertragen ließen. Die nach

zweijährigen Anstrengungen vorliegende Proteinpräparation genügte sowohl in der Menge als auch in seiner Reinheit den methodischen Ansprüchen einer Aminosäuresequenzierung.

Durch proteinchemische Analyse des aus Kalbsthymus isolierten Zelloberflächenproteins konnte eine gesicherte interne Peptidsequenz CV(X)PAIEHGTIVSGFGPK (A18) ermittelt werden. Bei der Datenbanksuche unter Eingabe dieses Peptids konnten sowohl das porcine als auch das humane Homolog des CD46 aufgefunden werden. Das „C4 binding protein“ (C4bp) von Rind und Mensch, das wie CD46 der Familie der RCA Proteine angehört, zeigte ebenfalls Homologien zu der eingegebenen Peptidsequenz. Das bovine Homolog des C4bp kam aber als Antigen von mAk 17 nicht in Frage, da die Aminosäuresequenz mit dem Peptid A18 (ebenfalls bovinen Ursprungs) nicht identisch war. Zudem wird C4bp als disulfidverbrücktes Heptamer mit einer Größe von über 500 kD sezerniert. Es ist folglich nicht in der Plasmamembran verankert und um ein Vielfaches größer als die Antigene von mAk 17. Die Ähnlichkeiten zwischen C4bp-Sequenzen und A18 sind vermutlich auf ein für RCA Proteine charakteristisches Strukturmotiv innerhalb der SCR Domäne zurückzuführen.

Mit Hilfe der vorhandenen Daten konnte die Gensequenz des bovinen CD46 in einer cDNA Bank aufgefunden werden. Ausgehend von einer Peptidsequenz kann ein unbekanntes Protein mit Hilfe der Durchsicherung („screening“) einer entsprechenden Genbank identifiziert werden. Das gebräuchlichste Verfahren ist dabei die Ableitung von Oligonukleotiden, die je nach Aminosäurezusammensetzung der verwendeten Peptidsequenz mehr oder weniger hohe Degeneration aufweisen. In diesem besonderen Fall konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem gesuchten Protein um das bovine CD46 handelt. Da Sequenzinformationen von diversen homologen Proteinen vorlagen, wurde hier eine andere Strategie gewählt. Ein direkter Klonierungsansatz durch RT-PCR erschien allerdings aufgrund der geringen Konservierung der CD46 Sequenzen von Mensch, Maus und Schwein nicht durchführbar. Für das Design von Sonden, die in einem „screening“ eingesetzt werden sollten, konnte jedoch die Nukleotidsequenz des porcinen CD46 (Toyomura et al., 1997) verwendet werden. Die vergleichsweise junge evolutionäre Divergenz von Schwein und Rind sollte sich in Homologien von Peptid- und Nukleinsäuresequenzen manifestieren. Schweine (Nichtwiederkäuer) und Rinder (Wiederkäuer) gehören der Ordnung Paarhufer (*Artiodactyla*) an und stammen von einem im Eozän lebenden gemeinsamen Ursprung ab. Dabei repräsentieren die Schweineartigen vermutlich die ältere, wenig spezialisierte Form der Paarhufer, von denen sich die überaus erfolgreichen Wiederkäuer erst vor weniger als 20 MA

trennten. Ein Hinweis auf ähnliche Aminosäuresequenzen war bereits durch die Tatsache gegeben, dass die 18 AS enthaltende Peptidsequenz des gereinigten bovinen Proteins höhere Übereinstimmungen mit dem CD46 des Schweines aufwies (55% Identität) als mit dem menschlichen Homolog (50% Identität). Die mRNA für das bovine CD46 konnte mit einer aus der Nukleotidsequenz des Schweines abgeleiteten Sonde in einer „Northern blot“ Analyse nachgewiesen werden. Bei einer Temperatur von 65°C hybridisierte nur die homologe, porcine mRNA (3,6 kB), eine heterologe, bovine mRNA mit der Größe von 3,8 kB konnte erst bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C detektiert werden (Abbildung 18). Auffallend war hierbei die Größe der mRNAs. Das reife porcine Protein besteht aus 363 Aminosäuren (Toyomura et al., 1997), was einem kodierenden Bereich auf der mRNA von etwa 1,2 kB entspricht. Die porcine mRNA hatte jedoch eine Größe von 3,6 kB. Geringe Differenzen in der Länge der mRNA wären durch das Vorkommen größerer Spleissvarianten zu erklären, hier wurde jedoch eine mRNA nachgewiesen, die drei mal so groß war. Gleiche Verhältnisse fanden sich bei der 3,8 kB langen bovinen CD46 mRNA, da die Größe des Proteins mit 360 bzw. 368 Aminosäuren (je nach Länge der zytoplasmatischen Domäne) der Größe des porcinen Homologs entsprach. Folglich befinden sich neben der Signalsequenz für die Membranlokalisation sowohl auf der porcinen als auch auf der bovinen CD46 mRNA weitere umfangreiche nicht-kodierende Sequenzen.

Ein cDNA Klon, in dem das gesamte Gen des bovinen CD46 enthalten war, wies eine Länge von 3,8 kB auf, was der Länge der mRNA in der „Northern blot“ Analyse entsprach. Aus der Translation dieser cDNA ergab sich die Aminosäuresequenz einer Isoform des bovinen CD46. Vergleiche dieser Aminosäuresequenz zeigten eindeutig, dass es sich um bovines CD46 handelte. Alle 16 konservierten Cysteine sowie die vier konservierten Tryptophane der SCR Domänen konnten an entsprechender Position aufgefunden werden. Innerhalb der SCR Domänen waren 60% der Aminosäuren mit denen des porcinen CD46 identisch, die Homologie zu anderen Spezies war geringer (Mensch 50%, Maus 41% identische Aminosäuren). Unklar bleibt die Zuordnung der bovinen Sequenz zwischen SCR Domänen und Transmembranregion, die im Vergleich zu humanen Isoformen kurz ist und wenige der für die STP-Region charakteristischen Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin aufweist. Da das Erscheinungsbild des bovinen CD46 in der SDS-PAGE dem charakteristischen Muster der humanen CD46 Isoformen entsprach und das exprimierte Protein die kleinere (60 kD) Bande repräsentierte, handelt es sich vermutlich um die STP(C)-Variante. Die Existenz der größeren (93 kD) Bande war vermutlich ebenfalls auf unterschiedliche Spleissvarianten zurückzuführen. Mittlerweile gelang die Klonierung einer

cDNA des bovinen CD46, die im STP Bereich 30 Aminosäuren länger ist und nach heterologer Expression ein Molekulargewicht von etwa 90 kD aufweist (T. Krey, unveröffentlicht). Am C-Terminus konnten in unabhängigen cDNA Klonen zwei unterschiedliche Sequenzen identifiziert werden, deren Längen mit Cyt1 und Cyt2 des humanen CD46 übereinstimmten und entsprechende Homologien aufwiesen.

Neben den charakteristischen Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz bestätigten auch die biochemischen Daten des identifizierten Proteins seine Identität. Die Heterogenität der Proteinbanden in der SDS-PAGE, die ein auffallendes Charakteristikum des CD46 darstellt, wurde bereits erwähnt. Auch das unscharfe Erscheinungsbild der beiden Banden, das auf das Vorkommen von variabler O-Glykosylierung in der STP-Region zurückzuführen ist (Ballard et al., 1988), sowie der durch Entfernung der N-Glykane hervorgerufene Molekulargewichts-, „shift“ fanden sich bei dem bovinen CD46 wieder.

CD46 wurde bereits in mehreren Fällen als Rezeptor für Krankheitserreger beschrieben. 1993 wurde CD46 von Naniche et al. mit Hilfe von infektiionshemmenden mAk als Rezeptor für das Masernvirus identifiziert. Nicht-infizierbare Nagetierzellen erlangten durch konstitutive Expression von humanem CD46 die Fähigkeit, Virionen zu binden und Masernvirusproteine zu produzieren (Dörig et al., 1993). Zudem war zu beobachten, dass CD46 nach der Infektion mit Masernviren spezifisch herunterreguliert wird (Naniche et al., 1993; Krantic et al., 1995). Virusbindungsstellen konnten in den beiden C-terminalen SCR-Domänen identifiziert werden (Übersicht in Manchester et al., 2000), wobei das N-Glykan der SCR2 für die Interaktion notwendig ist (Maisner et al., 1996). Die Kristallstruktur der SCR1 und SCR2 Domänen des humanen CD46 wurde im Hinblick auf die Virus-Bindungseigenschaft dieser Region gelöst (Casasnovas et al., 1999).

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

Mikrobielle Krankheitserreger benutzen CD46 ebenfalls als Eintrittspforte in ihre Wirtszellen, wobei sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien beschrieben wurden. Das M Protein des Scharlach-Erregers *Streptococcus pyogenes* scheint im Verlauf der Zellerkennung an CD46 von Keratinozyten zu binden (Okada et al., 1995). Pathogene Neisserien, zu denen der Erreger der Gonorrhöe (*Neisseria gonorrhoeae*) und der Meningitis

(*Neisseria meningitidis*) zählen, dringen in die Wirtszellen ein, nachdem sie mit ihren Pili Kontakt zu CD46 aufgenommen haben (Kallstrom et al., 1997).

