



NS2-3



NS2

NS3

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROZESSIERUNG
DES NICHTSTRUKTURPROTEINS 2-3
(NS2-3) VON PESTIVIREN

INAUGURAL-DISSERTATION

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

TOBIAS LACKNER

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2004

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

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie

Betreuer: HD Dr. Norbert Tautz

Untersuchungen zur Prozessierung des
Nichtstrukturproteins 2-3 (NS2-3) von Pestiviren

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

eingereicht von
Tobias Lackner
Tierarzt aus Weinheim

Gießen (2004)

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: HD Dr. N. Tautz
Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der Disputation: 13.12.2004

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

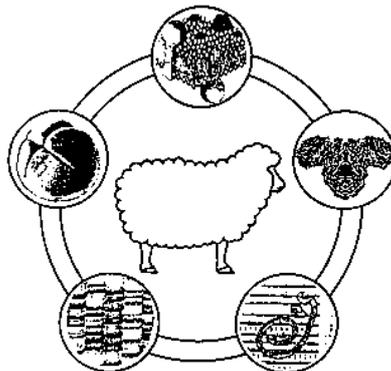
Teile dieser Arbeit sind erschienen in:

Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A. E., and Tautz, N. (2004). Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol* 78, 10765-10775 (Lackner et al., 2004).

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ und des Sonderforschungsbereiches 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ gefördert.



Sonderforschungsbereich 535



Graduiertenkolleg 455

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3	ZUSAMMENFASSUNG	9
4	EINLEITUNG	11
4.1	DIE FAMILIE <i>FLAVIVIRIDAE</i>	11
4.2	DAS GENUS PESTIVIRUS	12
4.3	BOVINE VIRUSDIARRHÖ UND MUCOSAL DISEASE	17
4.4	GENOM UND PROTEINE DER PESTIVIREN.....	22
4.4.1	Genom und Polyprotein	22
4.4.2	Virale Strukturproteine	24
4.4.3	Virale Nichtstrukturproteine.....	26
4.5	RNA-REKOMBINATION ALS MOLEKULARE URSACHE DER ZYTOPATHOGENITÄT	32
4.5.1	cp BVD-Viren mit Insertionen direkt oberhalb von NS3	34
4.5.2	cp BVD-Viren mit Insertionen von Jiv-Sequenzen	39
4.5.3	cp BVD-Viren mit anderen Mutationen im NS2.....	46
4.6	VIRALE PROTEINASEN	48
4.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	53
5	MATERIAL UND METHODEN	54
5.1	MATERIAL.....	54
5.1.1	Chemikalien und Reagenzien	54
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	56
5.1.3	Geräte.....	56
5.1.4	Enzyme.....	57
5.1.5	Kits.....	57
5.1.6	Antikörper	58
5.1.7	Basis-Plasmide	58

Inhaltsverzeichnis

5.1.8	NS2-Punktmutanten mit stillen Marker-Schnittstellen für Restriktionsenzyme	59
5.1.9	BVDV-CP7-Expressionsplasmide auf Basis des pCITE-2A.....	60
5.1.10	Jiv-Expressionsplasmide auf Basis des pCITE-2A	61
5.1.11	Gesamtklone.....	63
5.1.12	<i>E. coli</i> K12-Stämme	63
5.1.13	Eukaryontische Zellen	63
5.1.14	Viren	63
5.1.15	Lösungen und Puffer	64
5.2	METHODEN.....	66
5.2.1	Arbeiten mit DNA	66
5.2.1.1	<i>Herstellung kompetenter Bakterien</i>	<i>66</i>
5.2.1.2	<i>Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen</i>	<i>66</i>
5.2.1.3	<i>Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen und Konzentrationsbestimmung</i>	<i>67</i>
5.2.1.4	<i>Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken</i>	<i>68</i>
5.2.1.5	<i>Agarosegel-Elektrophorese von DNA und Isolation von DNA-Fragmenten</i>	<i>71</i>
5.2.1.6	<i>Ligation und Transformation in E. coli</i>	<i>72</i>
5.2.1.7	<i>PCR, RT-PCR und Klonierung in pGEM-T.....</i>	<i>73</i>
5.2.1.8	<i>Gerichtete Mutagenese</i>	<i>76</i>
5.2.1.9	<i>Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen</i>	<i>77</i>
5.2.2	Arbeiten mit Zellen.....	80
5.2.2.1	<i>Allgemeine Zellkultur-Techniken</i>	<i>80</i>
5.2.2.2	<i>T7-Vaccinia-Expression und metabolische Proteinmarkierung.....</i>	<i>81</i>
5.2.2.3	<i>Infektion von MDBK-Zellen und Markierung mit ³⁵S und ³²P</i>	<i>82</i>
5.2.2.4	<i>Elektroporation von MDBK-Zellen</i>	<i>83</i>
5.2.2.5	<i>Bestimmung des Virus-Titers von Zellkulturüberständen</i>	<i>84</i>
5.2.3	Arbeiten mit Proteinen	86
5.2.3.1	<i>Radioimmunpräzipitation</i>	<i>86</i>
5.2.3.2	<i>SDS-PAGE, Autoradiographie und Auswertung über Phosphorimager</i>	<i>88</i>
5.2.3.3	<i>Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper (mAk)</i>	<i>90</i>
5.2.3.4	<i>Western Blot (semidry)</i>	<i>91</i>
5.2.3.5	<i>Radiosequenzierung.....</i>	<i>93</i>
5.2.3.6	<i>Immunfluoreszenz</i>	<i>94</i>

Inhaltsverzeichnis

5.2.4	Arbeiten mit RNA	95
5.2.4.1	<i>In-vitro-Transkription</i>	95
5.2.4.2	<i>Präparation von RNA und denaturierende Agarosegel-Elektrophorese</i>	96
6	ERGEBNISSE	99
6.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON NS2.....	99
6.1.1	NS2 von Pestiviren ist bioinformatischen Analysen zufolge eine Cystein-Autoprotease, die entfernte Verwandtschaft zur NS2-3-Protease von Hepaciviren aufweist	99
6.1.2	Die Prozessierung des BVDV CP7 NS2-3 erfolgt an der konservierten 1589Arg/Gly1590-Spaltstelle und erfordert nur sieben Aminosäuren von NS3	104
6.1.3	Zwei der vorhergesagten katalytischen Aminosäuren der NS2-Protease sind essentiell für die NS2-3-Autoprozessierung.....	110
6.1.4	Die NS2-Protease ist in cis aktiv.....	116
6.1.5	Die NS2-Protease ist essentiell für die RNA-Replikation von BVDV CP7	119
6.1.6	Es gibt Hinweise auf eine essentielle Bedeutung der NS2-Protease auch für noncp BVDV.....	124
6.1.7	Die Effizienz der NS2-3-Autoprozessierung wird in BVDV-infizierten Zellen Biotyp-spezifisch herunterreguliert	126
6.1.8	In BVDV-infizierten Zellen korreliert die Effizienz der viralen RNA-Synthese mit der Menge an NS3.....	132
6.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONSWEISE VON JIV	135
6.2.1	Zur Induktion der NS2-3-Spaltung werden stöchiometrische Mengen von Jiv benötigt	135
6.2.2	75 Aminosäuren des Jiv-Proteins sind ausreichend zur Induktion der NS2-3-Spaltung und 20 Aminosäuren genügen zur Interaktion mit pestiviralem NS2	138
6.2.3	Jiv hat zwei Bindungsstellen im BVDV NS2.....	143
6.2.4	Die identischen 20 Aminosäuren des Jiv90 interagieren mit beiden Bindungsstellen im BVDV NS2.....	148
6.2.5	Keine der 20 NS2-bindenden Aminosäuren des Jiv90 ist essentiell für die Interaktion mit NS2 oder die Induktion der NS2-3-Prozessierung	152
6.2.6	Nur eine Aminosäure des Jiv90 ist essentiell für die Induktion der NS2-3-Prozessierung	156

Inhaltsverzeichnis

7	DISKUSSION.....	162
7.1	VERWANDTSCHAFT DER PESTIVIRALEN NS2-PROTEASE MIT DER NS2-3- PROTEASE VON HEPACIVIREN	162
7.2	MODULATION DER NS2-3-SPALTUNGSEFFIZIENZ	167
7.3	EFFEKTE DER REGULIERTEN NS2-3 AUTOPROZESSIERUNG AUF DEN PESTIVIRALEN REPLIKATIONSZYKLUS	171
7.4	NS2-3-SPALTUNG UND VIRULENZ VON BVDV	175
7.5	WIRKUNG DES ZELLULÄREN PROTEINS JIV AUF DIE NS2-3-SPALTUNG.....	177
7.6	MECHANISMEN DER NS3-ENTSTEHUNG	182
7.7	AUSBLICK	184
8	SUMMARY.....	185
9	LITERATURVERZEICHNIS	186
10	DANKSAGUNG.....	200

2 Abkürzungsverzeichnis

aa	„amino acids“ (Aminosäuren)
A	Ampere (Stromstärke), Adenosin (nt), Alanin (AS)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure(n)
BDV	Border Disease Virus
BHK	baby hamster kidney (Hamsternierenfibroblasten)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVD/MD	Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhö
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin (nt); Cystein (AS); Core (Kapsidprotein)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy-DNA, zur RNA komplementäre DNA
cINS	cellular insertion (beim BVDV-Stamm NADL; jetzt „Jiv90“)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Ci	Curie
CIP	calf intestine alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase)
cp	zytopathogen
CPE	zytopathischer Effekt
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
CSFV	Virus der klassischen Schweinepest
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
Cy3	Cyanogen 3
D	Asparaginsäure
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DI	defektes interferierendes Partikel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure (AS); envelope protein (Hüllprotein in der viralen Membran)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
F	Phenylalanin (AS); Farad (Einheit der elektrischen Kapazität)
f	femto
Fa.	Firma
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
G	Guanosin (nt); Glycin (AS)
g	Gramm (Gewicht); Erdbeschleunigung
GABA(A)-RAP	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Histidin
h	Stunde
HCV	Hepatitis-C-Virus
HS	Hämorrhagisches Syndrom
HSP	heat shock protein (Hitzeschockprotein)
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources am DKFZ
I	Isoleucin
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
incl.	inklusive
IRD800	Infrared Dye 800 (Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von Oligonukleotiden)
IRES	internal ribosome entry site (interne Ribosomeneintrittsstelle)
Jiv	J-domain protein interacting with viral protein
Jiv90	90 Aminosäuren Fragment des zellulären Jiv
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
L	Leucin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LC-3	light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B
M	Molar (Konzentration); Methionin (AS)
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
mAk	monoklonaler Antikörper
MBP	Maltose-bindendes Protein
MD	Mucosal Disease
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney Cells (Rindernierenzellen)
Mg	Magnesium
min	Minuten
MOI	multiplicity of infection (Anzahl infektiöser Viren pro Zelle)
mRNA	messenger RNA
N	normal (chemisch); Asparagin (AS)
n	nano (10^{-9})
NADL	National Animal Disease Laboratory
NEDD8	neural precursor cell-expressed developmentally downregulated 8

Abkürzungsverzeichnis

noncp	nicht zytopathogen
N ^{pro}	N-terminale Protease
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
P	Prolin
p	pico (10 ⁻¹²)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
p.i.	post infectionem (nach der Infektion)
PI	persistently infiziert
Q	Glutamin
QC	„QuikChange“
R	Arginin
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
S	Serin
s.	siehe
sec	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SMT3B	suppressor of MIF2 mutation 3B
ssRNA	single stranded RNA (Einzelstrang-RNA)
T	Thymin (nt); Threonin (AS)
tRNA	transfer RNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TBE	Tris Borat EDTA-Puffer
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50%
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (units); Uridin (nt)
u.a.	unter anderem
UCH	ubiquitin-C-terminal hydrolase
ÜS	Überstand
UTR	untranslated region (nicht-translatierte Region einer RNA)
UV	ultraviolette elektromagnetische Strahlung
V	Volt (Spannung); Valin (AS)
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
W	Watt (Leistung); Tryptophan (AS)

Abkürzungsverzeichnis

w/v	Gewichtprozent
wt	Wildtyp
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