CD46 scheint ein Zelloberflächenprotein zu sein, das von pathogenen Mikroorganismen oft als Rezeptor rekrutiert wird. Im Fall des Masernvirus konnte die Interaktion des viralen Haemagglutinin mit den SCR Domänen 1 und 2 detailliert beschrieben werden (Übersicht in Manchester et al., 2000). Auch die natürlichen Liganden des CD46, C3b und C4b, binden an Strukturen innerhalb der vier SCR Domänen (Liszewski et al., 2000). Da 80 - 90% der extrazellulären Domäne durch SCR Domänen gebildet wird (siehe Abbildung 16), ist auch die Bindungsstruktur für andere Viren und Bakterien vermutlich innerhalb dieser Region zu suchen. Die SCR Domäne ist ein gemeinsames Strukturmotiv der Regulatoren der Komplement Aktivierung (RCA), der neben den Membranproteinen CD46 (vier SCR), den Komplementrezeptoren CR1 und CR2 (30 bzw. 16 SCR) sowie „decay accelerating factor“ (DAF/CD55, vier SCR) die sezernierten Proteine Faktor H (20 SCR) und das bereits erwähnte C4bp (7 Untereinheiten mit je 8 SCR) angehören (Hourcade et al., 1989). Neben CD46 konnten nahezu alle Membranproteine dieser Proteinfamilie als Rezeptoren für Viren identifiziert werden. Bereits 1984 wurde CR2 als Rezeptor für das Epstein-Barr Virus beschrieben (Fingeroth et al.). Die Bindungsdomäne dieses Virus befindet sich in den ersten beiden SCR Domänen 1 und 2 am Aminoterminus des CR2 (Molina et al., 1995). DAF (CD55) dient als Rezeptor für verschiedene ECHO Viren (Bergelson et al., 1994) und Coxsackieviren (Bergelson et al., 1995). Für die Bindung von Echo Virus 7 an die Wirtszelle sind die SCR 2, 3 und 4 notwendig (Clarkson et al., 1995). Für die Invasion in Wirtszellen scheinen die SCR Domänen von RCA Proteinen folglich geeignete Angriffspunkte für Krankheitserreger zu sein.

Angesichts der Literatur bezüglich anderer Virussysteme erscheint die Identifizierung des bovinen CD46 als zelluläres Rezeptorprotein für BVDV plausibel. Auch die weite Verbreitung des humanen CD46, dessen Expression in allen untersuchten Zellen und Geweben mit Ausnahme von Erythrozyten nachgewiesen werden konnte (Übersicht in Liszewski & Atkinson, 1992), ist in diesem Zusammenhang von Belang, da die Infektion mit BVDV nicht auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist. Da es im Verlauf der Krankheit vielmehr zu einer systemischen Virusvermehrung in verschiedenen Organsystemen kommt, sollten entsprechende Virusrezeptorproteine weit verbreitet sein. Mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimenten mit Lysaten von primären Zellen aus verschiedenen

Organen eines Kälberembryos (Lunge, Gehirn, Knochenmark, Darm, Niere und Milz) konnten Hinweise auf ein ubiquitäres Vorkommen des bovinen CD46 gewonnen werden. Mit Hilfe der „Western blot“ Analyse wurden zudem alle zur Verfügung stehenden Organe ausgewachsener Rinder (Thymus, Herz, Leber, Niere und Milz) positiv getestet.

Der Nachweis der Funktion eines heterolog exprimierten Zelloberflächenproteins als Virusrezeptor kann im Idealfall durch Virusbindungsexperimente erbracht werden. Anstrengungen zur Bereitstellung hochgereinigter Viruspartikel, die für den direkten Nachweis der Bindung notwendig sind, waren jedoch bislang erfolglos (Moennig & Plagemann, 1992). Die Bindung von BVD Virionen an die Oberfläche von Kulturzellen konnte daher nicht auf diese direkte Weise gezeigt werden. Eine weitere Möglichkeit, einen Virusrezeptor nachzuweisen, ist die Durchführung von Infektionsexperimenten. Wenn die Expression eines Zelloberflächenproteins zu einer Permissivität nicht-infizierbarer Zellen führt, ist dies ein guter Hinweis auf dessen Eigenschaft als Virusrezeptor.

Zur heterologen Expression wurde die kodierende Sequenz des bovinen CD46 verwendet, die in dem Plasmid pbovKM5 enthalten war. Die wichtigen funktionellen Bereiche des Proteins, sowohl für seine natürliche Funktion (Liszewski et al., 2000) als auch für die Bindung des Masernvirus (Casasnovas et al., 1999; Manchester et al., 2000) liegen im Bereich der nicht variablen SCR Domänen. Zudem konnten bei der Untersuchung bezüglich der Funktion als Masernvirus Rezeptor keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen festgestellt werden, wobei sowohl die STP Region als auch die zytoplasmatische Domäne variiert wurde (Gerlier et al., 1994, Manchester et al., 1994). Aus diesen Gründen wurde im Folgenden darauf verzichtet, unterschiedliche Isoformen des bovinen CD46 in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Für die Aussagekraft von funktionellen Untersuchungen an heterolog exprimierten Proteinen ist die Frage nach zellulärer Lokalisation, korrekter Faltung und Modifikation relevant. Die für einen Virusrezeptor wesentliche Lokalisation des CD46 in der Zytoplasmamembran konnte dadurch bestätigt werden, dass das heterolog exprimierte Protein durch Oberflächenbiotinylierung der Transfektanten markiert werden konnte. Sowohl die Immunpräzipitation mit mAk 17 als auch die „Western blot“ Analyse mit mAk 26 gelangen, was auf die korrekte Struktur beider Epitope hinweist. Das nachgewiesene Protein stellte sich in der Höhe von 60 kD als klar definierte Doppelbande dar, obwohl bei der Verwendung von einer klonierten cDNA mit nur einer Proteinspezies gerechnet werden sollte. Durch Einwirkung der N-Glykosidase PNGase F konnte der aus dem natürlichen Protein bekannte Molekulargewichtsshift hervorgerufen werden, es waren aber nach wie vor

zwei Banden sichtbar (Abbildung 22). Dies ist vermutlich auf ein unterschiedliches O-Glykosylierungsmuster zurückzuführen, das auch das breite Erscheinungsbild des natürlich vorkommenden Proteins verursacht (Ballard et al., 1988). Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass in den durchgeführten Untersuchungen keine Unterschiede zwischen dem authentischen Protein aus MDBK Zellen und dem heterolog exprimierten CD46 zu erkennen waren.

Drei verschiedene, mit BVDV nicht-infizierbare Zelllinien verschiedener Spezies (Hamster: BHK-21, Maus: L-Zellen, Mensch: HeLa) wurden für die heterologe Expression mit bovinem CD46 verwendet. Da die Replikation von BVD Viren durch Transfektion viraler RNA in BHK-21 Zellen ausgelöst werden konnte und zu der Produktion infektiöser Virusnachkommen führte (Behrens et al., 1998), kann postuliert werden, dass die Empfänglichkeit vermutlich im Aufnahmemechanismus der Virionen zu suchen ist. Wäre das bovine CD46 der alleinige zelluläre Rezeptor, so sollte durch seine Expression eine Infektion der transfizierten Zellen ermöglicht werden. Allerdings muss hier, anders als bei dem Nachweis der Virusbindung, zusätzlich vorausgesetzt werden, dass kein weiterer Infektionsblock bei direkt nachgeschalteten Schritten (Penetration der Zellmembran, Freisetzung des viralen Genoms) besteht. Auf der Grundlage von BHK-21, HeLa und L-Zellen konnten eine Reihe stabiler Zellklone generiert werden, die das bovine CD46 auf der Zelloberfläche trugen. Infektionsexperimente dieser Zellen mit BVDV führten jedoch nicht zum Erfolg. Es fand weder die Produktion infektiöser Virusnachkommen statt, noch konnten in den CD46-exprimierenden Zellen virale Proteine durch Immunfärbung detektiert werden. Offensichtlich genügt CD46 nicht als alleinige Determinante für die Empfänglichkeit für BVD Viren, was aufgrund der auf MDBK Zellen vorkommenden nicht hemmbaren Residualinfektion sowie der Daten anderer Arbeitsgruppen (Xue et al., 1995; Flores et al., 1996) bereits vermutet werden konnte.

Es ist allerdings vorstellbar, dass CD46 im Kontext mit anderen, nicht identifizierten Zellfaktoren die Infektion ermöglicht. Um dies untersuchen zu können, wurde CD46 in PK15 Zellen transfiziert. Wie bereits erwähnt sind diese Schweine-Nierenzellen, obwohl sie nicht zu den natürlichen Wirtszellen zählen, mit BVDV infizierbar, wenn auch mit deutlich geringerer Infektionseffizienz. Es wurde bereits postuliert, dass dies eventuell mit der Fähigkeit der Viren zur Verwendung verschiedener zellulärer Rezeptormoleküle zusammenhängen könnte (Liess & Moenning, 1990; Moenning, 1990; Roehle & Edwards, 1994). Da die Infektionseffizienz des BVD Virus NADL auf Zellen der Schweine-Nierenzelllinie PK15 in unseren Experimenten um den Faktor 100 niedriger als auf den

parallel infizierten bovinen MDBK Zellen war, befand sich ihr Ausmaß auf einer Ebene mit der CD46 unabhängigen Infektion von MDBK Zellen. Möglicherweise kann der postulierte CD46 unabhängige Infektionsweg von BVD Viren sowohl auf bovinen als auch auf porzinen Zellen genutzt werden. Denkbar ist auch die Notwendigkeit mehrerer Korezeptoren für eine effektive Infektion. In diesem Fall fungiert nur das bovine, nicht aber das porcine Homolog des CD46 als einer der Faktoren für eine effektive Infektion. Der andere, noch unbekannte Faktor, würde die Infektion von porcinen Zellen ermöglichen, aber alleine nicht zu hohen Effizienzen führen. Bei den vorhergegangenen Versuchen, bei denen die Vermittlung der BVDV Infektion in nicht-permissiven Zellen durch Expression mit bovinem CD46 erfolglos geblieben waren, könnte eben dieser Faktor gefehlt haben. Durch Expression von bovinem CD46 in porcinen Zellen sollte eine Kombination der beiden notwendigen Faktoren erfolgen und eine effektive Infektion ermöglicht werden.

Eine Schwierigkeit bei diesen Experimenten war jedoch die fehlende Stabilität der transfizierten PK15 Zellen. Die Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Zellklone unterschieden sich stark voneinander, zusätzlich waren die Zellen durchweg empfindlich. Demnach konnten nur zwei CD46-exprimierende Zellklone isoliert werden, die für eine Verwendung in Infektionsexperimenten geeignet waren. Mit Hilfe dieser Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Expression des bovinen CD46 die Infektionseffizienz von BVDV NADL tatsächlich um das 10 - 20-fache gesteigert wird. Sie erreichte nicht die Effizienz der Infektion auf MDBK Zellen, was möglicherweise aber auf Gründe wie der Empfindlichkeit der Zellen oder der artifiziellen Expression des Oberflächenproteins zurückzuführen ist. Die Steigerung der Effizienz der transfizierten PK15 Zellen konnte durch Vorinkubation mit anti-CD46 Antikörpern vollständig rückgängig gemacht werden. Die Hemmungseffizienzen entsprachen denen, die bei gleichartigen Experimenten mit MDBK Zellen erzielt werden konnten. Da mit den CD46_{bov}-exprimierenden Zellklonen nur wenige Experimente durchgeführt werden konnten, kann das Ergebnis nur als Tendenz angesehen werden.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente kann geschlossen werden, dass das bovine CD46 eine wichtige Rolle bei der BVDV Infektion spielt, nicht aber dass es als alleiniger Virusrezeptor fungiert. Weitere infektionsrelevante Faktoren sind bereits beschrieben worden (Xue & Minocha, 1993; Agnello et al., 1999; Iqbal et al., 2000). Auch die auf einen von BVDV und CSFV gemeinsam genutzten Rezeptor

hindeutenden Experimente von Flores et al. (1996) unterstützen die Vermutung, dass es sich beim Eintritt des BVD Virus in die Wirtszelle um einen „multistep process“ handelt.