3 Zusammenfassung

Nichtzytopathogene (noncp) Stämme des Pestivirus BVDV (Virus der bovinen Virusdiarrhoe) können nach diaplazerarer Übertragung persistierende Infektionen hervorrufen, die mit einer spezifischen Immuntoleranz gegen das infizierende Virus einhergehen. Infolge von RNA-Rekombinationen oder Mutationen, häufig im Bereich des Nichtstrukturproteins 2 (NS2), entstehen in diesen persistent infizierten Tieren zytopathogene (cp) Viren, die zur tödlichen Krankheit Mucosal Disease (MD) führen. Diese cp BVD-Viren unterscheiden sich von ihren noncp-Vorgängern in zwei Eigenschaften: (i) Sie bilden in infizierten Zellen große Mengen des Nichtstrukturproteins 3 (NS3), während in noncp BVDV-infizierten Zellen bisher nur der ungespaltene Vorläufer NS2-3 gefunden werden konnte; (ii) sie führen zu einer verstärkten intrazellulären Anhäufung viraler RNA. Welches Enzym die NS2-3-Spaltung katalysiert war bislang unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BVDV NS2 die Funktion einer Cystein-Autoprotease besitzt, die eine entfernte Verwandtschaft zur NS2-3 Autoprotease der Hepaciviren (Hepatitis-C-Virus, HCV) aufweist und für die Prozessierung von NS2-3 verantwortlich ist. Die Funktion der NS2-Protease erwies sich als essentiell für die RNA-Replikation von cp und auch noncp BVDV. Freies NS3, das von dieser Protease generiert wird, spielt daher offenbar eine essentielle Rolle bei der pestiviralen RNA-Replikation und kann in dieser Funktion nicht durch sein Vorläufer-Protein NS2-3 ersetzt werden. Diese Beobachtung führte zur erneuten Suche nach NS3 in noncp BVDV-infizierten Zellen. Tatsächlich konnte, entgegen allen bisherigen Untersuchungen, freies NS3 auch in diesen Zellen nachgewiesen werden. Die Expression des Proteins erfolgt in noncp BVDV-infizierten Zellen allerdings zeitlich reguliert: Im Gegensatz zu cp BVDV-

Zusammenfassung

infizierten Zellen konnte NS3 hier nur zu sehr frühen Zeitpunkten nach der Infektion nachgewiesen werden. Die Syntheserate der viralen RNA korrelierte mit den verschiedenen NS3-Mengen in noncp und cp BVDV-infizierten Zellen. Die unterschiedliche Aktivität der NS2-Protease kontrolliert über die Effizienz der NS3-Generierung also indirekt die RNA-Replikation und beeinflusst damit alle Parameter, die noncp und cp BVD-Viren voneinander unterscheiden: Eine stark herunterregulierte Aktivität der Protease mit geringen NS3-Syntheseraten korreliert mit dem noncp Biotyp und der Fähigkeit des Virus, persistente Infektionen auszulösen; eine hohe Aktivität mit großen NS3 Mengen hingegen korreliert mit dem cp Biotyp und dem Auftreten der tödlichen Krankheit MD.

Ein zelluläres Protein aus der Klasse der J-Domänen-Chaperone (Jiv) ist in der Lage, die Prozessierung von NS2-3 zu stimulieren. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Mechanismus dieses Vorgangs aufgeklärt werden. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge bindet ein 20 Aminosäuren langes Peptid des Jiv-Proteins stabil an zwei verschiedene Stellen im pestiviralen NS2. Zur Induktion der NS2-3-Spaltung werden hingegen 75 Aminosäuren von Jiv benötigt. Dabei ist die Identität von nur einer dieser Aminosäuren für die Stimulierung der Protease essentiell. Es ist daher davon auszugehen, dass Jiv keine eigene proteolytische Funktion besitzt, sondern als Kofaktor der NS2-Protease fungiert. Die Interaktion von Jiv mit den beiden Bindungsstellen im NS2 führt vermutlich zu einer Umfaltung und damit zur Aktivierung der NS2-Protease.

Aktuelle und zukünftige Untersuchungen haben zum Ziel, den Mechanismus der zeitlichen Regulierung der NS2-Proteaseaktivität in noncp BVDV-infizierten Zellen aufzuklären. Das Jiv-Protein ist hierzu der bisher aussichtsreichste Kandidat, da Jiv einerseits Kofaktor der NS2-Protease ist, in Wirtszellen aber nur in stark begrenzten Mengen vorkommt.

4 Einleitung

4.1 Die Familie *Flaviviridae*

In der biologischen Systematik hat es sich bewährt, verwandte Spezies in Genera und verwandte Genera in Familien einzuordnen. Ein Hauptkriterium für die systematische Einteilung von Viren ist die Art des viralen Genoms. Dieses kann aus DNA oder RNA bestehen und es kann sich um einzel- oder doppelsträngige Erbsubstanz handeln; bei einzelsträngigen RNA-Viren kann die Polarität der RNA positiv (entspricht der Polarität zellulärer messenger-RNA) oder negativ sein. Die Mitglieder der Familie *Flaviviridae* sind Einzelstrang-RNA-Viren mit positiver RNA-Polarität (Heinz et al., 2000). Drei verschiedene Genera sind in dieser Familie vereint (siehe auch Abb. A1): Das Genus *Flavivirus* mit dem Prototyp Gelbfiebervirus, das Genus *Hepacivirus* mit dem einzigen und sehr bedeutenden Vertreter Hepatitis-C-Virus und das Genus *Pestivirus*, auf das unten noch genauer eingegangen wird. Außerdem gehören der Familie auch die bisher noch keinem Genus zugeordneten so genannten GB-Viren (GBV-A, GBV-B, GBV-C) an (Heinz et al., 2000; Leary et al., 1996; Muerhoff et al., 1995; Simons et al., 1995). Obwohl GBV-C-Infektionen beim Menschen sehr häufig vorkommen, konnte

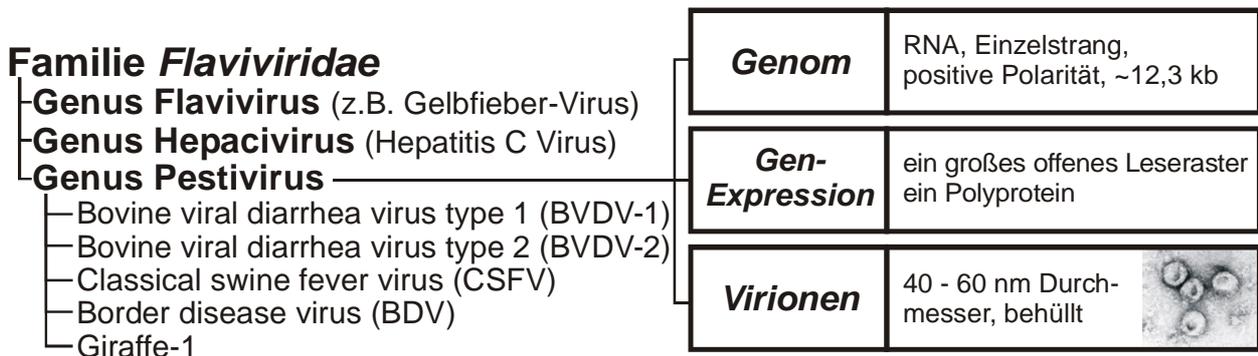


Abbildung A1: Einordnung und einige Charakteristika von Pestiviren

BVDV ist ein Mitglied des Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae*. Das einzelsträngige RNA-Genom hat messenger-RNA Polarität und ein langes offenes Leseraster. Die viralen Proteine entstehen aus einem Polyprotein-Vorläufer. Die Virionen sind behüllt. Das Bild rechts zeigt eine elektronenmikroskopische Darstellung von CSFV-Virionen (Quelle: M. König, Institut für Virologie, JLU Gießen)

Einleitung

bisher noch kein Zusammenhang mit einer Erkrankung gefunden werden; da auch keine Korrelation zur Ausbildung einer akuten oder chronischen Hepatitis besteht, wird GBV-C heute nicht mehr als Hepatitis-G-Virus (HGV) bezeichnet. GBV-C repliziert in Lymphozyten und Infektionen mit diesem Virus sind bei HIV-Infizierten besonders häufig und mit einer deutlich verlängerten Überlebenszeit assoziiert (Stapleton, 2003; Williams et al., 2004).

Alle Mitglieder dieser Virusfamilie haben einige gemeinsame Eigenschaften (Meyers and Thiel, 1996):

- Das Genom ist eine einzelsträngige RNA mit positiver Polarität und in der Regel zwischen 9,0 und 12,5 kb lang.
- Die genomische RNA kodiert in einem einzelnen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) ein Polyprotein, welches während und nach der Translation von zelleigenen und viralen Proteasen in die reifen Proteine zerlegt wird.
- Die genomischen Lokalisationen sowie die Funktionen vieler Struktur- und Nichtstrukturproteine sind ähnlich.
- Die Virionen sind in Größe und Zusammensetzung vergleichbar; sie bestehen neben der RNA aus einem Nukleokapsidprotein und zwei bis drei membranständigen Glykoproteinen.

4.2 Das Genus Pestivirus

Pestiviren sind die engsten Verwandten des humanen Hepatitis-C-Virus (HCV) und der GB-Viren (Lindenbach and Rice, 2001). Da, im Gegensatz zur Situation bei Pestiviren, bisher noch kein Zellkultursystem für HCV existiert, welches eine effiziente Virusvermehrung erlaubt, werden Pestiviren häufig als Modellsystem für HCV genutzt.

Zum Genus der Pestiviren gehören gegenwärtig fünf Spezies (Avalos-Ramirez et al., 2001; Heinz et al., 2000):

- das Virus der klassischen Schweinepest (classical swine fever virus,

Einleitung

CSFV)

- das Virus der Border Disease der Schafe (border disease virus, BDV)
- das Virus der Bovinen Virusdiarrhö Typ 1 (bovine viral diarrhoea virus, BVDV type 1)
- das Virus der Bovinen Virusdiarrhö Typ 2 (bovine viral diarrhoea virus, BVDV type 2)
- das Virus Giraffe-1

Krankheiten, die durch Pestiviren ausgelöst werden, betreffen Schweine und mehrere Wiederkäuerarten, wie Rinder, Schafe, Ziegen, sowie Wildwiederkäuer. Während unter natürlichen Bedingungen die CSFV-Infektion nur in Schweinen nachgewiesen werden konnte, ist das Wirtsspektrum von BVDV und BDV weniger stringent. So gelang beispielsweise der Nachweis von BVDV in Schafen, Ziegen, Hirschen, Giraffen, Antilopen, Rentieren, Bisons und Büffeln (Becher et al., 1999; Becher et al., 1997; Hamblin and Hedger, 1979; Nettleton, 1990).

Es wird noch diskutiert, ob zwei Pestivirusisolate „Reindeer-1“ und „Bison“ eine weitere Subgruppe von BDV bilden oder jeweils als eine neue Spezies anzusehen sind (Becher et al., 1999). Neuere Sequenzvergleiche und serologische Untersuchungen unterstützen die Klassifizierung als eigenständige Spezies (Avalos-Ramirez et al., 2001).

Als Erreger von Tierkrankheiten spielen Pestiviren eine sehr wichtige Rolle. Infolge der EU-weiten aufwendigen staatlichen Bekämpfungsmaßnahmen steigen die Kosten bei Schweinepest-Seuchenzügen schnell in Milliardenhöhe. BVDV verursacht in erster Linie durch Reproduktionsstörungen erhebliche Schäden in der Rinderhaltung. Während die staatliche Bekämpfung der Schweinepest EU-weit obligat ist, sind solche gesetzlichen Bekämpfungsmaßnahmen gegen BVDV zurzeit in der Vorbereitung.

Einleitung

Die klassische Schweinepest (CSF) war die erste durch Pestiviren ausgelöste beschriebene Erkrankung (Ohio, 1833). Die bovine Virusdiarrhö (BVD) und die Mucosal Disease (MD), beide sind Rinderkrankheiten und werden durch BVDV ausgelöst, fanden hingegen erst in den 40er und 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts als Tierkrankheiten Erwähnung (Baker et al., 1954). Gleiches gilt auch für die Border Disease der Schafe (BD). Die antigenetische Verwandtschaft zwischen CSFV und BVDV wurde 1960 erstmals beschrieben (Darbyshire, 1960). Wenngleich Pestiviren virologisch sehr interessante und auch wirtschaftlich sehr bedeutsame Krankheiten verursachen, machte ihre Erforschung zunächst nur langsame Fortschritte. Erst mit dem Einzug molekularbiologischer Methoden in die virologischen Laboratorien änderte sich dieser Zustand. Die Klonierung und Sequenzierung ganzer pestiviraler Genome, die gezielte Expression von Abschnitten des Polyproteins und die Herstellung spezifischer Antikörper gegen Virusproteine trugen zur Aufklärung der Genomorganisation, Polyproteinprozessierung, Zusammensetzung der Virionen und der Verwandtschaftsgrade der Mitglieder des Genus untereinander bei. Auf dieser Grundlage werden die Pestiviren heute der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet (Heinz et al., 2000), nachdem sie ursprünglich zu den *Togaviridae* (Westaway et al., 1985) gezählt worden waren.

Eine charakteristische Eigenschaft der Pestiviren ist das Auftreten zweier so genannter Biotypen, die man aufgrund der von ihnen ausgelösten morphologischen Veränderungen nach Infektion von Zellen in Gewebekultur unterscheidet (Baker, 1987; Lindenbach and Rice, 2001). Man differenziert auf diese Weise nichtzytopathogene (noncp) und zytopathogene (cp) Viren. Erstere verursachen in infizierten Gewebekulturen keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen, während letztere über Induktion der Apoptose zum Absterben der Zellen und damit zu einem sichtbaren zytopathischen Effekt führen (Corapi et al., 1988; Hoff and Donis, 1997;

Einleitung

Lambot et al., 1998; Pocock et al., 1987; Purchio et al., 1984; Schweizer and Peterhans, 2001; Vassilev and Donis, 2000; Zhang et al., 1996). Auf die molekularen Grundlagen des Auftretens und die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Biotypen wird im Weiteren noch ausführlich eingegangen werden.

Alle Pestiviren können die Plazentaschranke überwinden und den Embryo oder Fetus tragender Wirtstiere infizieren (Moennig and Plagemann, 1992; Thiel et al., 1996). Gleichzeitig können aber Antikörper des Muttertieres diese Barriere, im Gegensatz zur Situation zum Beispiel beim Menschen, auf Grund der Eigenheiten des Aufbaus der Plazenta bei Wiederkäuern und Schweinen, nicht überwinden. Der Zeitpunkt der Infektion des Fetus während der Trächtigkeit bestimmt zugleich die Folgen. Fruchtresorptionen, Aborte, Totgeburten, Missbildungen (v.a. Kleinhirnhypoplasien), aber auch die Geburt lebensschwacher oder gesunder Tiere sind hierbei möglich. Letztere können geboren werden, wenn die Infektion zu einem sehr späten Zeitpunkt erfolgt ist und das schon weitgehend ausgereifte Immunsystem das Virus eliminieren konnte. Erfolgt die Infektion mit einem nichtzytopathogenen Virus allerdings zu einem früheren Zeitpunkt (erstes Trimester der Trächtigkeit, bis etwa zum 120. Tag), zu dem sich das Immunsystem des Fetus noch in der Prägephase befindet, kann sich eine erworbene Immuntoleranz entwickeln. Sie entsteht, da im Rahmen der „thymic education“ alle gegen das persistierende Virus gerichteten T- und B-Zellen eliminiert werden; das antigenetische Profil des Virus wird als körpereigen angesehen und das Immunsystem wird daher zeitlebens auf das persistierende Virus nicht reagieren, also weder Antikörper noch T-Zellen gegen dessen Antigene produzieren. Diese Immuntoleranz ist sehr spezifisch und betrifft daher nur das persistierende Virus oder antigenetisch sehr eng verwandte Virusstämme. Das betroffene Tier bleibt lebenslang persistent infiziert und scheidet ständig große Mengen infektiöse Virionen aus (PI-Tiere). Solche persistent infizierten Tiere spielen die

Einleitung

entscheidende Rolle in der Epidemiologie der zugehörigen Krankheiten, vor allem bei der BVD; sie sind die Hauptquelle für neue Ansteckungen. Aufgrund ihrer enormen Bedeutung für die Verbreitung der Viren sind die PI-Tiere auch das Hauptziel bei der Bekämpfung der Krankheiten. Leider können diese Tiere in den ersten Wochen und Monaten nach der Aufnahme von gegen BVDV gerichteten Antikörpern über das Kolostrum aufgrund der hierdurch verringerten Viruslast im Blut nicht immer sicher diagnostiziert werden. Diese „diagnostische Lücke“ erhöht, ebenso wie zugekaufte trächtige Tiere, die ein PI-Tier austragen („Trojanische Kühe“), das Risiko für bisher nicht betroffene Tierbestände. Bei Wiederkäuern können persistierende Infektionen mit einem Kümmern der Tiere einhergehen oder klinisch weitgehend inapparent verlaufen, wobei die Tiere mehrere Jahre alt werden können. Persistente Infektionen bei Schweinen gehen mit einer deutlicheren klinischen Symptomatik einher und die betroffene Tiere überleben höchstens einige Monate (Meyers and Thiel, 1996).

Im Gegensatz zu den diaplazentaren Infektionen verlaufen Infektionen von Wiederkäuern nach der Geburt mit BVDV oder BDV meist mild oder völlig symptomfrei. Eine wichtige Ausnahme bilden nur die Infektionen mit besonders virulenten Isolaten, vorwiegend vom BVDV Typ 2, die zum so genannten „hämorrhagischen Syndrom“ führen können. Horizontale Infektionen von Schweinen mit CSFV gehen ebenfalls meist mit deutlichen Symptomen einher, auch wenn im Laufe der Jahrzehnte immer mildere Verlaufsformen beobachtet wurden (Meyers and Thiel, 1996). Die Schweinepest war im 19. Jahrhundert besonders wegen ihrer perakuten Verlaufsform mit kurzer Inkubationszeit und hoher Sterblichkeitsrate gefürchtet; heute gibt es in Westeuropa keine perakuten Verläufe mehr und auch die akute Form verursacht nur noch selten Todesfälle. Chronische Verlaufsformen dominieren hingegen das Geschehen (van Oirschot, 1992; Wensvoort and Terpstra, 1985) und erschweren die staatlichen

Einleitung

Bekämpfungsmaßnahmen. „Typische“ Schweinepestfälle sind durch Leukopenie, hohes Fieber und Blutungen in der Haut und in inneren Organen gekennzeichnet. Je nach Verlaufsform kann man CSFV-Stämme mit hoher, moderater, geringer und nicht vorhandener Virulenz unterscheiden (Meyers and Thiel, 1996).

Infektionen mit Pestiviren führen in der Zellkultur nur zu moderaten Titern; Virionen werden von infizierten Zellen nur teilweise in den Überstand abgegeben und assoziieren häufig mit Bestandteilen von Serum und Zellen, was eine Aufreinigung und elektronenmikroskopische Darstellung der Partikel erheblich erschwert (Laude, 1977). In konzentrierten Virussuspensionen konnten behüllte Partikel mit Durchmessern zwischen 40 und 60 nm elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Horzinek et al., 1971; Moennig and Plagemann, 1992). Die gereinigten Virionen bestehen aus RNA, dem Kapsidprotein Core und einer Membran-Hülle, in die drei virale Glykoproteine (E-Proteine = „envelope“-Proteine) eingelagert sind (Thiel et al., 1991), von denen E^{ms} und E2 durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen auf der Oberfläche der Virionen nachgewiesen werden konnten (Weiland et al., 1992; Weiland et al., 1990). Die Virionen reifen aller Wahrscheinlichkeit nach an intrazellulären Membranen und werden über Exozytose virusbeladener Membranvesikel aus den Zellen freigesetzt (Bielefeldt Ohmann, 1988; Bielefeldt Ohmann, 1988; Bielefeldt Ohmann et al., 1987; Gray and Nettleton, 1987). Beim Eintritt von BVD-Virionen in Zellen fungiert das Zelloberflächenprotein CD46 als Rezeptor (Maurer et al., 2004).

4.3 Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease

Die BVD/MD verursacht weltweit große wirtschaftliche Verluste in der Rinderhaltung und ist in Deutschland eine meldepflichtige Tierseuche. Serologische Untersuchungen von Rindern konnten zeigen, dass die Mehrzahl aller Tiere im Laufe ihres Lebens Kontakt mit BVDV hatten (Meyers

Einleitung

and Thiel, 1996). Epidemiologischen Untersuchungen zufolge sind in Bayern in fast 80 % aller Bestandmilchproben Antikörper gegen BVDV nachweisbar und in Deutschland, je nach Region, 0,2 bis 2 % aller Rinder persistent mit BVDV infiziert (Quelle: Landestierärztekammer Bayern).

Akute horizontale Infektionen mit BVDV Typ 1 können, je nach Virulenz des Stammes und Gesundheitszustand des Rindes, subklinisch verlaufen oder auch mit Leukopenie, Thrombozytopenie, Fieber, leichtem Durchfall, respiratorischer Symptomatik oder Immunsuppression einhergehen (Baker, 1987; Liess, 1967; Potgieter et al., 1985). Zumeist werden solche Infektionen vom Landwirt oder betreuendem Tierarzt jedoch nicht bemerkt (Thiel et al., 1996). Für wirtschaftliche Schäden ist in erster Linie die Infektion gravider, BVDV-Antikörper negativer Tiere verantwortlich, wobei Aborte, Missbildungen oder die Geburt persistent infizierter Nachkommen die größte Rolle spielen. In seltenen Fällen, wie bei einem Seuchenzug zwischen 1993 und 1995 in Kanada und den USA, treten hochvirulente Stämme auf, die Erkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität, vor allem bei Kälbern, auslösen. Solche Infektionen gehen mit schweren Thrombozytopenien einher, die zu petechialen und ekchymösen Haemorrhagien in Schleimhäuten und diversen inneren Organen führen (Rebhuhn et al., 1989), ähnlich denen bei Schweinen nach CSFV Infektion (Carman et al., 1998; Corapi et al., 1990; Corapi et al., 1989; Pellerin et al., 1995; Pellerin et al., 1994; Rebhuhn et al., 1989; Ridpath et al., 1994). Dieses als „Hämorrhagisches Syndrom (HS)“ bezeichnete Krankheitsbild wurde fast ausschließlich nach BVDV-Typ-2-Infektionen beschrieben und trat in den letzten Jahren auch vereinzelt in Deutschland auf. Es bleibt allerdings festzuhalten, dass viele BVDV-Typ-2-Isolate nicht in der Lage sind, das HS auszulösen.

Die Mucosal Disease (MD) der Rinder ist eine sporadisch auftretende Erkrankung; sie wird meist im Alter zwischen sechs Monaten und zwei Jahren

Einleitung

klinisch manifest und endet immer, meist innerhalb von 2 Wochen nach dem Auftreten der ersten Anzeichen, tödlich (Baker, 1987). Typisch für diese Erkrankung sind Geschwüre im Gastrointestinaltrakt (Baker, 1987; Moennig and Plagemann, 1992), die zu starkem, blutigem Durchfall und der Depletion des lymphoretikulären Gewebes, unter anderem der Peyerschen Platten, führen. Auffällige Läsionen und Ulzerationen finden sich auch an den sichtbaren Schleimhäuten des Körpers und an der Haut im Zwischenklauenbereich und am Kronsaum.

Die Pathogenese der MD ist komplex und einzigartig in Human- und Veterinärmedizin (siehe auch Abb. A2). Die persistierende Infektion mit einem noncp BVDV-Stamm ist stets Voraussetzung (s.o.) für die Entstehung der MD (Liess et al., 1974). Nur die nichtzytopathogenen Stämme von BVDV sind in der Lage solche persistierenden Infektionen auszulösen. Der große Durchbruch auf dem Weg zum Verständnis der Pathogenese der MD gelang mit dem Befund, dass aus an MD verendeten Tieren immer zwei Virustypen, ein so genanntes Viruspaar, isoliert werden können (Brownlie et al., 1984; McClurkin et al., 1985; McKercher et al., 1968; Wilhelmsen et al., 1991). Ein Partner ist hierbei das persistierende nichtzytopathogene Virus. Der zweite Partner ist ein zytopathogenes Virus, antigenetisch gleich oder eng verwandt mit dem noncp Virus (Corapi et al., 1988; Pocock et al., 1987). Diese Verwandtschaft steht ganz im Gegensatz zu der großen Variabilität der Feldisolate von BVDV; daher lag die Vermutung nahe, dass sich das cp Virus aus dem noncp Virus durch Mutation im infizierten Einzeltier entwickelt (Bolin et al., 1988; Brownlie et al., 1984; Corapi et al., 1988; Howard et al., 1987). Durch gezielte Superinfektion eines persistent infizierten Tieres mit einem cp BVDV Isolat kann die MD auch experimentell ausgelöst werden, sofern die antigenetische Verwandtschaft mit dem persistierenden noncp Virus eng genug ist (Bolin et al., 1985; Brownlie et al., 1984; Moennig et al., 1990). Auffälligerweise replizieren die cp Viren besonders gut in solchen

Einleitung

Gewebearten, die bei der MD am stärksten in Mitleidenschaft gezogen werden, zum Beispiel im lymphoretikulären Gewebe des Magen-Darm-Traktes (Liebler et al., 1991), während sich die noncp Viren praktisch in allen Geweben des infizierten Tieres finden.