Von Iqbal et al. (2000) konnte eine infektionsrelevante Interaktion zwischen dem viralen Glykoprotein E^{ms} und zellulärem Heparansulfat gezeigt werden. Für einige Viren, die an geladene Zelloberflächenmoleküle binden, sind für die Infektion zusätzlich spezifische Membranproteine als Rezeptoren notwendig. Beispiele hierfür sind das Herpesvirus Herpes Simplex Virus (HSV), das humane Cytomegalovirus (HCMV) sowie das Alphavirus Sindbis Virus. Beide HSV Serotypen benutzen Proteoglykane als primäre Rezeptoren auf ihren Wirtszellen (WuDunn & Spear, 1989), wobei die Interaktion durch das virale Glykoprotein B (gB2) vermittelt wird (Williams & Straus, 1997). Die Bindung an die Wirtszellen ist für eine erfolgreiche Infektion jedoch nicht ausreichend. Der Eintritt der Viren in die Wirtszellen wird durch ein Protein der TNF/NGF Rezeptorfamilie, auch „herpes virus entry mediator“ (HVEM) genannt, vermittelt (Montgomery et al., 1996). Die initiale Interaktion von HCMV mit Wirtszellen findet ebenfalls durch Bindung an Heparansulfat statt (Compton et al., 1992). Auch hier wird für die Infektion mindestens ein weiterer zellulärer Faktor benötigt, zwei nicht näher charakterisierte Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 34 kD und 92,5 kD sind hier in der Diskussion (Übersicht in Cooper et al., 1991). Die Infektion von Wirtszellen mit Sindbis Virus hängt einerseits von Heparansulfat (Byrnes & Griffin, 1998) und andererseits von dem „high affinity“ Lamininrezeptor (Wang et al., 1992) ab. In Hühnerzellen konnte allerdings ein von dem hoch konservierten Lamininrezeptor unabhängiger Infektionsweg nachgewiesen werden, an dem ein nicht näher charakterisiertes 63 kD Protein beteiligt ist (Wang et al., 1991). Eine Invasionsstrategie, die die initiale Bindung an ubiquitär vorkommende Zelloberflächenstrukturen mit spezifischen Virusrezeptorproteinen verbindet, ist demnach weit verbreitet. Möglicherweise erleichtert Heparansulfat die Bindung der Viren an mögliche Wirtszellen, bevor es zu einer höher affinen Bindung an spezifische Virusrezeptoren kommt („adhesion strengthening“), die zur tatsächlichen Infektion führt (Haywood, 1994). Bei BVDV könnte ebenfalls zunächst eine Bindung an Glykosaminoglykanen (GAG) stattfinden, gefolgt von einer Interaktion mit dem bovinen CD46. Allerdings ist bei einigen Virussystemen nachgewiesen worden, dass die Passage in Zellkulturen zu einer Selektion von GAG-abhängigen Virionen führt, die *in vivo* keine Infektiosität mehr aufweisen (Sa-Carvalho et al., 1997; Klimstra et al., 1998). Auch beim Virus der klassischen Schweinepest (CSFV), das dem BVD Virus serologisch nahe verwandt ist, konnte eine infektionsrelevante Interaktion zwischen dem viralen Glykoprotein E^{ms} und Heparansulfat festgestellt werden. Hierbei handelt es sich jedoch um einen in

Zellkultur selektierten Effekt, der durch den Austausch einer einzigen Aminosäure in E^{rns} hervorgerufen wird (Hulst et al., 2001a). Die Bindung von CSFV an Heparansulfat scheint *in vivo* keine vorrangige Bedeutung zu haben (Hulst et al., 2001b). Da entsprechende Untersuchungen für BVDV noch ausstehen, ist die tatsächliche Bedeutung zellulärer Glykosaminoglykane bei der BVDV Infektion boviner Zellen derzeit noch unklar.

Neben Glykosaminoglykanen wurden neben dem in dieser Arbeit identifizierten CD46 weitere Proteine beschrieben, die an der Infektion boviner Zellen mit BVDV beteiligt sein können. Auch die CD46 unabhängige Infektion sowohl boviner als auch porziner Zellen deutet auf die Existenz eines Korezeptors hin. In der Literatur gibt es mehrere Beispiele von Virussystemen, die bei der Infektion mehr als ein zelluläres Oberflächenprotein benutzen. Die Adenovirusinfektion beispielsweise hängt von zwei separaten aber kooperativen Ereignissen ab, der Bindung an das 46 kD Protein „coxsackie virus - adenovirus receptor“ (CAR) und der Interaktion mit Integrinen, die zur Internalisierung führen (Übersicht in Bergelson, 1999). Auch bei der Infektion von Wirtszellen mit HIV werden mindestens zwei zelluläre Oberflächenproteine benutzt. Hier bindet das virale Glykoprotein gp120 zunächst an den primären Rezeptor CD4, der bereits 1984 beschrieben worden ist (Dalglish et al.). Aus dieser Interaktion resultieren Konformationsänderungen, die die Bindung von gp120 an einen Chemokinrezeptor (in der Regel CCR5 oder CXCR4) ermöglicht (Kozak et al., 1997). Die Korezeptorbindung scheint seinerseits weitere Strukturänderungen in gp120 und dem Fusionspeptid gp41 zu bewirken, die letztlich zu einer Fusion mit der Wirtszellmembran führt. Verschiedene, von diesem Schema abweichende Infektionsstrategien von HIV-1 Stämmen, z.B. die Infektion von CD4 negativen Zellen (Tateno et al., 1989; Moses et al., 1993), sind beschrieben worden. Von R. Weiss wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei den Chemokinrezeptoren um die ursprünglichen Virusrezeptoren handelt, und die Benutzung von CD4 eine neuere Adaption in der HIV Evolution darstellt (Übersicht in Dimitrov & Broder, 1997). Auch die Beteiligung nicht-proteinartiger Zelloberflächenmoleküle wie Galaktosylceramid und Heparansulfat konnte nachgewiesen werden (Harouse et al., 1991; Roderiquez et al., 1995).

In Anbetracht der Komplexität der initialen Ereignisse anderer Virussysteme erscheint es möglich, dass auch bei der Invasion von BVDV mehrere Zelloberflächenproteine beteiligt sind. Mögliche Kandidaten neben dem hier beschriebenen CD46 sind sowohl das im Labor von H.C. Minocha identifizierte 50 kD Protein als auch „low density lipoprotein receptor“ (LDLR) (Agnello et al., 1999). Antikörper gegen das 50 kD Protein hemmen die BVDV Infektion boviner Zellen mit einer Effizienz von 30 – 50% (Xue & Minocha, 1993). Bei dem

50 kD Oberflächenprotein, das auch auf Zellen, die nicht mit BVDV infizierbar sind, vorkommt (Xue & Minocha, 1996), könnte es sich durchaus um einen Korezeptor handeln. Leider ist unbekannt, ob die Hemmung der BVDV Infektion auch auf porzinen Zellen auftritt. Der Effekt der Antikörper auf die CSFV Infektion wäre in diesem Zusammenhang interessant, da für BVDV und CSFV ein gemeinsamer infektionsrelevanter Faktor postuliert worden ist (Flores et al., 1996).

Die Beteiligung des zellulären Oberflächenproteins LDLR an der BVDV Infektion wurde im Zusammenhang mit der Suche nach einem Rezeptor für das Hepatitis C Virus (HCV), einem nahe Verwandten der Pestiviren, beschrieben (Agnello et al., 1999). Mittlerweile sind für HCV, bei dem sich die Untersuchung infektionsrelevanter Faktoren mangels eines funktionierenden Zellkultursystems sehr schwierig gestaltet, neben LDLR auch CD81 und Glykosaminoglykane als Kandidaten für spezifische Virusrezeptoren beschrieben worden (Übersicht in Flint et al., 2001). In der Arbeit von Agnello et al. (1999) konnte der zytopathische Effekt von BVDV NADL auf MDBK Zellen durch anti-LDLR Antikörper verhindert werden. Zudem wurde festgestellt, dass die von Flores & Donis (1995) isolierten, gegen BVDV resistenten, CRIB Zellen einen Mangel an LDLR aufwiesen und auch nicht in der Lage waren, LDL zu endozytieren. Anti-LDLR Antikörper verhinderten auch die unspezifische Endozytose von BVD Virionen in nicht-infizierbaren Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin die Wirkung von anti-LDLR Antikörpern auf die BVDV Infektion mit Hilfe von Infektionshemmungsexperimenten analysiert. Bei den hierbei angewandten Versuchsbedingungen konnten jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung von LDLR gewonnen werden. Wie sich im Nachhinein herausstellte, wurde hier allerdings mit einem anderen mAk gegen LDLR gearbeitet als in den Untersuchungen von Agnello et al. (1999).