Eine Variante der MD ist die so genannte „late onset“ („später Ausbruch“) Form; betroffene Tiere sterben nicht innerhalb von 14 Tagen, sondern entwickeln eine eher chronische Verlaufsform der MD über mehrere Monate hinweg. Ursache ist die horizontale Superinfektion persistent infizierter Tiere mit einem cp BVDV-Stamm, der antigenetisch weniger eng mit dem „endogenen“ noncp Stamm verwandt ist und daher vom Immunsystem nicht völlig toleriert wird. Durch die begrenzte antigenetische Homologie der beiden Viren reagiert das Immunsystem des Wirtes in reduzierter Intensität auf den cp Stamm; so wird der Verlauf der Erkrankung hinausgezögert (Fritzemeier et al., 1995; Moennig et al., 1993; Ridpath and Bolin, 1995). Durch RNA-Rekombinationen zwischen cp Stamm und dem persistierenden noncp Stamm können jedoch zytopathogene Viren entstehen, die vom Immunsystem toleriert werden. Daher endet auch diese verzögerte Form mit dem klinischen Vollbild der MD und führt stets zum Tod des betroffenen Tieres.

Die Immunisierung von persistent infizierten Tieren mit einem Lebendimpfstoff, der cp BVD-Viren enthält, kann ebenfalls zur einer „late onset MD“ führen; auch hier zeigte sich, dass es im geimpften Tier zu einer RNA-Rekombination zwischen dem persistierenden noncp Virus und dem cp Virus des Impfstoffes gekommen war (Becher et al., 2001). Die RNA-Rekombination hat zur Folge, dass das neu entstehende cp Virus die für die Immuntoleranz des Wirtes entscheidenden antigenen Determinanten des noncp Virus trägt (Becher et al., 2001; Ridpath and Bolin, 1995).

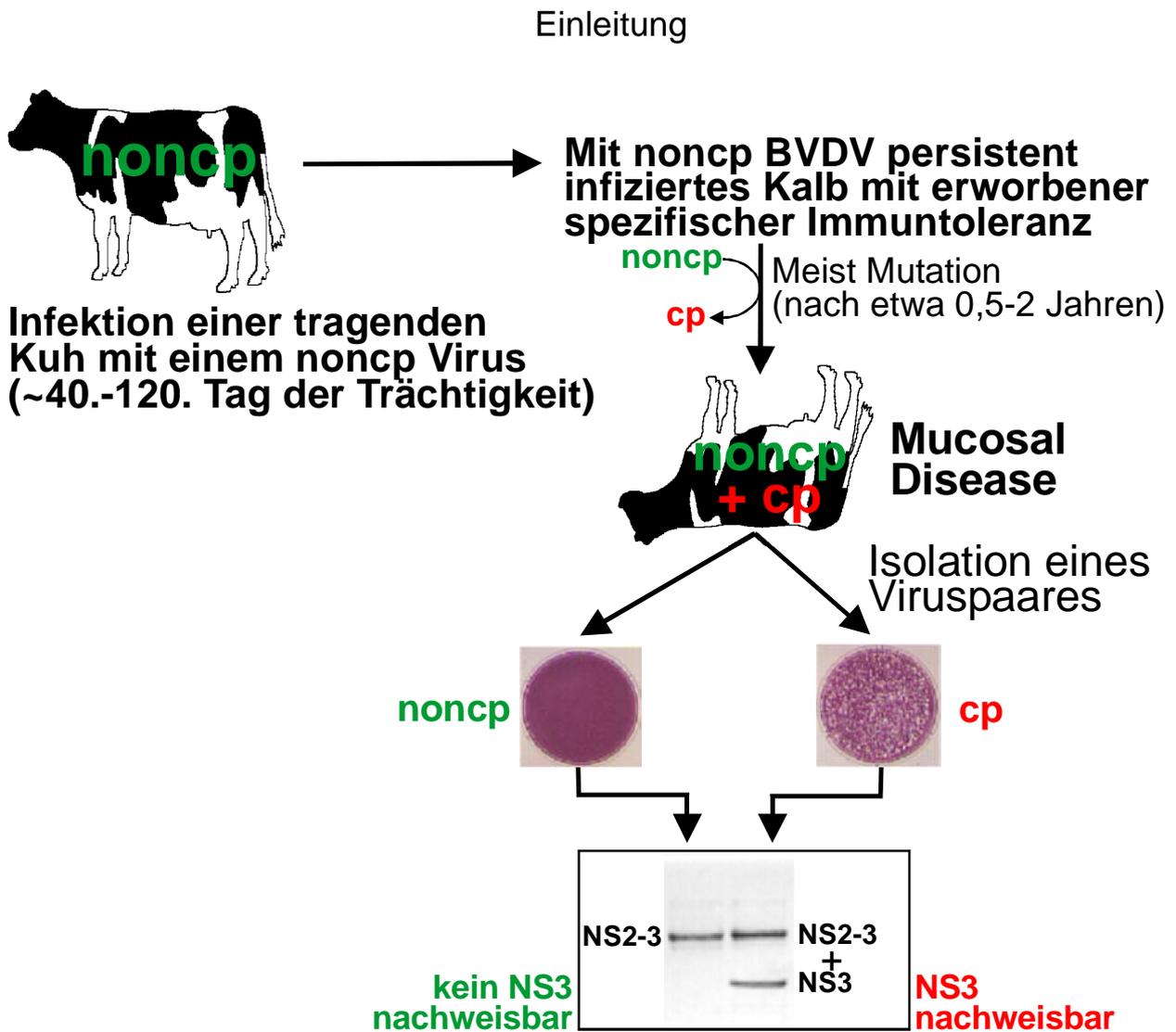


Abbildung A2: Pathogenese der Mucosal Disease (MD)

Voraussetzung für die Entstehung der MD ist die Infektion eines Rinderfetus mit einem nichtzytopathogenen (noncp) BVDV. Der Fetus entwickelt eine spezifische Immuntoleranz gegen das infizierende Virus. Das Kalb ist dann lebenslang persistent infiziert, scheidet ständig große Virusmengen aus und spielt bei der Verbreitung des Virus die entscheidende Rolle. Durch Mutation im Einzeltier entsteht, meist im Verlauf der ersten beiden Lebensjahre, ein antigenetisch weitgehend identisches zytopathogenes (cp) Virus, das die stets tödliche Mucosal Disease auslöst. Aus Tieren, die an MD verenden, kann immer ein Viruspaar isoliert werden: Das persistierende noncp Virus und ein cp Virus, das meist aus dem noncp Virus entstanden ist. Auf Proteinebene unterscheiden sich diese beiden Biotypen durch die Bildung von NS3: in den mit noncp BVDV infizierten Zellen kann nur ungespaltenes NS2-3, in den mit cp BVDV infizierten Zellen auch freies NS3 gefunden werden.

4.4 Genom und Proteine der Pestiviren

4.4.1 Genom und Polyprotein

Das RNA-Genom der Pestiviren setzt sich aus einer 5'-nichtkodierenden Region (untranslated region, UTR), einem einzelnen langen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) und einer 3'-nichtkodierenden Region zusammen (Collett et al., 1988; Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990). Das Genom der Pestiviren - eine RNA positiver Polarität - ist etwa 12,3 Kilobasen (kb) groß (Becher et al., 1998; Collett et al., 1988; Deng and Brock, 1992; Meyers et al., 1989; Renard et al., 1987; Ridpath and Bolin, 1995; Ridpath and Bolin, 1997). Aufgrund von Duplikationen viraler und/oder Insertionen zellulärer Sequenzen erreicht das Genom bei einigen cp BVDV-Isolaten eine Größe von bis zu 16,5 kb (Meyers and Thiel, 1996). Die virale RNA zeichnet sich weder durch eine 5'-cap-Struktur (5' 7-Methyl-Guanosin) noch durch eine Polyadenylierung am 3'-Ende aus und unterscheidet sich damit in ihrem Aufbau grundlegend von zellulären messenger-RNAs (mRNA) eukaryontischer Zellen. Die Initiation der Translation wird, ähnlich wie bei den Picornaviren, cap-unabhängig durch eine direkte interne Ribosomenbindung an die 5'-UTR des viralen Genoms bewerkstelligt; die 5'-UTR und der Anfang der kodierenden Region enthalten für diesen Zweck eine besonders gefaltete RNA-Sekundärstruktur mit zahlreichen AUG-Triplets oberhalb des eigentlichen Start-AUG, eine so genannte IRES (internal ribosomal entry site) (Chon et al., 1998; Frolov et al., 1998; Myers et al., 2001; Poole et al., 1995; Rice, 1996; Rijnbrand et al., 1997; Tautz et al., 1999; Yu et al., 2000). Somit unterscheiden sich Pestiviren und das Hepatitis-C-Virus bezüglich Initiation der Translation fundamental von klassischen Flaviviren, deren Translation durch die „Cap“-Struktur am 5'-Terminus vermittelt wird (Poole et al., 1995; Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Auch für die 3'-UTR konnte die Ausbildung einer charakteristischen Sekundärstruktur nachgewiesen werden, die eine cis-aktive, essentielle Funktion für die Replikation besitzt (Yu et al., 1999).

Einleitung

Die virale RNA steht nach dem Eindringen in das Zytoplasma der Zelle direkt als Matrize für die Proteinsynthese (mRNA) zur Verfügung. Die gesamte virale Replikation läuft im Zytoplasma der Wirtszelle ab. Der offene Leserahmen kodiert für ein Polyprotein mit einer Länge von etwa 4000 Aminosäuren (AS). Die Proteinexpression über ein oder mehrere Polyproteine als Vorläufer ist typisch für alle Vertreter der positiv-Strang-RNA-Viren (Kräusslich and Wimmer, 1988).

Aus dem Polyprotein entstehen durch Prozessierungsschritte, katalysiert von zellulären und viruskodierten Proteasen, schließlich zwölf reife virale Proteine. Eine Übersicht zum Aufbau und zur Prozessierung des Polyproteins gibt die Abb. A3. Die autokatalytische Aktivität der N-terminalen Protease N^{pro} ist der erste Schritt der pestiviralen Proteinbiogenese nach Beginn der Translation der genomischen RNA; N^{pro} löst sich durch Spaltung zwischen Cys₁₆₈ und Ser₁₆₉ selbst vom Rest des Polyproteins ab und erzeugt damit gleichzeitig den N-Terminus des Kapsidproteins Core (C) (Stark et al., 1993; Wiskerchen et al., 1991). N^{pro} als Leader-Protease am N-Terminus des

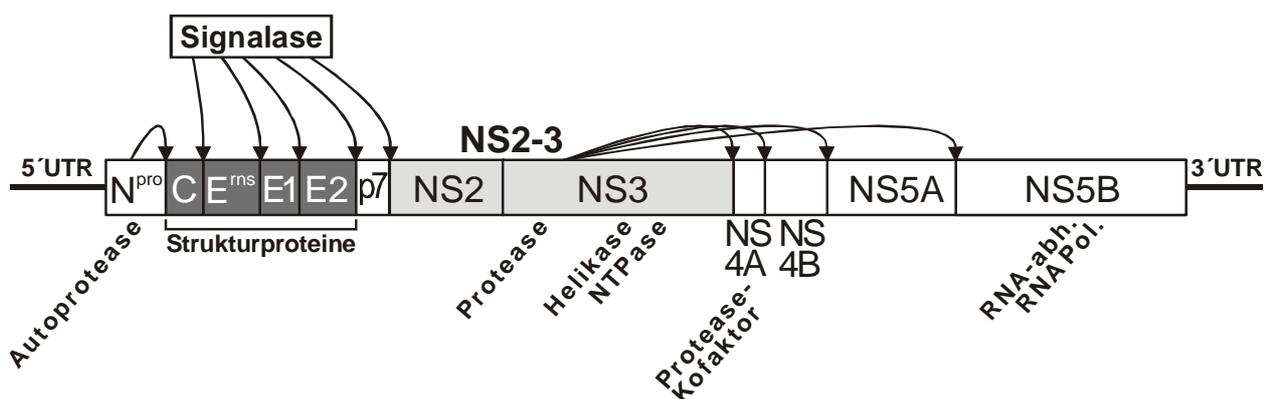


Abbildung A3: Genomorganisation von BVDV

Das Genom der Pestiviren ist eine einzelsträngige RNA positiver Polarität mit einem offenen Leserahmen (ORF), welcher am 5'- und am 3'- Ende von nichttranslatierten Regionen (UTRs) flankiert wird. Das Genom kodiert für 4 virale Strukturproteine (Core (C), E^{ns} , E1 und E2) und 8 Nichtstrukturproteine (N^{pro} , p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B). Soweit Funktionen dieser Proteine bekannt sind, sind sie in der Abbildung entsprechend angegeben. N^{pro} ist eine Autoprotease, spaltet sich selbst vom Polyprotein ab und generiert dabei den N-Terminus des Core-Proteins. Das zelluläre Enzym Signalase spaltet das Polyprotein im Bereich zwischen Core und NS2. Alle Spaltungen C-terminal von NS3 werden von der NS3-Protease bewerkstelligt; sie benötigt hierzu den Kofaktor NS4A. Welches Enzym die Spaltung von NS2-3 in NS2 und NS3 katalysiert, ist bislang unbekannt.