Das humane CD46 wird vom Edmonston Stamm des Masernvirus sowie weiteren daraus hervorgegangenen Impfstämmen als zellulärer Rezeptor benutzt (Naniche et al., 1993a; Dörig et al., 1993) und im Verlauf der Infektion herunterreguliert (Naniche et al., 1993b). Allerdings konnten die meisten klinischen Masernvirus Isolate nicht durch anti-CD46 Antikörper oder eine lösliche Form von CD46 gehemmt werden, was dessen Eigenschaft als Masernvirusrezeptor fraglich erscheinen ließ (Übersicht in Buckland & Wild, 1997). Auch konnte von Hsu et al. (1998) gezeigt werden, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure im Masernvirus-Hämagglutinin den Phänotyp der Masernvirusstämme bezüglich der CD46 Bindung determiniert. Kürzlich ist ein weiteres zelluläres Oberflächenmolekül, das

humane „signalling lymphocyte-activation molecule“ (SLAM, CDw150) als Masernvirusrezeptor beschrieben worden, das die Infektion aller untersuchten Virusstämme einschließlich des Edmonston Stammes vermittelt (Tatsuo et al., 2000). Die Fähigkeit klinischer Masernvirus Isolate, bestimmte Zelltypen zu infizieren, ist mit der Verbreitung von SLAM konsistent, zudem wird durch seine natürliche Funktion (Stimulation der T- und B-Zell Aktivierung) ein besseres Verständnis der Masernpathogenese insbesondere der Immunsuppression ermöglicht. Die Benutzung des CD46 als Rezeptor konnte indessen durch die Propagation verschiedener Masernvirusstämme auf Kulturzellen ausgelöst werden, was auf die Mutation der bereits von Hsu et al. (1998) beschriebenen Aminosäure im Masernvirus-Hämagglutinin zurückging (Nielsen et al., 2001). Obwohl auch Wildtyp-Virusstämme beschrieben worden sind, die ihre Wirte *via* CD46 befallen (Manchester et al., 2000), scheint demnach die Bedeutung des CD46 bei der Infektion *in vivo* untergeordnet zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung des bovinen CD46 an der Infektion von Kulturzellen mit verschiedenen BVDV Stämmen nachgewiesen werden. Da hierbei Virusisolate nach längerer Propagation auf kultivierten Zellen verwendet wurden, stellt sich die Frage, ob es sich ähnlich wie bei dem Masernvirus um einen *in vitro* adaptierten Infektionsweg handeln könnte. Um dies ausschließen zu können, sind Experimente mit BVDV Isolaten notwendig, die direkt aus dem erkrankten Tier stammen.

Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass auf bovinen Zellen mindestens zwei Oberflächenmoleküle existieren, die gleichzeitig für eine effektive Infektion mit BVDV notwendig sind. Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass das bovine CD46 ein wichtiger Faktor ist, der aber für die Empfänglichkeit nicht essentiell ist. Einerseits wird dies durch die CD46-unabhängige Infektion sowohl boviner als auch porziner Zellen deutlich. Andererseits konnte ein weiterer Hinweis auf einen Kofaktor dadurch gewonnen werden, dass der Infektionsblock nicht-infizierbarer Zellen durch die Expression des bovinen CD46 nicht aufgehoben werden konnte. Allerdings konnte durch die Expression des bovinen CD46 in porzinen Zellen eine deutliche Steigerung der Infektionseffizienz ausgelöst werden.

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten wurde die Funktion des bovinen CD46 als BVDV Rezeptor durch Bindungsexperimente bestätigt. Durch [³H]-Uridin metabolisch markierte BVDV NADL Virionen wurden durch Gradientenzentrifugation gereinigt und bei 4°C an native und CD46_{bov}-exprimierende Zellen (HeLa, L-Zellen, BHK-21 und PK15)

adsorbiert. Nach Waschen wurde die an den Zellen verbliebene Radioaktivität gemessen. Es zeigte sich, dass das Anhaften einer 5 – 10-fach größeren Menge an BVD Virionen mit der Expression des CD46_{bov} korrelierte. Präinkubation der Zellen mit anti- CD46_{bov} Antikörpern verhinderte diesen Effekt vollständig (Maurer et al., in Vorbereitung). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass CD46 für BVDV als „docking protein“ fungiert. Am ehesten ist zu vermuten, dass ein Korezeptor existiert, der für eine erfolgreiche Infektion notwendig ist. Für die unmittelbar nachfolgenden Untersuchungen ist die Identifizierung des bisher unbekanntes Kofaktors von vorrangigem Interesse.

5 Zusammenfassung

Zusammen mit dem Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und dem „border disease“ Virus (BDV) bildet das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) das Genus Pestivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae*. Es handelt sich hierbei um behüllte RNA Viren mit einem einzelsträngigen Genom positiver Polarität. Obwohl in der Literatur mehrere Ansätze zu der Identifizierung spezifischer zellulärer Rezeptoren existierten, war über die frühen Ereignisse bei der Infektion von Wirtszellen mit BVDV zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Neben Hinweisen auf Analogien der Invasionsmechanismen von CSFV und BVDV wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mehrere zelluläre Oberflächenproteine beschrieben, die mit Ereignissen der BVDV Infektion boviner Zellen verknüpft waren. Über diese Proteine gab es, abgesehen von ihrer Verbreitung in verschiedenen Zelltypen und ihren apparenten Molekulargewichten, jedoch keine Information.

Für die Isolierung mutmaßlicher Virusrezeptoren für BVDV wurde der monoklonale Antikörper mAk 17, der zwei Proteine (60kD und 93kD) auf bovinen Zellen erkannte, verwendet. Analog zu den in der Literatur beschriebenen Experimenten hemmte eine Vorinkubation der Wirtszellen mit mAk 17 die BVDV Infektion effektiv. Bei den hier verwendeten Versuchsbedingungen wurde allerdings eine nicht hemmbare Residualinfektion detektiert, die weder von der eingesetzten Virusmenge noch von der Antikörperkonzentration während der Vorinkubation abhängig war. Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der bovinen Zelloberflächenproteine mittels Immunaффinitätschromatographie diente Kalbsthymus. Am Ende der aufwändigen Reinigungsprozedur lag mehr als ein Milligramm des 60 kD Proteins in ausreichender Reinheit für weitere proteinchemische Analysen vor.

Mit Hilfe der durch interne Aminosäuresequenzierung ermittelten Peptidsequenz CV(X)PAIEHGTIVSGFGPK wurde eine allgemein zugängliche Proteinsequenzdatenbank durchsucht, wobei ein mögliches Homologes aufgefunden wurde. Alle biochemischen Eigenschaften des gut beschriebenen humanen „membrane cofactor protein“ (MCP, CD46) stimmten mit denen des gesuchten bovines Proteins überein. Zudem war seine Funktion als Rezeptor für andere Pathogene (Viren und Bakterien) beschrieben worden.

Von der bekannten Sequenz des porcinen CD46 konnte eine DNA Sonde abgeleitet werden, die mit einer bovinen mRNA spezifisch reagierte. Durch das „screening“ einer Genbank mit Hilfe dieser Sonde gelang die Klonierung des bovines CD46. Vergleiche der von der klonierten cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz mit CD46 Sequenzen anderer

Spezies zeigten entsprechende Übereinstimmungen. Ebenso konnten die durch Analyse des gereinigten Proteins gewonnenen Peptidsequenzen aufgefunden werden. Das heterolog exprimierte bovine CD46 konnte durch den Antikörper mAk 17 auf der Oberfläche von BHK-21 Zellen nachgewiesen werden, wobei keine strukturellen Abweichungen zu dem natürlich vorkommenden Protein auffielen.

Um die Funktion des bovinen CD46 bei der Infektion mit BVDV untersuchen zu können, wurde es in verschiedenen Zelllinien stabil exprimiert. Es handelte sich hierbei einerseits um nicht-infizierbare Zelllinien (HeLa, BHK-21, L-Zellen), andererseits um die porcine Zelllinie PK15, die prinzipiell mit BVDV infizierbar ist. Die Infektionseffizienz von BVDV auf diesen Zellen war im Vergleich mit bovinen Zellen jedoch um den Faktor 100 niedriger. Es stellte sich heraus, dass die Expression des bovinen CD46 nicht ausreichte, um die nicht-infizierbaren Zellen für das BVD Virus zugänglich zu machen. Bei den PK15 Zellen konnte jedoch durch Expression des bovinen CD46 die Infektionseffizienz deutlich gesteigert werden, ein Effekt, der durch die Vorinkubation mit anti-CD46 Antikörpern verhindert werden konnte. Besonders im Zusammenhang mit Ergebnissen anderer Veröffentlichungen weisen diese Daten darauf hin, dass der Eintritt des BVD Virus in seine Wirtszellen durch ein Zusammenspiel mehrerer zellulärer Faktoren vermittelt wird. Neben CD46 erscheinen daher zusätzliche zelluläre Faktoren für eine erfolgreiche Infektion essentiell. Weitere Aufklärung des Infektionsmechanismus von BVDV kann in Zukunft durch die Identifikation des (der) Kofaktor(en) erfolgen.

6 Summary

Together with the classical swine fever virus (CSFV) and the border disease virus (BDV) the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) constitutes the genus Pestivirus within the *Flaviviridae*. Pestiviruses are enveloped RNA viruses with a single-stranded genome of positive polarity. Although several approaches concerning the identification of specific cellular receptors have been described in the literature, little was known about the early events of the BVDV infection of host cells at the beginning of the present work. Besides some evidence for analogies between the mechanisms of BVDV and CSFV invasion, several cell surface molecules involved in the BVDV infection were described. However, the apparent molecular weight and the contribution in different cell types were the only information available for these bovine cell surface proteins.

In this thesis, the monoclonal antibody mAk 17, which recognizes two proteins (60 kD and 93 kD) on bovine cells, was used for the isolation of putative BVDV receptors. According to the findings described in the literature, the BVDV infection was efficiently inhibited after preincubation of host cells with mAk 17. Whereas in experiments described in the literature the inhibition was complete, a residual infection was detected in this work, which was independent of either virus load or antibody concentration during the preincubation period of the host cells. For the isolation of bovine cell surface proteins by immunoaffinity purification, calf thymus was used as a starting material. At the end of a large-scale purification procedure, more than a milligram of the 60 kD protein, pure enough to serve for further biochemical analyses, was isolated.

Internal amino acid sequencing led to the identification of the peptide sequence CVXPAIEHGTIVSGFGPK. Screening a generally accessible protein databank with this peptide as a query sequence identified a possibly homologous protein, namely the human membrane cofactor protein (MCP, CD46). All biochemical features of the well-described human CD46 corresponded to those of the sought-after bovine cell surface protein. Additionally, human CD46 has been described previously as a receptor for several pathogens (viruses as well as bacteria).

To identify the bovine CD46, a cDNA probe based on the known nucleotide sequence of porcine CD46 was generated. This probe interacted specifically with the bovine CD46 mRNA in a „Northern blot“ analysis and was used for the screening of a bovine cDNA bank. As a result, a bovine CD46 cDNA was cloned and the nucleotide sequence could be

determined. The comparison of the corresponding amino acid sequence with known CD46 sequences of other species showed reasonable similarities. It also contained the peptide CVXPAIEHGTIVSGFGPK that originated from the affinity-purified bovine protein. The bovine CD46 was expressed heterologous in BHK-21 cells and could subsequently be detected with mAk 17 on the surface of the transfected cells without conspicuous structural alteration.

To enable an investigation of the role of bovine CD46 during BVDV infection, it was stably expressed in various cell lines. On the one hand cell lines were used, which naturally were not permissive for BVDV infection (HeLa, BHK-21, L-cells), on the other hand porcine PK15 cells were used, which principally can be infected with BVDV. However, the efficiency of BVDV infection of these cells is 100-fold lower compared to bovine cells. It turned out that the expression of bovine CD46 was not sufficient to render non-permissive cells susceptible to BVDV infection. Concerning the porcine PK15 cells, the expression of bovine CD46 however led to a strongly enhanced BVDV infection efficiency. This effect could completely be inhibited by preincubation of the transfected cells with anti-CD46 antibodies. Especially in consideration of the findings described in publications of other authors, these data indicate, that the entry of BVDV depends on several cellular factors. Apart from CD46 other cellular molecules seem to be essential for successful infection. By the identification of one or more of those cofactors, further insight in mechanisms of BVDV invasion can be supplied.

7 Literaturverzeichnis

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. and Thang, Q.-X. (1999). Hepatitis C Virus and other flaviviruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *PNAS* **96**, 12766 - 12771
- Ahearn, J.M., Hayward, S.D., Hickey, J.C. and Fearon, D.T. (1988). Epstein-Barr virus (EBV) infection of murine L cells expressing recombinant human EBV/C3d receptor. *PNAS* **85**, 9307 - 9311
- Akula, S.M., Pramod, M.P., Wang, F.Z. and Chandran, B. (2001). Human herpesvirus 8 envelope-associated glykoprotein B interacts with heparansulfat-like moieties. *Virology* **284**, 235 - 249
- Albritton, L.M., Tseng, L., Scadden D. and Cunningham, J.M. (1989). A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* **57**, 659 - 666
- Alkathib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. and Berger, E.A. (1996). CCR5, a RANTES, MIP-1-alpha, MIP-1-beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955 - 195
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389 - 3402
- Baker, J.C. (1987). Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 1449 - 1458
- Ballard, L.L., Bora, N.S., Yu, G.H. and Atkinson, J.P. (1988). Biochemical characterization of membrane cofactor protein of the complement system. *J. Immunol.* **141**, 3923 - 3939
- Barlow, R.M., Rennie, J.C., Gardiner, A.C. and Vantsis, J.T. (1980). Infection of pregnant sheep with the NADL strain of bovine virus diarrhea virus and their subsequent challenge with border disease IIB pool. *J. Comp. Path.* **90**, 67 - 72
- Barlow, R.M., Gardiner, A.C. and Nettleton, P.F. (1983). The pathology of a spontaneous and experimental disease in sheep recovered from clinical Border Disease. *J. Comp. Path.* **93**, 451 - 461
- Bartz, R., Firsching, R., Rima, B., Ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J (1998). Differential receptor usage by measles virus strains. *J. Gen. Virol.* **79**, 1015 - 1025
- Bates, P., Young, J.A. and Varmus, H.E. (1993). A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* **74**, 1043 - 1051
- Bearzotti, M., Delmas, B., Lamoureux, A., Loustau, A.M., Chilmonczyk, S. and Bremont, M. (1999). Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J. Virol.* **73**, 7703 - 7709
- Becher, P., Shannon, A.D., Tautz, N. and Thiel, H.-J. (1994). Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus of sheep. *Virology* **198**, 542 - 551
- Becher, P., Meyers, G., Shannon, A.D. and Thiel, H.-J. (1996). Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.* **70**, 2992 - 2998
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., König, M. and Thiel, H.-J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* **78**, 1357 - 1366
- Becher, P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (1998a). Ribosomal S27a coding sequences upstream of Ubiquitin coding sequences in the genome of a pestivirus. *J. Virol.* **72**, 8697 - 8704
- Becher, P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (1998b). Complete genomic sequence of Border Disease Virus, a Pestivirus from sheep. *J. Virol.* **72**, 5165 - 5173

- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. and Thiel, H.-J. (1999). Genetic diversity of Pestiviruses: Identification of novel groups and implications for classification. *Virology* **262**, 64 - 71
- Behrens, S.E., Grassmann, C.W., Thiel, H.-J., Meyers, G. and Tautz, N. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* **72**, 2364 - 2372
- Bergelson, J.M., Shepley, M.P., Chan, B.M.C., Hemler, M.E. and Finberg, R.W. (1992). Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* **255**, 1718 - 1720
- Bergelson, J.M., Chan, M., Solomon, K.R., St. John, N.F., Lin, H. and Finberg, R.W. (1994). Decay-accelerating factor (CD55), a glycoposphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *PNAS* **91**, 6245 - 6249
- Bergelson, J.M., Mohanty, J.G., Crowell, R.L., StJohn, N.F., Lublin, D.M. and Finberg, R.W. (1995). Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.* **69**, 1903 - 1906
- Bergelson, J.M. (1999). Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 975 - 979
- Berger, E.A., Murphy, P.M. and Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Ann. Rev. Immunol.* **17**, 657 - 700
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T. and Baxt, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha v \beta 3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.* **69**, 2664 - 2666
- Bielefeld Ohmann, H. and Bloch, B. (1982). Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch. Virol.* **71**, 57 - 74
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513 - 1523
- Bolin, S.R. (1988). Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* **49**, 1040 - 1044
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604 - 1607
- Buckland, R. and Wild, T.F. (1997). Is CD46 the receptor for measles virus? *Virus Res.* **48**, 1 - 9
- Byrnes, A.P. and Griffin, D.E. (1998). Binding of Sindbis Virus to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 7349 - 7356
- Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P. and Oldstone, M.B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**, 2079 - 2081
- Carel, J.C., Frazier, B., Ley, T.J. and Holers, V.M. (1989). Analysis of epitope expression and the functional repertoire of recombinant complement receptor 2 (CR2/CD21) in mouse and human cells. *J. Immunol.* **143**, 923 - 930
- Carmichael, G.G. and McMaster, G.K. (1980). The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridin orange. *Methods Enzymol.* **65**, 380 - 391
- Carrascosa, A.L., Bustos, M.J., Galindo, I. and Vinuela, E. (1999). Virus-specific cell receptors are necessary, but not sufficient, to confer susceptibility to African Swine Fever Virus. *Arch. Virol.* **144**, 1309 - 1321
- Casaro, A.P.E., Kendrick, J.W. and Kennedy, P.C. (1971). Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* **32**, 1543 - 1562

- Casasnovas, J.M., Larvie, M. and Stehle, T. (1999). Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus binding surface. *EMBO J.* **18**, 2911 - 2922
- Castro, A.G., Hauser, T.M., Cocks, B.G., Abrams, J., Zurawski, S., Churakowa, T., Zonin, F., Robinson, D., Tangye, S.G., Aversa, G., Nichols, K.E., DeVries, J.E., Lanier, L.L. and O'Garra, A. (1999). Molecular and functional characterization of mouse signalling lymphocyte activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* **163**, 5860 - 5870
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, J.R. and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294 - 5299
- Chung, C.-S., Hsiao, Y.-C., Chang, Y.-S. and Chang, W. (1998). A27L protein mediates Vaccinia Virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 1577 - 1585
- Clarkson, N.A., Kaufman, R., Lublin, D.M., Ward, T., Pipkin, P.A., Minor, P.D., Evabs, D.J. and Almond, J.W. (1995). Characterization of the echovirus 7 receptor: domains of CD55 critical for virus binding. *J. Virol.* **69**, 5497 - 5501
- Cole, J., Housley, G.A., Dykman, T.R., MacDermott, R.P. and Atkinson, J.P. (1985). Identification of an additional class of C3b-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 859 - 863
- Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K. and Purcjhio, A.F. (1988a). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **165**, 191 - 199
- Collett, M.S., Larson, R., Beltzer, S.K. and Retzel, E. (1988b). Proteins encoded by bovine diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200 - 208
- Collett, M.S., Anderson, D.K. and Retzel, E. (1988c). Comparison of the pestivirus bovine viral diarrhea virus with members of the Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **69**, 2637 - 2643
- Collett, M.S., Moennig, V. and Horzinek, M.C. (1989). Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.* **70**, 253 - 266
- Collett, M.S., Wiskerchen, M.A., Welniak, E. and Belzer, S.K. (1991). Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch. Virol.* [Suppl.3], 19 - 27
- Compton, T., Nowlin, D.M. and Cooper, N.R. (1992). Initiation of Human Cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834 - 841
- Cooper, N.R., Nowlin, D., Taylor, H.P. and Compton, T. (1991). Cellular receptor for human cytomegalovirus. *Transplant. Proc.* **23**, 56 - 59
- Corapi, W.V., French, T.W. and Dubovi, E.J. (1989). Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **63**, 3934 - 3943
- Corapi, W.V., Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1988). Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *J. Virol.* **62**, 2823 - 2827
- Dahle, J., Liess, B. and Frey, H.R. (1987). Interspecies transmission of pestiviruses: experimental infections with bovine viral diarrhea in pigs and hog cholera virus. In: Pestivirus infections of ruminants, 195 - 211. Edited by J.W. Harkness. Luxembourg: Commission of the European Communities Publication.
- Dalgleish, A.G., Beverley P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor of the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763 - 767
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjoström, H., Noren, O. and Laude, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417 - 420