Polyproteins existiert nur bei Pestiviren und nicht bei Vertretern der anderen beiden Genera in der Familie *Flaviviridae*. Mutagenesestudien haben nahe gelegt, dass N^{pro} ein Vertreter der Subtilisin-ähnlichen Proteasen ist (Rümenapf et al., 1998). N^{pro} wird für die Virus-Replikation von CSFV im Zellkultur-System nicht benötigt (Tratschin et al., 1998).

4.4.2 Virale Strukturproteine

Eine Signalsequenz direkt vor E^{rns} führt zur Translokation des nachfolgenden Proteinabschnittes in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Core wird am C-Terminus durch die zelleigene Signalase vom Polyprotein befreit. Die viralen Struktur-Glykoproteine E^{rns}, E1 und E2, und das hydrophobe Nichtstrukturprotein p7 werden ebenfalls durch die Signalase freigesetzt (Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000; Lin et al., 1994; Rümenapf et al., 1993). Die Spaltung zwischen E2 und p7 ist, wie auch bei HCV, unvollständig; daher lässt sich in infizierten Zellen auch ein E2-p7 Fusionsprotein finden; es handelt sich hierbei um eine stabile Proteinspezies und nicht um einen Vorläufer für E2 und p7 (Harada et al., 2000). Eine Unterbindung der E2-p7 Spaltung führt zum Verlust der Bildung infektiöser Virionen; eine vollständige Spaltung in E2 und p7 resultiert in einer Titer-Reduktion um den Faktor 10; RNA-Replikation ist in beiden Fällen jedoch möglich (Harada et al., 2000).

Für E1 und E2 konnten Strukturen identifiziert werden, die für eine Membranverankerung verantwortlich sind (Rümenapf et al., 1993; van Zijl et al., 1991). Der Mechanismus der Membranassoziation von E^{rns} ist dagegen weiterhin unklar. Alle drei Glykoproteine können über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander wechselwirken: E^{rns} Homodimere, E1/E2 Heterodimere und E2 Homodimere können sowohl in infizierten Zellen als auch in Virionen gefunden werden (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990).

Das essentielle Strukturprotein E^{rns} (E = „envelope“; rns = „ribonuclease

Einleitung

secreted“) ist über nicht kovalente Bindung in die Virushülle eingelagert, wird aber auch aktiv von infizierten Zellen sezerniert (Rümenapf et al., 1991; Rümenapf et al., 1993; Thiel et al., 1991). In beiden Formen ist E^{ns} ribonukleolytisch aktiv (Hulst et al., 1993; Schneider et al., 1993; Windisch et al., 1996) und vereint als virales Hüllprotein damit Eigenschaften in einer bislang einzigartigen Kombination. Die Ribonuklease ist vermutlich ein Virulenzfaktor, da gezeigt wurde, dass die Inaktivierung der RNase-Funktion zu Attenuierung von CSFV und BVDV-2 führt (Meyer et al., 2002; Meyers et al., 1999). In Abhängigkeit vom zellulären Kompartiment besitzt E^{ns} aufgrund von unterschiedlichen Glykosylierungsgraden ein apparentes Molekulargewicht von 44 kDa und 60 kDa (Thiel et al., 1991), während das kalkulierte Molekulargewicht nur 25,7 kDa beträgt. E^{ns} bindet an Glykosaminoglykane, wie sie an Zelloberflächen von eukaryontischen Zellen vorkommen (Hulst and Moormann, 2001; Iqbal et al., 2000) und besitzt im C-terminalen Abschnitt eine membranaktive Sequenz, welche eine energieunabhängige Aufnahme von E^{ns} in Zellen erlaubt (Langedijk, 2002). Neuesten Untersuchungen zufolge fungiert BVDV-E^{ns} als Inhibitor der Interferon-Antwort der Zellen, die beispielsweise durch den Kontakt mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) hervorgerufen wird, welche als Intermediärprodukt bei der Replikation von Pestiviren im Zytoplasma entsteht. Dieser inhibitorische Effekt kann sowohl durch gezielte Expression in Zellen als auch durch die einfache Zugabe von gereinigtem E^{ns} zum Zellkulturüberstand erreicht werden (Iqbal et al., 2004). E^{ns} besitzt die Fähigkeit, doppelsträngige RNA zu binden und, bei niedrigem pH-Wert, auch abzubauen. Beide Fähigkeiten werden benötigt, um die Zellantwort auf dsRNA zu verhindern (Iqbal et al., 2004): Die Produktion von alpha/beta Interferon, induziert durch dsRNA, dient der Zelle als Abwehrmechanismus gegen Virusinfektionen; das virale Glykoprotein E^{ns} unterdrückt demzufolge diesen unspezifischen zellulären Verteidigungsmechanismus.

Einleitung

E2 ist für die Bindung der Virionen an den zellulären Rezeptor CD46 verantwortlich (Maurer et al., 2004); die meisten Virus-neutralisierenden Antikörper sind gegen Epitope aus dem E2 gerichtet.

4.4.3 Virale Nichtstrukturproteine

Die 3'-terminalen zwei Drittel des ORF kodieren ausschließlich für Nichtstrukturproteine. Das erste dieser Proteine ist das 7 kDa kleine hydrophobe p7, das strukturelle Homologien zur Proteinfamilie der Viroporine zeigt. Dabei handelt es sich um virale Peptide, denen eine entscheidende Bedeutung bei der Reifung von Virionen zukommt; sie bilden durch Oligomerisierung in der Membran Kationenkanäle und führen auf diese Weise zur Membrandestabilisierung (Carrasco, 1995; Harada et al., 2000). Zu dieser Proteinfamilie gehören beispielsweise das Protein 2B des Coxsackievirus (van Kuppeveld et al., 1997), NSP4 des Rotavirus (Tian et al., 1996; Tian et al., 1996), M2 des Influenzavirus (Pinto et al., 1992) und das 6K der Alphaviren (Sanz et al., 1994). Für das p7-Protein von HCV, das - analog zur Situation bei BVDV (Harada et al., 2000) - essentiell für die Bildung infektiöser Virionen ist (Sakai et al., 2003), wurden nach Expression in eukaryontischen Zellen und in Bakterien tatsächlich Hexamere nachgewiesen, die als Ionenkanal für Kationen fungieren und sich zum Beispiel mit Amantadin oder Hexamethylenamilorid blockieren lassen (Griffin et al., 2003; Pavlovic et al., 2003; Premkumar et al., 2004; Sakai et al., 2003). Die Substanz Amantadin inhibiert auch die Funktion von Ionenkanälen des Influenzavirus (Duff and Ashley, 1992; Hay et al., 1985) und ist wirksam gegen HCV in Kombination mit bereits geläufigen Therapeutika (Griffin et al., 2003). Hexamethylenamilorid blockiert Ionenkanäle, die durch das Vpu-Protein von HIV gebildet werden.

Auf p7 folgt im Polyprotein NS2-3, das virale Protein, das im Zentrum dieser Arbeit steht. NS2-3 wird durch eine Signalase-abhängige Spaltung

Einleitung

zwischen p7 und NS2 und einer Spaltung zwischen NS3 und NS4A, die durch die Serinprotease-Aktivität des NS3 vermittelt wird, aus dem Polyprotein freigesetzt und anschließend teilweise weiter zu NS2 und NS3 prozessiert (Collett et al., 1988; Meyers et al., 1991; Meyers et al., 1992). Bemerkenswerter Weise ist die Effizienz dieser NS2-3-Spaltung bei den verschiedenen Pestiviren sehr unterschiedlich (Meyers and Thiel, 1996), und der Mechanismus der NS2-3-Spaltung ist bislang in den meisten Fällen ebenso unbekannt wie die Funktion des NS2. Vom ungespaltenen NS2-3 hingegen ist bekannt, dass es für die Bildung infektiöser Virionen zwingend benötigt wird (Agapov et al., 2004). Bei autonomen replizierenden Virusstämmen ist daher keine vollständige NS2-3-Spaltung zu beobachten. Bei einer vollständigen Prozessierung von NS2-3 entsteht eine Abhängigkeit von einem Helfervirus, das NS2-3 in trans bereitstellt.

Umfang und Art der Prozessierung von BVDV-NS2-3 sind von entscheidender Bedeutung für das Virus und sein Verhalten in infizierten Zellen. Es ist bekannt, dass die Bildung von freiem NS3 mit einer grundlegenden phänotypischen Eigenschaft von Pestiviren korreliert: der Zytotoxizität (Collett et al., 1988; Corapi et al., 1988; Pocock et al., 1987; Purchio et al., 1984). Zytotoxische (cp) Stämme von BVDV zeichnen sich durch das Auftreten von freiem NS3 in großen Mengen (Meyers and Thiel, 1996) und einer gesteigerten viralen RNA-Syntheserate aus (Becher et al., 2001; Mendez et al., 1998; Vassilev and Donis, 2000). NS3 entsteht bei einigen cp BVDV-Stämmen durch Spaltung von NS2-3, es kann aber auch aus duplizierten Genomsequenzen stammen und damit unabhängig von einer NS2-3-Spaltung gebildet werden (s.u.) (Meyers and Thiel, 1996). Ungeachtet seiner Herkunft sind alle BVDV-Stämme, die große Mengen freies NS3 bilden, zytotoxisch und führen zur Apoptose infizierter Zellen. Wie es letztendlich zur Entstehung der zytotoxischen Eigenschaft kommt, ist noch weitgehend unverstanden. Als mögliche Ursache für die Einleitung der

Einleitung

Apoptose kommt eine direkte Wirkung von NS3 in Betracht. Ebenso wäre es möglich, dass die enorm gesteigerte Anhäufung viraler RNA in mit cp BVDV-infizierten Zellen das entscheidende Signal zur Apoptose darstellt. Fest steht, dass die viralen Proteine N^{pro}, C, E^{ns}, E1, E2 und p7 für die Determinierung des viralen Biotyps keine Rolle spielen (Tautz et al., 1999). Kürzlich wurde nach Selektion eine auf Basis eines cp BVD-Virus entstandene Punktmutation im NS4B identifiziert, die einen Wechsel zum noncp Biotyp auslöst, obwohl sowohl NS3-Generierung als auch hohe virale RNA-Syntheserate erhalten blieben (Qu et al., 2001). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass nicht NS3 alleine, sondern ein NS3 enthaltender Proteinkomplex die Zytopathogenität auslöst. Die Mutation im NS4B könnte diesen Komplex so verändern, dass er keine zytopathogenen Eigenschaften mehr besitzt. Des Weiteren wirkt in transfizierten Zellen exprimiertes NS2-3 ebenso toxisch wie freies NS3 (Tautz, persönliche Mitteilung); es muss unter den natürlichen Umständen einer Virusinfektion folglich Faktoren oder Mechanismen geben, die die toxische Wirkung von NS2-3 auf die Zellen abfangen. Freies NS3 ist damit sicher nicht die alleinige Determinante für den zytopathogenen Biotyp, ein komplexes Geschehen erscheint dagegen wahrscheinlich. Auch wenn die genaue molekulare Grundlage noch nicht bekannt ist, so kann man jedoch feststellen, dass das Auftreten von NS3 in BVDV-infizierten Zellen unter natürlichen Bedingungen stets mit einer gesteigerten viralen RNA-Synthese, dem zytopathogenen Biotyp des Stammes und im Rahmen der MD mit dem Auftreten einer tödlichen Krankheit korreliert. Große Mengen von NS3 sind somit auf Proteinebene ein Marker für den zytopathogenen Biotyp von BVDV (Collett et al., 1988; Corapi et al., 1988; Pocock et al., 1987; Purchio et al., 1984). In mit cp BVDV-Stämmen infizierten Zellen dominiert in der Regel die Menge an NS3 über die des ungespaltenen NS2-3. Nach Infektionen mit noncp BDV-Stämmen oder noncp CSFV-Stämmen können hingegen im Verhältnis zu NS2-3 nur sehr

Einleitung

geringe Mengen an NS3 nachgewiesen werden (Becher et al., 1994; Thiel et al., 1991). Bislang ging man davon aus, dass Stämme von BVDV, die sich in Zellkultur nichtzytopathogen verhalten (noncp BVDV), ausschließlich ungespaltenes NS2-3 in infizierten Zellen exprimieren (Donis and Dubovi, 1987; Lindenbach and Rice, 2001; Pocock et al., 1987) und keinerlei freies NS3 bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieses Dogma widerlegt. Auf welche Art und Weise zytopathogene BVDV-Isolate eine Deregulation der NS3-Synthese bewerkstelligen und welche Rolle zelluläre Proteine dabei spielen können, wird noch ausführlich erläutert.