- Deng, R. and Brock, K.V. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology* **191**, 867 - 879
- Dimitrov, D.S. and Broder, C.C. (1997). HIV and membrane receptors. (Austin, TX: Landes Biosciences)
- Done, J.T., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J.W., Sands, J.J., Patterson, D.S.P., Sweasy, D., Shaw, I.G., Winkler, C.E. and Duffell, S.J. (1980). Bovine virus diarrhea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Res.* **106**, 473 - 479
- Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1987). Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. *Virology* **158**, 168 - 173
- Donis, R.O., Corapi, W. and Dubovi, E.J. (1988). Neutralizing monoclonal antibodies to bovine diarrhea virus bind to the 56K to 58 K glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **69**, 265 - 271
- Dörig, R., Marcil, A., Chopra, A. and Richardson, C.D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**, 295 - 305
- Dörig, R., Marcil, A., and Richardson, C.D. (1994). Membrane cofactor protein (CD46) is a receptor for measles virus that determines host specificity. In: Wimmer, E. (Ed.). Cellular receptors for animal viruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Doyle, L.G. and Heuschele, W.P. (1983). Bovine viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **183**, 1257 - 1259
- Dunster, L.M., Schneider-Schaulies, J., Löffler, S., Lankes, W., Schwartz-Albiez, S., Lottspeich, F. and Ter Meulen, V. (1994). Moesin: A cell membrane protein linked with susceptibility to measles virus infection. *Virology* **198**, 265 - 274
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rügenapf, T. and Thiel, H.-J. (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**, 4131 - 4135
- Eppstein, D.A., Marsh, Y.V., Schreiber, A.B., Newman, S.R., Todaro, G.J. and Nestor, J.J. Jr (1985). Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature* **318**, 663 - 665
- Erlenhoefer, C., Wurzer, W.J., Löffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J. Virol.* **75**, 4499 - 4505
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. and Berger, E.A. (1996). HIV-entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein coupled receptor. *Science* **272**, 872 - 877
- Flint, M., Thomas, J.M., Maidens, C.M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. and McKeating, J. (1999). Functional analysis of cell surface-expressed Hepatitis C Virus E2 glycoprotein. *J. Virol.* **73**, 6782 - 6790
- Flint, M., Quinn, E.R. and Levy, S. (2001). In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clin. Liver Dis.* **5**, 873 - 893
- Flores, E.F. and Donis, R.O. (1995). Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to Bovine Viral Diarrhea Virus infection due to a block in viral entry. *Virology* **208**, 565 - 575
- Flores, E.F., Kreutz, L. and Donis, R.O. (1996). Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. *J. Gen. Virol.* **77**, 1295 - 1303
- Grassmann, C.W., Isken, O. and Behrens, S.-E. (1999). Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J. Virol.* **73**, 9196 - 9205
- Gray, E.W. and Nettleton, P.F. (1987). The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine viral diarrhea viruses. *J. Gen. Virol.* **68**, 2339 - 2346

- Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lennette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Petersen, V. and Freese, U.K. (1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral „hairy“ leukoplakia, an AIDS associated lesion. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1564 - 1571
- Greve, J.M., Davis, G., Meyer, A.M., Forte, C.P., Yost, S.C., Marlor, C.W., Kamarck, M.E. and McClelland, A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**, 839 - 847
- Hadam, M.R. (1990). Cluster report: CD46. p 649. In: Knapp, W (Ed.) Leukocyte typing IV. University of Oxford press, Oxford. 649
- Harkness, J.W., Sands, J.J. and Richards, M.S. (1987). Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res. Vet. Sci.* **24**, 98 - 103
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). p 460 ff. In: Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York
- Harouse, J.M., Bhat, S., Spitalnik, S.L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D.H., Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **235**, 320 - 323
- Haywood, A. (1994). Virus receptors: Binding, adhesion strengthening and changes in viral structure. *J. Virol.* **68**, 1 - 5
- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H.-D., Müller, H.-P., Shukla, A.K. and Schazer, R. (1985). The receptor-destroying enzyme of Influenza C Virus is neuraminidase-O-acetyltransferase. *EMBO J.* **4**, 1503 - 1506
- Hofer, F., Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E. and Blass, D. (1994). Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 1839 - 1842
- Horzinek, M., Reczko, E. and Petzold, K. (1967). On the morphology of hog cholera virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* **21**, 475 - 478
- Hourcade, D., Holers, V.M. and Atkinson, J.P. (1989). The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv. Immunol.* **45**, 381 - 416
- Hsu, E.C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M.S., Udem, S.A., Dillehay, D.L., Xu, W., Rota, P.A., Bellini, W.J. and Richardson, C.D. (1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.* **72**, 2905 - 2916
- Huber, S.A. (1994). V-CAM is a receptor for encephalomyokarditis virus on murine endothelial cells. *J. Virol.* **68**, 3453 - 3458
- Hulst, M.M. and Moormann, R.J.M. (1997). Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E^{ms} and E2 of Classical Swine Fever Virus: E^{ms} and E2 interact with different receptors. *J. Gen. Virol.* **78**, 2779 - 2787
- Hulst, M.M., Panoto, F.E., Hoekmann, A., van Gennip, H.G.P. and Moormann, R.J.M. (1998). Inactivation of the RNase activity of glykoprotein E^{ms} of Classical Swine Fever Virus results in a cytopathogenic virus. *J. Virol.* **72**, 151 - 157
- Hulst, M.M., van Gennip, H.G.P. and Moormann, R.J.M. (2001a). Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid exchange in envelope protein E^{ms}. *J. Virol.* **74**, 9553 - 9561
- Hulst, M.M., van Gennip, H.G.P., Vlot, A.C., Schooten, E., de Smit, A.J. and Moormann, R.J.M. (2001b). Interaction of classical swine fever virus with membrane associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J. Virol.* **75**, 9585 - 9595

- Iqbal, M., Flick-Smith, H.F. and McCauley, J.W. (2000). Interactions of BVDV glycoprotein E^{ms} with the cell surface: glycosaminoglycan binding. *J. Gen. Virol.* **81**:451 - 459
- Jackson, T., Ellard, F.M., Abu Ghazaleh, R., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W.I. and King, A.M.Q. (1996). Efficient infection of cells in culture by Type O Foot-and-Mouth Disease Virus requires binding of cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **70**, 5282 - 5287
- Kahrs, R.F. (1973). Effects of bovine viral diarrhea on the developing fetus. *J. Am. Vet. Assoc.* **163**, 877 - 888
- Kallstrom, H., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P. and Jonsson, A.B. (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* **25**, 639 - 647
- Keil, G.M., Ebeling-Keli, A. and Koszinowski, U.H. (1984). Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* **50**, 784 - 795
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercebd, T., Gluckmann, J.-C. and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4-molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767 - 768
- Klimstra, W.B., Ryman, K.D. and Johnston, R.E. (1998). Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* **72**, 7357 - 7366
- Knipe, D.M. (1996). Virus-host cell interactions. pp 274 - 292. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R. and Thiel, H.-J. (1995). Classical Swine Fever Virus: Independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J. Virol.* **69**, 6479 - 6486
- Kopecky, J., Grubhoffer, L., Kovar, V., Jindrak, L. and Vokurkova, D. (1999). A putative host-cell receptor for Tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affino blotting. *Intervirology* **42**, 9 - 16
- Kozak, S.L., Platt, E.J., Madani, N., Ferro, F.E.Jr., Peden, K. and Kabat, D. (1997). CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **71**, 873 - 882
- Krantic, S., Gimenez, C. and Roubourdin-Combe, C. (1995). Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation. *J. Gen. Virol.* **76**, 2793 - 2800
- Kümmerer, B. and Meyers, G. (1999). 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
- Lentz, T.L., Burrage, T.G., Smith, A.L., Crick, J. and Tignor, G.H. (1982). Is the acetylcholin receptor a rabies virus receptor? *Science* **215**, 182 - 184
- Lentz, T.L. (1990). The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *J. Gen. Virol.* **71**, 751 - 766
- Liess, B., Frey, H.-R., Kittsteiner, H., Baumann, F. und Neumann, W. (1974). Beobachtungen und Untersuchungen über die „mucosal disease“ des Rindes - einer immunbiologisch erklärbaren Spätform der BVDV-MD-Virusinfektion mit Kriterien einer „slow virus infection“? *Dt. Tierärztl. Wschr.* **81**, 477 - 500
- Liszewski, M.K. and Atkinson, J.P. (1992). Membrane cofactor protein. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **178**, 47 - 60
- Liszewski, M.K., Leung, M, Cui, Wengying, Subramanian, B., Parkinson, J., Barlow, P.N., Manchester, M. and Atkinson, J.P. (2000). Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor activity (MCP;CD46). *J. Biol. Chem.* **275**, 37692 - 37701

- Löffler, S., Lottspeich, F., Lanza, F., Azorsa, D.O., terMeulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (1997). CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to Canine Distemper Virus. *J. Virol.* **71**, 42 - 49
- Lublin, D.M., Liszewski, M.K., Post, T.W., Arce, M.A., Le Beau, M.M., Rebentisch, M.B., Lemons, L.S., Seya, T. and Atkinson, J.P. (1988). Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP). Evidence in the inclusion of the multigene family of complement regulatory proteins. *J. Exp. Med.* **168**, 181 - 194
- Lusso, P., Secciero, P., Crowley, R.W., Garzino-Demo, A., Bernemann, Z.N. and Gallo, R.C. (1994). CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: Interference with Human Immunodeficiency Virus. *PNAS* **91**, 3872 - 3876
- Maisner, A., Alvarez, J., Liszewski, M.K., Atkinson, D.J., Atkinson, J.P. and Herrler, G. (1996). The N-Glykan of the SCR 2 region is essential for membrane cofactor protein (CD46) to function as a measles virus receptor. *J. Virol.* **70**, 4973 - 4977
- Manchester, M., Eto, D.S., Valsamakis, A., Liton, P.B., Fernandez-Munoz, R., Rota, P.A., Bellini, W.J., Forthal, D.N. and Oldstone, M.B.A. (2000). Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* **74**, 3967 - 3974
- Manchester, M., Nanche, D. and Stehle, T. (2000). CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology* **274**, 5 - 10
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrooks, S. (1991). In: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Marsh, M. and Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Adv. Virus. Res.* **36**, 107 - 151
- Mead, R., Hincliffe, S.J. and Morgan, B.P. (1999). Molecular cloning, expression and characterization of the rat analogue of human membrane cofactor protein (MCP/CD46). *Immunology* **98**, 137 - 143
- Mendelsohn, C.L., Wimmer, E. and Racaniello, V.R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**, 855 - 865
- Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* **171**, 555 - 567
- Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E.J. and Thiel, H.-J. (1991). Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* **180**, 602 - 616
- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E.J., Collett, M.S. and Thiel, H.-J. (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* **191**, 368 - 386
- Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Ann. Vir. Res.* **47**, 53 - 118
- Mendelsohn, C.L., Wimmer, E. and Racaniello, V.R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**, 855 - 865
- Minor, P.D., Pipkin, P.A., Hockley, D., Schild, G.C. and Almond, J.W. (1984). Monoclonal antibodies which block cellular receptors of poliovirus. *Virus Res.* **1**: 203 - 212
- Miwa, T., Nonaka, M., Okada, N., Wanaka, S., Shiroishi, T. and Okada, H. (1998). Molecular cloning of rat and mouse membrane cofactor protein (MCP, CD46): preferential expression in testis and close linkage between the mouse MCP and CR2 genes on distal chromosome 1. *Immunogenetics* **48**, 363 - 371
- Mizushima, S. and Nagata, S. (1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids research* **18**, 5322

- Moennig, V. and Plagemann, P.G.W. (1992). The pestiviruses. *Adv. Vir. Res.* **41**, 53 - 98
- Molina, H., Perkins, S.J., Guthridge, J., Gorke, J., Kinoshita, T. and Holers, V.M. (1995). Characterization of a complement receptor 2 (CR2, CD21) ligand binding site for C3. An initial model of ligand interaction with two linked short consensus repeat modules. *J. Immunol.* **154**, 5426 - 5435
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J. and Spear, P.G. (1996). Herpes Simplex Virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427 - 436
- Moormann, R.J.M., Warmerdam, P.A.M., Van der Meer, B., Schaaper, W.M.M., Wensvoort, G. and Hulst, M.M. (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* **177**, 184 - 198
- Moses, A.V., Bloom, F.E., Pauza, C.D. and Nelson, J.A. (1993). Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occurs via a CD4/galactosylceramid independent mechanism. *PNAS* **90**, 10474 - 10478
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C. and Gerlier, D. (1993a). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for Measles Virus. *J. Virol.* **67**, 6025 - 6032
- Naniche, D., Wild, T.F., Rabourdin-Combe, C. and Gerlier, D. (1993b). Measles virus haemagglutinin induces downregulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J. Gen. Virol.* **74**, 1073 - 1079
- Nemerow, G.R., Siaw, M.F. and Cooper, N.R. (1986). Purification of the Epstein-Barr virus/C3d complement receptor of human B-Lymphocytes: antigenic and functional properties of the purified protein. *J. Virol.* **58**, 709 - 712
- Nettleton, P.F. (1990). Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev. Sci. Techn. Intern. Epizootics* **9**, 131 - 150
- Nettleton, P.F., Gilmour, J.S., Herring, J.A. and Sinclair, J.A. (1992). The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 179 - 188
- Nielsen, L., Blixenkrone-Møller, M., Thylstrup, M., Hansen, N.J.V. and Bolt, G. (2001). Adaptation of wild-type measles virus to CD46 receptor usage. *Arch. Virol.* **146**, 197 - 208
- Okada, N., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P. and Caparon, M. (1995). Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *PNAS.* **92**, 2489 - 2493
- Olafson, P., MacCallum, A.D. and Fox, F.H. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* **36**, 205 - 213
- Pauly, T., König, M., Thiel, H.-J. and Saalmüller, A. (1998). Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **79**, 31 - 40
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *PNAS* **85**, 2444 - 2448
- Pellerin, C., Van den Hurk, J., Lecomte, J. and Tijssen, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**, 260 - 268
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. and Abrignani, S. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938 - 941
- Plowright, W. (1969). Other virus diseases in relation to the J.P. 15 programme. pp 19 - 23. In: *Joint campaign against Rinderpest. First technical review meeting, Phase IV, Mogadiscio*. Mogadiscio, Kenya
- Pocock, D.H., Howard, C.J., Clarke, M.C. and Browmlie, J. (1987). Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine diarrhea virus. *Arch. Virol.* **94**, 43 - 54

- Post, T.W., Liszewski, M.K., Adams, E.M., Tedja, I., Miller, E.A. and Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms which correlate with protein phenotype. *J. Exp. Med.* **174**, 93 - 102
- Rasko, J.E., Battini, J.L., Gottschalk, R.J., Mazo, I. and Miller, A.D. (1999). The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *PNAS* **96**, 2129 - 2134
- Rebhuhn, W.C., French, T.W., Perdrizet, J.A., Dubovi, E.J., Dill, S.G. and Karcher, L.F. (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine viral diarrhea infection in cattle. *J. Vet. Int. Med.* **3**, 42 - 46
- Renard, A., Dino, D. and Martial, J. (1987). Vaccines and diagnostics derived from bovine viral diarrhea virus. European patent application number 86870095.6. Publication number 02.08672
- Reid, K.B., Bentley, D.R., Campbell, R.D., Chung, L.P., Sim, R.B., Kristensen, T. and Tack, B.F. (1986). Structural and functional studies on C4b-binding protein, a regulatory component of the human complement system. *Immunol. Today* **7**, 230
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R. and Dubovi, E.J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhea into genotypes. *Virology* **205**, 66 - 74
- Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. (1995). The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a non-cytopathic BVDV. *Virology* **212**, 39 - 46
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Thodes, C. and Berg, P. (1977). Labelling deoxynucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237 - 251
- Roderiquez, G., Oravacz, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D.C., Mostowski, H. and Norcross, M.A. (1995). Mediation of Human Immunodeficiency Type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglykans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* **69**, 2233 - 2239
- Rolsma, M.D., Gelberg, H.B. and Kuhlenschmidt, M.S. (1994). Assay for evaluation of Rotavirus-cell interactions: Identification of an enterocyte ganglioside fraction that mediates Group A Porcine Rotavirus recognition. *J. Virol.* **68**, 258 - 268
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H. and Thiel, H.-J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* **67**, 3288 - 3294
- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M. and Thiel, H.-J. (1997). N-terminal protease of pestiviruses: Identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.* **72**, 2544 - 2547
- Russell, S.M., Sparrow, R.L., McKenzie, I.F.C. and Purcell, D.J.F. (1992). Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD46 is controlled by alternative splicing. *Eur. J. Immunol.* **22** 1513 - 1518
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodatte, R., Tanuri, A. and Mason, P.W. (1997). Tissue culture adaptation of foot and mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**, 5115 - 5123
- Salas-Benito, J.S. and delAngel, R.M. (1997). Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind Dengue Type 4 Virus. *J. Virol.* **71**, 7246 - 7252
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). In: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**, 5463 - 5467
- Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A. and Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for Human Herpesvirus 6. *Cell* **99**, 817 - 827

- Sauvageau, G., Stocco, R., Kasparian, S. and Menezes, J. (1990). Epstein-Barr virus receptor expression on human CD8+ (cytotoxic/suppressor) T Lymphocytes. *J. Gen Virol.* **71**, 379 - 386
- Schelp, C., Greiser-Wilke, I., Wolf, G., Beer, M., Moennig, V. and Liess, B. (1995). Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to Bovine Viral Diarrhea Virus infection. *Arch. Virol.* **140**, 1997 - 2009
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. and Thiel, H.-J. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**, 1169 - 1171
- Sekiguchi, K., Franke, A.J. and Baxt, B. (1982). Competition for cellular receptor sites among selected aphotoviruses. *Arch. Virol.* **74**, 53 - 64
- Seya, T., Hirano, A., Matsumoto, M., Nomura, M. and Ueda, S. (1999). Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and structures. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1255 - 1260
- Shaw, I.G., Winkler, C.E. and Terlecki, S. (1967). Experimental reproduction of hypomyelinogenesis congenita of lambs. *Vet. Rec.* **81**, 115 - 116
- Spear, P.G., Shieh, M.T., Herold, B.C., WuDunn, D. and Koshy, T.I. (1992). Heparan sulfate glykosaminoglykans as primary cell surface receptors for Herpes Simplex Virus. *Adv. Exp. Med. Virol.* **313**, 341 - 353
- Spear, P.G. (1993). Entry of alphaherpesviruses into cells. *Semin. Virol.* **4**, 167 - 180
- Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1993). Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* **67**, 7088 - 7095
- Steffens, S., Thiel, H.-J. and Behrens, S.E. (1999). The RNA-dependent RNA-polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J. Gen. Virol.* **80**, 2583 - 2590
- Tamura, J.K., Warrenner, P. and Collett, M.S. (1993). RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **193**, 1 - 10
- Tardieu, M., Epstein, R.L. and Weiner, H.L. (1982). Interaction of viruses with cell surface receptors. *Int. Rev. Cyt.* **80**, 27 - 61
- Tateno, M., Gonzalez-Scarano, F. and Levy, J.A. (1989). Human immunodeficiency virus can infect CD4 negative human fibroblastoid cells. *PNAS* **86**, 4287 - 4290
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. and Yanagi, Y. (2000). SLAM (Cdw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893 - 896
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E.J. and Thiel, H.-J. (1996). Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *J. Virol.* **70**, 7851 - 7858
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T. and Meyers, G. (1991). Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* **65**, 4705 - 4712
- Thiel, H.-J., Plagemann, P.G.W. and Moennig, V. (1996). Pestiviruses. pp 1059 - 1073. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia
- Toyomura, K., Fujimura, T., Murakami, H., Natsume, T., Shigehisa, T., Inoue, N., Takeda, J. and Kinoshita, T. (1997). Molecular cloning of a pig homologue of membrane cofactor protein. *Int. Immunol.* **9**, 869 - 876
- Tsujimura, A., Shida, K., Kitamura, M., Nomura, M., Takeda, J., Tanaka, H., Matsumoto, M., Matsumija, K., Okuyama, A., Nishimune, Y., Okabe, M. and Seya, T. (1998). Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem. J.* **15**, 163 - 168