Die Spaltung von NS2-3 im Polyprotein des verwandten HCV wird durch eine virale Autoprotease bewerkstelligt, deren aktives Zentrum innerhalb von NS2 liegt, die aber zur Aktivität zusätzlich noch etwa die ersten 180 Aminosäuren von NS3 benötigt (Lindenbach and Rice, 2001). Diese NS2-3-Protease ist allerdings von der katalytischen Aktivität der in NS3 lokalisierten zweiten Proteasedomäne nicht abhängig; vielmehr ist anzunehmen, dass vom NS3-Teil nur strukturelle Eigenschaften bereitgestellt werden. Die katalytische Triade dieses Enzyms besteht aus einem Histidin, einer Glutaminsäure und einem Cystein (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). Außerdem ist bekannt, dass sowohl eine Zink-bindende Region in der N-terminalen Hälfte des NS3 als auch mikrosomale Membranen für die Prozessierung von NS2-3 benötigt werden (Lindenbach and Rice, 2001; Santolini et al., 1995). Austausch der Cysteine, die an der Koordinierung des Zinkions beteiligt sind, interferieren mit der Prozessierung von NS2-3 (Hijikata et al., 1993), was für eine strukturelle Bedeutung dieser Zink-bindenden Domäne in der Autoprotease spricht. Die verfügbaren Daten legen nahe, dass es sich bei der NS2-3-Protease von HCV um eine Cysteinprotease handelt (Pallaoro et al., 2001). Die starken Ähnlichkeiten zwischen Pestiviren und HCV ließen vermuten, dass die Spaltung von NS2-3 bei Pestiviren ebenfalls durch eine virale Protease katalysiert wird. Ein Ziel

Einleitung

dieser Arbeit war daher zu überprüfen, ob im NS2 der Pestiviren eine solche Autoprotease tatsächlich existiert.

Im Gegensatz zum hydrophoben NS2 ist das hydrophile NS3 bei Pestiviren stark konserviert (Meyers and Thiel, 1996). NS3 hat verschiedene bekannte katalytische Funktionen, die auch bei den NS3-Proteinen von anderen Vertretern der Familie *Flaviviridae* vorkommen. Nachgewiesen sind Serinprotease-, NTPase und Helikase-Aktivität (Bazan and Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989; Gorbalenya et al., 1989; Grassmann et al., 1999; Gu et al., 2000; Tamura et al., 1993; Tautz et al., 2000; Warrener and Collett, 1995; Wiskerchen and Collett, 1991). Die drei katalytischen Aminosäuren der Chymotrypsin-ähnlichen Serinprotease befinden sich im N-terminalen Teil von NS3, die NTPase- und Helikase-Zentren befinden sich etwa in der Mitte des Proteins. Die NS3-Serinprotease ist für alle Spaltungen im Polyprotein unterhalb von NS3 verantwortlich (Bazan and Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989; Tautz et al., 1997; Wiskerchen and Collett, 1991; Xu et al., 1997), wobei NS4A als Kofaktor der NS3-Protease für die Spaltungen von NS4B/NS5A und NS5A/NS5B fungiert und hierzu mit dem N-terminalen Bereich von NS3 interagieren muss (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997). Auch bei HCV ist NS4A Kofaktor der NS3-Protease und bindet an deren N-Terminus (Bartenschlager et al., 1995; Failla et al., 1994); bei HCV wurde diese Interaktion auf atomarer Ebene durch Röntgenstrukturanalyse von Kokristallen der NS3-Proteasedomäne mit einem synthetischen NS4A-Peptid aufgeklärt (Kim et al., 1996); es wird davon ausgegangen, dass eine transiente Interaktion mit NS4A ausreicht, um NS3 in die aktive Konformation zu bringen (De Francesco et al., 1996). Durch die Spaltungen der NS3-Protease werden in BVDV-infizierten Zellen NS4A, NS4B, NS5A und NS5B freigesetzt (Collett et al., 1988; Collett et al., 1991; Meyers et al., 1992). Die Spaltung zwischen NS3 und NS4A erfolgt ausschließlich in cis, die übrigen Prozessierungsschritte können auch in trans katalysiert werden. Alle Proteine

Einleitung

von NS3 bis NS5B bilden zusammen den viralen RNA-Replikationskomplex (Behrens et al., 1998; Meyers et al., 1996; Tautz et al., 1994), wobei die Funktionen von NS4B und NS5A bislang nicht bekannt sind. Für alle Proteine des RNA-Replikationskomplexes wurden Mutationen beschrieben, die zum Erliegen der RNA-Replikation führen. Daraus wurde geschlossen, dass alle beteiligten Proteine essentiell für die Replikation der viralen RNA sind (Grassmann et al., 2001); NS5A kommt dabei eine Sonderstellung zu, da dieses Protein als einziges in trans komplementiert werden kann (Grassmann et al., 2001). Detaillierte Untersuchungen zur Zusammensetzung des Replikationskomplexes stehen noch aus. NS5B übernimmt in diesem Komplex die Rolle der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) (Kao et al., 1999; Lohmann et al., 1999; Steffens et al., 1999; Zhong et al., 1998). Subgenomische pestivirale RNAs, welche die authentischen Enden (UTRs) enthalten und für die Proteine NS3 bis NS5B kodieren, sind zur autonomen Replikation befähigt (Behrens et al., 1998).

4.5 RNA-Rekombination als molekulare Ursache der Zytopathogenität

In Rindern, die persistent mit einem noncp BVDV-Stamm infiziert sind, entstehen antigenetisch eng verwandte cp Viren, und damit das typische Viruspaar, oft erst Monate oder Jahre nach der Geburt. Das betroffene Tier erkrankt dann an MD und stirbt innerhalb von zwei Wochen nach dem Einsetzen der ersten Symptome. In den letzten Jahren wurden zahlreiche solche Viruspaare aus an MD verendeten Tieren isoliert und zum Teil komplett sequenziert. Dabei zeigte sich, dass der Veränderung des Biotyps immer Veränderungen im Genom der cp Viren zugrunde liegen. Diese beruhen meist auf RNA-Rekombinationen, die auf den ersten Blick völlig unterschiedlich erscheinen. Sie führen jedoch alle zum gleichen Ergebnis: der Bildung von freiem NS3 in großer Menge (Kümmerer et al., 2000; Lindenbach and Rice, 2001; Meyers and Thiel, 1996). Diese Rekombinationsereignisse geschehen nicht gezielt, sondern treten rein zufällig auf; bemerkt werden aber letztlich nur solche Ereignisse, die zur Zytopathogenität des Virus und damit zur Erkrankung des Tieres führen. Die überwiegende Mehrheit aller Rekombinationsereignisse wird man somit klinisch nicht beobachten.

Rekombinationen, die zum cp Phänotyp führen, stellen für das Virus einen Nachteil dar, da durch den Tod des persistent infizierten Tieres die wichtigste Verbreitungsquelle des Virus beseitigt wird. Auch können zytopathogene Viren selbst keine persistierenden Infektionen etablieren. Somit sind die cp Viren in erster Linie als „genetischer Unfall“ anzusehen, sowohl für das Virus als auch für das betroffene Tier. Da die effektive Generierung von freiem NS3 die Voraussetzung zur Entstehung zytopathogener Viren ist, die Rekombinationsereignisse rein zufällig sind und man über die Krankheit MD quasi auf cp Viren selektiert, kann postuliert werden, dass statistisch alle denkbaren genetischen Varianten an cp Viren in an MD verendeten Tieren zu finden sind, die, auf welchem Weg auch immer, zur effektiven Bildung von

Einleitung

NS3 führen. Dass genau dies der Fall ist, sollen einige Beispiele interessanter Viruspaare im Folgenden zeigen; bei einigen ist der Weg der Generierung von NS3 offensichtlich, bei anderen gibt er immer noch Rätsel auf. Die Aufklärung der NS3-Entstehung in diesen Fällen war ein Ziel dieser Arbeit.

Generell lässt sich zwischen cp BVDV-Stämmen mit integrierten zellulären Sequenzen und cp BVDV-Stämmen ohne integrierte zelluläre Sequenzen unterscheiden (Meyers and Thiel, 1996). Bei den Vertretern der ersten Gruppe spielen Sequenzen des zellulären Ubiquitins und des so genannten Jiv-Proteins (J-domain-protein interacting with viral protein, früher cINS) die größte Rolle. Vertreter der zweiten Gruppe zeichnen sich durch Deletionen, Duplikationen oder Punktmutationen im viralen Genom aus (Meyers and Thiel, 1996). Aus didaktischen Gründen wird im Folgenden jedoch eine Einteilung vorgenommen, die auf den unterschiedlichen Mechanismen der NS3-Entstehung basiert. Demnach lassen sich cp BVD-Viren differenzieren,

- die eine zelluläre oder virale Insertion direkt oberhalb von NS3 besitzen, die der Generierung des N-Terminus und Freisetzung von NS3 dient (Mechanismus der NS3-Entstehung aufgeklärt),
- die einen Teil des zellulären Proteins Jiv in ihrem Polyprotein tragen und dieses zur Induktion der NS2-3-Spaltung nutzen (Mechanismus der NS3-Entstehung unbekannt),
- die kleine Insertionen viraler Sequenzen oder Punktmutationen im NS2 tragen und dadurch NS2-3 in NS2 und NS3 prozessieren (Mechanismus der NS3-Entstehung unbekannt).

Eine schematische Übersicht des Genom-Aufbaus einiger wichtiger und hier besprochener cp BVD-Viren gibt die Abb. A4.

4.5.1 cp BVD-Viren mit Insertionen direkt oberhalb von NS3

Insertierte Ubiquitin- oder Ubiquitin-ähnliche Sequenzen wurden bislang sehr häufig in den Genomen zytopathogener BVD-Viren gefunden (Meyers and Thiel, 1996). Ubiquitin ist ein bei Eukaryonten hoch konserviertes, 76 Aminosäuren langes Protein und hat unter anderem die Funktion, Proteine zu markieren, die über selektive Degradation vom Proteasom-Apparat der Zelle abgebaut werden sollen (Hershko and Ciechanover, 1992). Es wird in Zellen stets als N-terminaler Teil von Fusionsproteinen exprimiert (Finley et al., 1989; Finley et al., 1987; Redmann and Rechsteiner, 1989); die Ubiquitin Monomere werden über die Katalyse Ubiquitin-C-terminaler Hydrolasen (ubiquitin-C-terminal hydrolases, UCH), welche den C-Terminus des Ubiquitins generieren, aus diesen Fusionsproteinen freigesetzt (Baker et al., 1992; Jentsch, 1992; Jonnalagadda et al., 1989; Mayer and Wilkinson, 1989; Rechsteiner, 1987). Alle Ubiquitin-Insertionen in Genomen zytopathogener Pestiviren umfassen mindestens die Größe eines Monomers des Proteins und befinden sich ausnahmslos direkt oberhalb („upstream“) der für NS3 kodierenden Region. Der erste cp BVDV-Stamm, in dem eine Ubiquitin Insertion von 228 Basen beschrieben wurde, trägt die Bezeichnung Osloss (de Moerlooze et al., 1993; Meyers et al., 1989; Renard et al., 1987). Die Insertion in diesem Virusgenom führt dazu, dass im Polyprotein des Virus zwischen Aminosäure 1589 und 1590 ein einzelnes Ubiquitin-Monomer platziert ist, welches im Vergleich zum zellulären Ubiquitin zwei Aminosäuren-Austausche trägt (Meyers et al., 1989). Durch diese Insertion kommt es im Polyprotein zu einem Prozessierungsschritt durch Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen. Die Generierung des Ubiquitin-C-Terminus führt im gleichen Zuge zur Entstehung des N-Terminus von NS3 (AS 1590) und damit zu dessen Freisetzung, während das Ubiquitin-Monomer als C-terminale Fusion am NS2 zurückbleibt (Abb. A5). Somit stellt die Ubiquitin-Insertion im viralen Polyprotein ein zusätzliches Prozessierungssignal dar, welches von einer

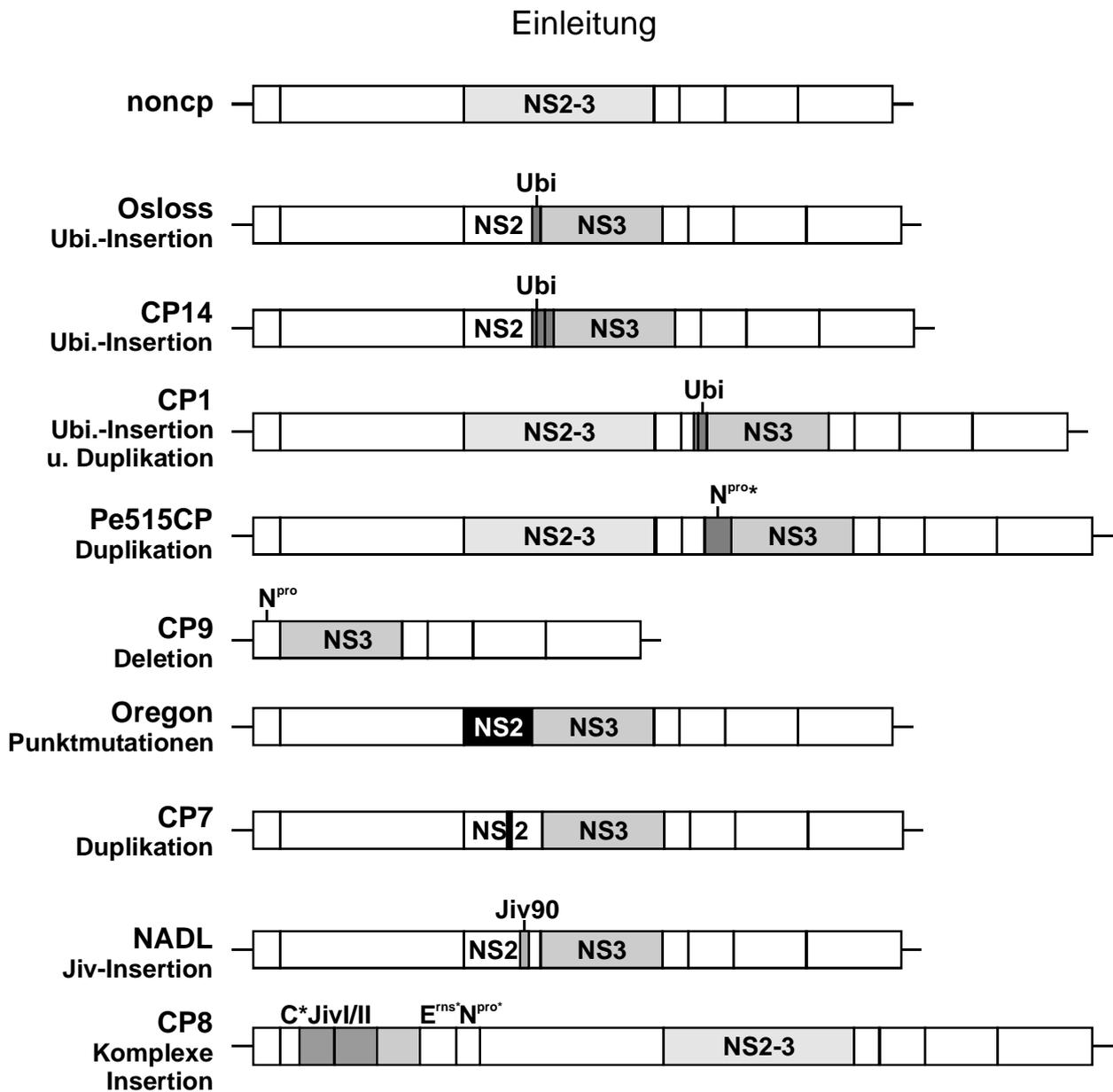


Abbildung A4: Genomstruktur von noncp BVDV und verschiedenen cp Stämmen
 Durch RNA-Rekombination oder Mutation entstehen aus dem persistierenden noncp Virus zytopathogene Viren. Alle haben die Gemeinsamkeit, in infizierten Zellen große Mengen freies NS3 zu exprimieren. Einzelheiten werden im Text erläutert.

zelleigenen Protease erkannt wird (Tautz et al., 1993).

Insertionen von Ubiquitin treten, beispielsweise beim Stamm CP1, auch in Verbindung mit Duplikationen viraler Sequenzen auf (Meyers et al., 1991). Das Genom des CP1 entspricht bis in den NS4B-kodierenden Bereich dem eines noncp BVD-Virus. Allerdings ist der für NS4B-kodierende Abschnitt nicht vollständig (NS4B* in Abb. A5; * steht für ein verkürztes Protein); auf ihn folgt eine für Ubiquitin kodierende Sequenz, die sich aus einem verkürzten

Einleitung

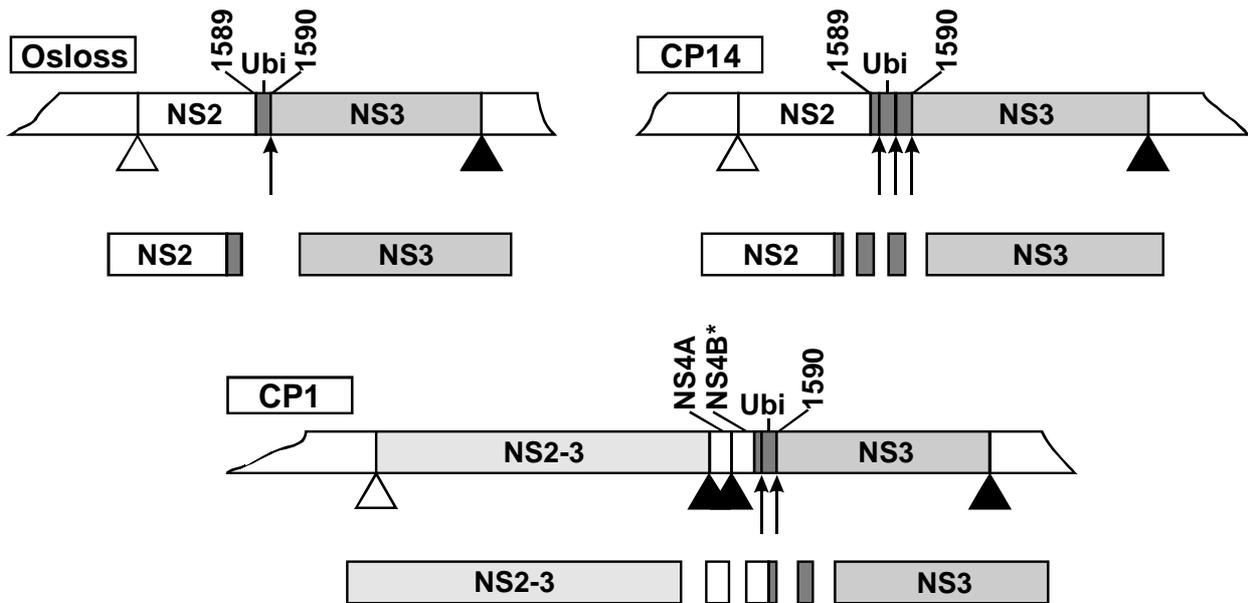


Abbildung A5: Prozessierungsmuster von verschiedenen BVDV Polyproteinen mit Ubiquitin-Insertionen

Spaltungen durch das zelluläre Enzym Signalase werden durch weiße Dreiecke symbolisiert; schwarz gefüllte Dreiecke stehen für Spaltungen durch die viruseigene NS3-Protease. Die Pfeile deuten auf die Stellen, an denen zelluläre Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolasen (UCHs) für die Polyprotein-Prozessierung verantwortlich sind. Zahlen geben Aminosäurepositionen im Polyprotein an (numeriert nach BVDV SD-1). Im Falle des Stammes Osloss bleibt das Ubiquitin-Monomer hierbei am C-Terminus des NS2 zurück; bei cp BVDV CP14 entstehen jeweils zwei freie Ubiquitin-Monomere, ein verkürztes Ubiquitin bleibt am NS2 zurück. Bei cp BVDV CP1, der neben einer Ubiquitin-Insertion auch noch eine Duplikation viraler Sequenzen besitzt, entstehen unverändertes NS2-3, NS4A, ein Ubiquitin-Monomer und ein Fusionsprotein aus einem verkürzten NS4B (NS4B*) und verkürztem Ubiquitin. In allen Fällen entsteht NS3 mit authentischem N-Terminus (AS 1590).

und einem vollständigen Monomer zusammensetzt. Auf dieses Polyubiquitinfragment folgt direkt wieder pestivirale Sequenz: sie beginnt mit dem Codon für Aminosäure 1590, dem N-Terminus von NS3, und reicht über NS4A, NS4B, NS5A bis zum Ende von NS5B. Somit sind im Falle von CP1 NS3, NS4A und ein Teil von NS4B doppelt im Genom vorhanden und die Gesamtlänge des Genoms steigt auf etwa 15.000 Basen. Im entstehenden Polyprotein wird über das Ubiquitin als Prozessierungssignal ebenso wie beim Stamm Osloss der N-Terminus von NS3 generiert; ungespaltenes NS2-3 entsteht bei CP1 aus der für NS2-3-kodierenden Region des vorderen Abschnitts des Genoms (Abb. A5).

In Kombination mit der Duplikation viraler Sequenzen wurden neben

Einleitung

Ubiquitin noch andere zelluläre Insertionen direkt „upstream“ des NS3 gefunden. All diese Proteine stellen Prozessierungssignale für zelluläre Proteasen im viralen Polyprotein dar, über die der N-Terminus von NS3 erzeugt wird. Als Beispiele für solche Sequenzen seien SMT3B und NEDD8 sowie Fragmente des Mikrotubuli-assoziierten Proteins LC-3*, des GABA-RAP* oder GATE-16* (* = verkürztes Protein) genannt (Baroth et al., 2000; Becher et al., 2002; Meyers et al., 1998; Qi et al., 1998). SMT3B und NEDD8 erfüllen in der Zelle eine ähnliche Funktion wie Ubiquitin (Hochstrasser, 2000; Jentsch and Pyrowolakis, 2000; Yeh et al., 2000), für NEDD8 ist sogar eine Spaltung durch Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen nachgewiesen (Wada et al., 1998).

Es ist bekannt, dass der exakte N-Terminus von NS3 für die Replikationsfähigkeit von BVDV entscheidende Bedeutung hat und Variationen, wie beispielsweise eine Verlängerung um eine Aminosäure, nicht erlaubt sind (Tautz and Thiel, 2003). Dies erklärt, dass Insertionen, die ein Prozessierungs-Signal darstellen immer genau oberhalb von NS3 auftreten. Andere Positionen werden in einem System, das auf Funktionalität selektiert offensichtlich nicht toleriert und daher nicht beobachtet. BVDV CP821 gehört zu den wenigen Ausnahmen, bei denen der N-Terminus von NS3 von dem konservierten Aminosäuremotiv Gly-Pro-Ala (AS 1590-1592) abweicht (Baroth et al., 2000). Die Insertion folgt bei diesem Stamm der Aminosäure 1593 im Polyprotein; gleichzeitig sind jedoch drei zusätzliche Aminosäuren „downstream“ der vorhergesagten Spaltstelle vorhanden, sodass ein NS3-Protein mit zwei AS-Austauschen am N-Terminus erwartet wird (Gly-Val-Leu anstelle von Gly-Pro-Ala). Es ist allerdings nicht bekannt, ob in diesem Fall zur Funktionserhaltung noch andere adaptive Mutationen, beispielsweise im Kofaktor NS4A, notwendig sind.

Duplikationen im viralen Genom können auch ohne die Insertion zellulärer

Einleitung

Sequenzen (wie Ubiquitin) zur direkten Freisetzung von NS3 und Zytopathogenität führen. Der BVDV-Stamm Pe515CP zeichnet sich beispielsweise durch eine komplexe Duplikation aus (Meyers et al., 1992); hierbei sind sowohl NS3 bis NS4B* (verkürztes Protein) als auch die Aminosäuren 15 bis 168 von N^{pro} als N^{pro*} dupliziert (Abb. A4). Die N^{pro*}-Sequenz endet mit der letzten Aminosäure von N^{pro}, direkt gefolgt von der ersten Aminosäure des NS3 (1590). Die erhaltenen Daten legen nahe, dass auch N^{pro*} autokatalytisch aktiv ist, sich also selbst abspaltet und auf diesem Weg den N-Terminus von NS3 generiert (Meyers et al., 1992). Andere cp BVD-Virus Stämme, wie CP4 oder CP6, zeigen einen dem Pe515CP sehr ähnlichen Aufbau. Der Unterschied bei diesen Stämmen liegt in der Länge des duplizierten Abschnittes und im N-Terminus des N^{pro*} (4 AS Deletion bezogen auf N^{pro} bei CP4, eine zusätzliche AS bezogen auf N^{pro} bei CP6). Jedoch ist allen Stämmen der direkte Übergang von der letzten Aminosäure der N^{pro}-Sequenz auf die erste Aminosäure der NS3-Sequenz gemeinsam, sodass auch hier wieder der korrekte, funktionelle N-Terminus von NS3 generiert werden kann. Der Mechanismus der Generierung von NS3 ist dem bei Ubiquitin-Insertionen insgesamt sehr ähnlich, nur wird hier eine virale Autoprotease (N^{pro}) anstelle zellulärer Proteasen verwendet; in beiden Fällen folgt jedoch auf die insertierte oder duplizierte Sequenz direkt NS3 (AS 1590).