- Uncapher, C.R., DeWitt, C.M. and Colonno, R.J. (1991). The major and minor group receptor families contain all but one rhinovirus serotype. *Virology* **180**, 814 - 817
- Vantsis, V.T., Linklater, K.A., Rennie, J.C. and Barlow, R.M. (1997). Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of border disease. *J. Comp. Path.* **89**, 331 - 339
- Van Zijl, M., Wensvoort, G., De Kluyver, E., Hulst, M., Van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. and Moormann, R. (1991). Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope protein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Virol.* **65**, 2761 - 2765
- Varthakavi, V., Minocha, H.C. (1996). Identification of a 56 kDa putative bovine herpesvirus 1 cellular receptor by anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* **77**, 1875 - 1882
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1997). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *PNAS* **76**, 615 - 619
- Wang, K.-S., Kuhn, R.J., Strauss, E.G., Ou, S. and Strauss, J.H. (1992). High affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis Virus in Mammalian cells. *J. Virol* **66**, 4992 - 5001
- Warrener, P. and Collett., M.S. (1995). Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.* **69**, 1720 - 1726
- Weis, J.J., Toothaker, L.E., Smith, J.A., Weis, J.H. and Fearon, D.T. (1988). Structure of the human B lymphocyte receptor for C3d and the Epstein-Barr virus and relatedness to other members of the family of C3/C4 binding proteins. *J. Exp. Med.* **167**, 1047 - 1066
- Wengler, G. (1991). Family Flaviviridae, pp 223 - 233. In: Francki, R.I.B., Fauquet C.M., Knudson, D.L. and Brown, F. (Eds.). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer Verlag. Berlin
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rümnapf, T., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J. Virol.* **64**, 3563 - 3569
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. and Thiel, H.-J. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* **66**, 3677 - 3682
- White, J.M. and Littman, D.R. (1989). Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**, 725 - 728
- Williams, R.K. and Straus, S.E. (1997). Specificity and affinity of binding of Herpes Simplex Virus Type 2 glycoprotein B to glycosaminoglykans. *J. Virol.* **71**, 1375 - 1380
- Wimmer (Ed.) (1994). Cellular receptors for animal viruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Wiskerchen, M. and Collett, M.S. (1991). Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* **184**, 341 - 350
- Wool-Lewis, R.J. and Bates, P (1998). Characterization of Ebola Virus entry by using pseudotyped viruses: Identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* **72**, 3155 - 3160
- WuDunn, D. and Spear, P.G. (1989). Initial interaction of Herpes Simplex Virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**, 52 - 58
- Wykes, M.N., Shellam, G.R., McCluskey, J., Kast, W.M., Dallas, P.B. and Price, P. (1993). Murine cytomegalovirus interacts with major histocompatibility complex class I molecules to establish cellular infection. *J. Virol.* **67**, 4182 - 4189
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P.R., Lin, C., Murcko, M.A., Collett, M.S. and Rice, C.M. (1997). Bovine viral diarrhea virus NS3 serine protease: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* **71**, 5312 - 5322

-
- Xue, W. and Minocha, H.C. (1993). Identification of the cell surface receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* **74**, 73 - 79
- Xue, W. and Minocha, H.C. (1995). Identification of Bovine Viral Diarrhea Virus receptor in different cell types. *Vet. Microbiol.* **49**, 67 - 79
- Xue, W., Zhang, S. and Minocha, H.C. (1997). Characterization of a putative receptor protein for Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Microbiol.* **51**, 105 - 118
- Yanagi, Y. (2001). The cellular receptor for measles virus - elusive no more. *Rev. Med. Virol.* **11**, 149 - 156

8 Anhang

Im Folgenden ist die cDNA Sequenz des bovinen CD46 sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz angegeben. Die Nukleotidsequenz entspricht dem BamHI/EcoRI „insert“ des Vektors pbvKM3, das auch in den Expressionsvektoren pbvKM4 und pbvKM5 enthalten war. Nukleotide und Aminosäuren sind fortlaufend nummeriert.

1	<u>GGATCCCCGGGCTGCAGGCGCCGGTGC</u>	<u>CGTCCGGTCTCTGTATCGCGGGAGCTGGACTCAGCAAGGTCTCTGCGGTCTT</u>	80
81	GGGTGTCCCCTGGTCTCCCCGAAA	ATG AGG GCG TCT TGC ACC CCG CTG AAG GCG CCG CTC CGC	144
1		M R A S C T P L K A P L R	13
145	CGC CCC GAA AGA CTG GCT TCT TCT GGG CGC TTC GCC TGG GTG CTT CTG CTG GCG CCG CTG		204
14	R P E R L A S S G R F A W V L L L A P L		33
205	CTC CTG CTG CCC ACG TCC TCC GAT GCC TGT GAT GAT CCA CCA AGA TTT GTC TCT ATG AAG		264
34	L L L P T S S D A C D D P P R F V S M K		53
265	CCC CAG GGT ACC CTT AAA CCC AGT TAT AGT CCT GGG GAG CAG ATT GTG TAT GAA TGT CAT		324
54	P Q G T L K P S Y S P G E Q I V Y E C H		73
325	CTG GGT TTC CAG CCA GTA ACT CCT GGT CAA GTC CTG GCT CTC GTT TGT CAG GAT AAT AAT		384
74	L G F Q P V T P G Q V L A L V C Q D N N		93
385	ACA TGG TCG TCT CTC CAG GAG GGC TGT AAA AAA AGA CGG TGT CCT ACC CTA GCT GAT CCC		444
94	T W S S L Q E G C K K R R C P T L A D P		113
445	ACA AAT GGC CAA GTT ATC CTT GTA AAT GGA AAT ACT GAG TTT GGC TCA GAG GTT CAC TAT		504
114	T N G Q V I L V N G N T E F G S E V H Y		133
505	GTT TGT AAT AAT GGT TAT TAC TTA CTG GGG ACA AAT ATT TCT TAT TGT GAA GTT TCT TCT		564
134	V C N N G Y Y L L G T N I S Y C E V S S		153
565	GGA ACT GGT GTG AAC TGG AGT GAT AAT CCT CCA ACA TGT GAA AAG ATT TTG TGT CAA CCG		624
154	G T G V N W S D N P P T C E K I L C Q P		173
625	CCT CCA GAA ATT CAA AAT GGA AAA TAC ACC AAT AAC CAC AAG GAT GTA TTT GAA TAC AAT		684
174	P P E I Q N G K Y T N N H K D V F E Y N		193
685	GAA GTA GTA ACT TAT AGT TGT GAT CCT TCA AAT GGG CCA GAT GAA TAT TCC CTT GTT GGA		744
194	E V V T Y S C D P S N G P D E Y S L V G		213
745	GAG AGC AAG CTT ACT TGT ATT GGA AAT GGT GAA TGG AGT AGT CAA CCC CCT CAG TGT AAA		804
214	E S K L T C I G N G E W S S Q P P Q C K		233
805	GTG GTC AAA TGT GTA TAT CCA GCC ATT GAA CAT GGA ACG ATA GTC TCA GGA TTT GGA CCA		864
234	V V K C V Y P A I E H G T I V S G F G P		253
865	AAA TAT TAC TAC AAA GCG ACG GTT GTA CTT AAA TGC AAT GAG GGT TTT AAC CTT TAT GGC		924
254	K Y Y Y K A T V V L K C N E G F N L Y G		273
925	AAC AGT GTA GTT GTC TGT GGT GAG AAC AGT ACT TGG GAG CCC GAG CTA CCA AAG TGT ATT		984
274	N S V V V C G E N S T W E P E L P K C I		293
985	AAA GGA CAT CCC CCC CGT CCT ACT GAT GCA TCA CCC CCT AAC GGT GCT GAG GGT TTA GGT		1044
294	K G H P P R P T D A S P P N G A E G L G		313
1045	GCA GGA TAC ATC GTG CTC GTC ATT GTT GCT GTA CTT ATT GGC GTT GGA TTA TTG CTC TGC		1104
314	A G Y I V L V I V A V L I G V G L L L C		333
1105	CTG TAC TGC TGT TTT TGC AGA CAG AGG AAG AAA GGC ATA TAC GTA ACT GGT GAG AGC CAC		1164
334	L Y C C F C R Q R K K G I Y V T G E S H		353
1164	AGA CAA GAC ATT TTA TTT TCT CTC TGA GAAGAGATGAGAGAAACGTTTGCTTTTAATCATTAAAAGGAAG		1235
354	R Q D I L F S L *		361

1236	CAGAATGTAGCGCTACGTACACCCTTATCAGGATAAAGCAACCCTGCAACAGAACAGATGAACTGAACCGTTTCCAGG	1315
1316	AACGCATGTACCATTAGCCATGAAAATGAAGGAAACCTTGCCATTTGCCACAATACAGACAGACCTGAGGGGACTTTGC	1395
1396	TGGGTAATAAGTCATGTAAAGAAAGACGTGTACTGTCTGATCTCACTTACACATGGAATCGAAAAAACAAGCTTTCACA	1475
1476	GAAGAAAAATGAGATTTGTCGATGTCAGCGGTGGGGGACTGGTGGGGTGGGTTTGAGTAAAGGTGGTCAGAAAATACA	1555
1556	AACCTTCAGTTATAGGGTGAGAAAGTACTGGGGTATAATTACAGCACAGTGGCTACCATGAGTTACTCATACTGTATTTA	1635
1636	TGTTGGCAAGTTGCTAAGAGAGTGGATCTTAAAAAGTTCTAATCACATGGAAGAAAAAAGCTTTTTGTAGTATTGACATT	1715
1716	ATCAAATCATGCTGTACACCTTAAACTTAACGCAATGCCCTCTCTCAATTTTGTCTCAATACTGAAGGAAAAAAGTATA	1795
1796	AAGATTATTTGCCACTTTCTTACTGTGAGAAATAAACTGCTAAGCGATAGCCATAGGAACATTA AACATT TTAATG	1875
1876	TGGCAGAAGTATAGTCACTATTCTGTAATGCTTCTTTGAAACATGTATGAATTTAGGTTTAAACACCTTGCCTGTTTTTC	1955
1956	CTTAAATAGCACTTGATTTATGGGGTAGGTCAACATGGCATTCTAAGGTAGGGAAATGTGTTTGT TTTTCTTATAAGA	2035
2036	TCTCCAAACTCAGAGAAATATATTGAAAAATGACATTACATGTCATTTGCAAAGAAAGTGATTTTGAAATCTTTTTTGT	2155
2156	TCAGAGGTGATTACCAATCTTAAGGTTTCTTTGAGTTTCTTAACCTAAGAATATTACTGGAAAAATATCTTACATTGAA	2195
2196	TAGATTA AAATGCTATTTTAAAAATGTGTAACCTCGTGGTAATTTAGAGATGCTATTAAGTTTTTATCTGGCATTGTT	2275
2276	CTTCACGCCCTTTTATTTATAATAAGCCAGTCTGAGAAACCAAG <u>AATTC</u>	2324