Neben zellulären Insertionen und viralen Duplikationen können auch Deletionen im pestiviralen Genom zu einer Generierung von NS3 und damit zur Zytopathogenität führen. Solche Deletionen führen allerdings dazu, dass die zugehörigen Viren abhängig von einem Helfervirus werden, das die fehlenden Proteine in trans für sie bereitstellt. Solche helferabhängigen Viren werden als „defekte interferierende Partikel“, oder kurz „DI“ bezeichnet (Roux et al., 1991), falls sie nicht nur auf ein Helfervirus angewiesen („defekt“) sind, sondern auch die Replikation des Helfervirus negativ beeinflussen („interferierend“). So umfasst die Deletion bei BVDV CP9 den gesamten

Einleitung

Bereich, der für die Strukturproteine, p7 und NS2 kodiert (Tautz et al., 1994). Auf diese Weise folgt auf das letzte Codon für die Autoprotease N^{pro} das erste Codon von NS3 (Abb. A4); damit tritt, bezogen auf die NS3-Entstehung, die gleiche Situation wieder ein, wie sie oben schon für Viren mit doppelter Duplikation (Pe515CP, CP4, CP6) beschrieben wurde. Entsprechende Untersuchungen legen nahe, dass auch in diesem Fall der N-Terminus von NS3 wiederum durch die autokatalytische Abspaltung von N^{pro} generiert wird (Tautz et al., 1994). Die Ausbreitung dieses DIs ist helfervirusabhängig, da NS2-3, p7 und sämtliche Strukturproteine zur Verpackung der RNA nicht auf dem eigenen Genom kodiert sind. Die Replikation der DI-RNA erfolgt allerdings unabhängig von einem Helfervirus (Behrens et al., 1998); hieraus folgt, dass die Nichtstrukturproteine N^{pro}, NS2, NS2-3 und p7 zur Replikation viraler RNA nicht benötigt werden. Bei dem DI CP13 führen zwei große interne Deletionen zu einer Fusion von 23 Aminosäuren aus N^{pro} und E1 mit einem N-terminal verkürzten NS3 (Kupfermann et al., 1996). Ähnlich wie bei BVDV CP821 entsteht also auch hier ein NS3-Protein mit verändertem N-Terminus.

4.5.2 cp BVD-Viren mit Insertionen von Jiv-Sequenzen

Neben Ubiquitin sind die häufigsten zellulären Sequenzen, die in Genomen von cp BVDV-Stämmen gefunden werden, RNA-Abschnitte aus einer zellulären mRNA, die für ein Protein namens „Jiv“ kodiert (**J**-domain-protein **i**nteracting with **v**iral protein, ehemals „cINS“ für „**c**ellular **i**n**s**ertion“ (Rinck et al., 2001)). In der RNA aus MDBK-Zellen gelang schon 1990 der Nachweis von zwei für Jiv kodierenden mRNAs, wobei zu diesem Zeitpunkt nur eine Teilsequenz bekannt war, die keine Aussage über die Funktion des Proteins zuließ (Meyers et al., 1990).

Die beiden mRNAs wurden als cDNAs kloniert und sequenziert (Rinck et al., 2001); sie unterscheiden sich diesen Daten zufolge nur in der Länge der

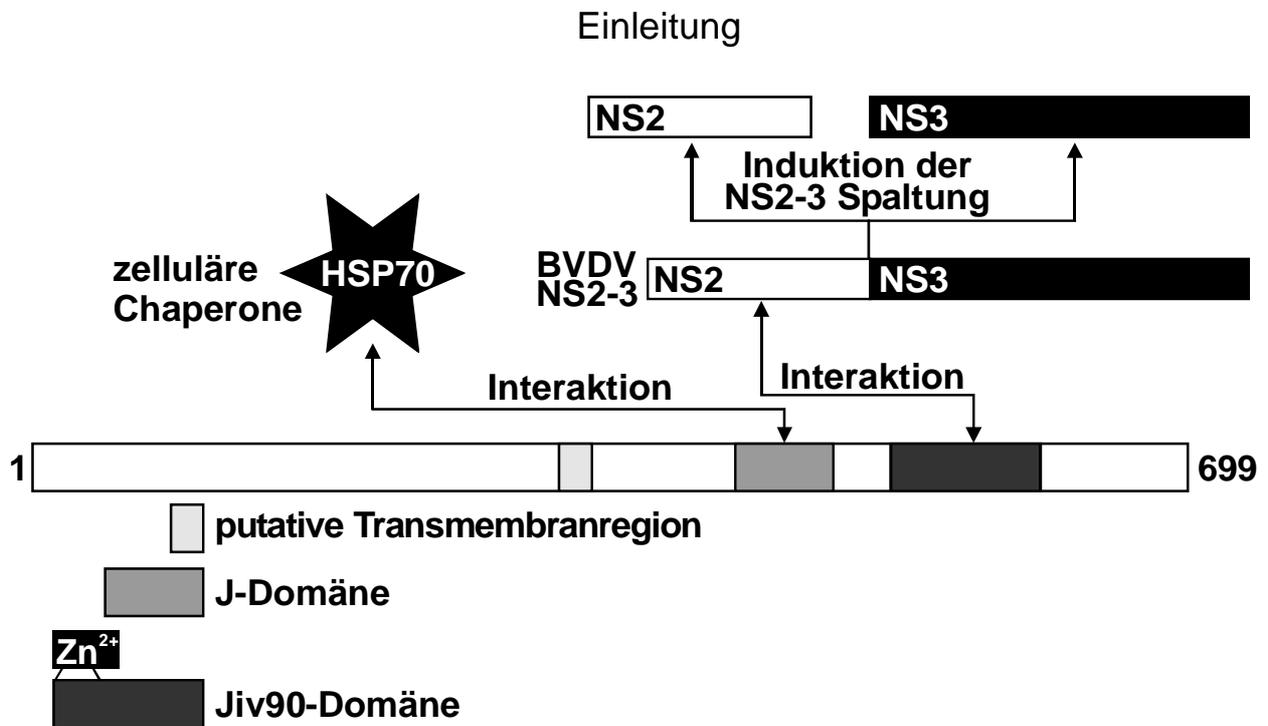


Abbildung A6: Aufbau und Funktionen des zellulären Jiv-Proteins

Wahrscheinlich ist Jiv über die Transmembrandomäne in den Membranen des ER verankert. Über die J-Domäne kann es mit anderen Chaperonen (HSP70) interagieren und Substrate an diese Enzyme weiterleiten. Die Jiv90-Domäne ist in der Lage mit NS2 von Pestiviren zu interagieren und die Spaltung von NS2-3 auf unbekanntem Weg zu induzieren. Innerhalb der Jiv90-Domäne befindet sich N-terminal eines aus vier Cysteinen gebildetes putatives Zinkbindemotiv.

3'UTR und entstehen daher offensichtlich durch die Nutzung zweier verschiedener Polyadenylierungssignale. Die Leserahmen beider RNA-Spezies sind identisch und kodieren beim Rind für ein Protein von 699 AS (Rinck et al., 2001). Das homologe Protein beim Menschen wird auch als HDJ3 (human DnaJ 3) bezeichnet (Chen et al., 2003); sein Gen befindet sich auf dem Chromosom 12 des Menschen und besteht aus sieben Exons (Chen et al., 2003). Durch bioinformatische Analysen konnten beim bovinen und humanen Protein eine Transmembrandomäne und eine so genannte J-Domäne identifiziert werden. J-Domänen sind charakteristisch für eine Familie von Chaperonen, die der J-Domänen-Proteine, deren am besten untersuchten Vertreter das DnaJ-Protein aus *E. coli* und das eukaryontische Hsp40 sind (Agashe and Hartl, 2000; Cheetham and Caplan, 1998; Kelley, 1998). Diese Gruppe von Chaperonen spielt eine wichtige Rolle in der

Einleitung

Regulation von Proteinfaltungsprozessen; über die J-Domäne interagieren sie mit Chaperonen vom Typ Hsp70 und geben Substrate an diese weiter (Abb. A6). Von J-Domänen-Proteinen ist bekannt, dass sie häufig zwei Zinkionen binden; eines der hierfür verwendeten Zink-bindenden Motive existiert auch im Jiv-Protein und wird von den Cysteinen an den Positionen 534, 537, 556 und 559 gebildet. Über die zellulären Aufgaben von Jiv ist noch wenig bekannt. Das homologe Protein der Ratte ist am Export von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G protein coupled receptors; GPCRs), wie dem Dopamin-D1-Rezeptor, vom ER zur Zelloberfläche beteiligt (Bermak et al., 2001); es wird daher in diesem Zusammenhang auch als DRiP78 (dopamine-receptor interacting protein 78) bezeichnet. Ebenso ist ein Einfluss von DRiP78 auf den Export eines Angiotensin II Rezeptors, ebenfalls ein GPCR, an die Zelloberfläche beschrieben (Leclerc et al., 2002). Welche Rolle Jiv (DRiP78) beim Export der Rezeptoren jedoch genau spielt, ist noch unklar.

In einer Hinsicht unterscheiden sich Jiv-Insertionen von allen anderen zellulären Insertionen: sie befinden sich nicht an der NS2-3-Spaltstelle, sondern, sofern überhaupt im NS2 lokalisiert, deutlich oberhalb dieser Position innerhalb von NS2 (Abb. A7); sie wurden in zahlreichen Stämmen von cp BVDV und auch von cp BDV nachgewiesen (Becher et al., 1996; Meyers and Thiel, 1996; Ridpath and Neill, 2000; Vilcek et al., 2000) und folgen im Polyprotein von BVDV in der Regel auf die Aminosäuren zwischen Position 1529 (BVDV 5912c, (Ridpath and Neill, 2000)) und 1543 (BVDV 6082c, GenBank AF28180; abweichende Angaben in (Ridpath and Neill, 2000)). Die Insertionsstelle liegt damit unterhalb einer putativen Zink-bindenden Struktur des NS2 (de Moerlooze et al., 1990) und 47-61 AS oberhalb der Position 1589, dem konservierten C-Terminus von NS2 (Tautz and Thiel, 2003). Da in Stämmen mit Jiv-Insertionen in der Regel keine Duplikationen oder Deletionen viraler Sequenzen beobachtet werden können, muss NS3 aus der Spaltung von NS2-3 hervorgehen. Durch die besondere

Einleitung

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

Abbildung A7: Insertion von Jiv-Sequenzen im NS2 von BVDV- und BDV- Isolaten

NS2 (grau) und insertierte Jiv-Sequenzen (schwarz) sind schematisch dargestellt. Die Zahl vor den Insertionen gibt jeweils die letzte Aminosäure des NS2 an, auf die die Jiv-Sequenz folgt. Die Zahlen innerhalb der schwarzen Kästen entsprechen der Länge der Jiv-kodierenden Sequenzen in Aminosäuren (aa). Jiv-Insertionen befinden sich im NS2 zwischen den Aminosäuren 1529 und 1543 und variieren stark in ihrer Größe.

Position dieser zellulären Insertion weitab der NS2-3-Spaltstelle fällt es allerdings schwer, sie für ein Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen zu halten; in diesem Fall würde man die Insertion, genau wie bei Ubiquitin, direkt an der Spaltstelle, oder doch zumindest in einer festen Position in der Nähe der Spaltstelle erwarten. Hinzu kommt, dass die Insertionen in ihrer Größe äußerst variabel sind: Bei cp BVDV NADL (Collett et al., 1988), dem Prototyp eines BVDV-Stammes mit Jiv-Insertion, kodiert die zusätzliche Sequenz für nur 90 Aminosäuren und ist damit die kürzeste Jiv-Insertion, die bisher gefunden wurde. Es konnte für den Stamm NADL gezeigt werden, dass die

Einleitung

90 AS-Insertion notwendig und hinreichend für NS2-3-Spaltung und Zytopathogenität ist (Mendez et al., 1998; Vassilev et al., 1997). Die 90 AS sind auch fast ausnahmslos kompletter Bestandteil aller größeren Jiv-Insertionen in cp BVDV Isolaten, stellen also eine Art Minimalfragment dar und werden daher auch als „Jiv90“ bezeichnet (Rinck et al., 2001). Lediglich bei BVDV 869 (Vilcek et al., 2000) fehlt die erste Aminosäure dieses Fragments, bei BVDV ND 8799c (Ridpath and Neill, 2000) sind die zwei letzten Aminosäuren in der Insertion nicht enthalten. Durch unterschiedliche Längen der die Jiv90-Sequenz flankierenden Sequenzen kann die Insertion bis zu 177 Aminosäuren groß werden (BVDV C86 (Meyers, persönliche Mitteilung)). In den meisten Fällen handelt es sich bei den Insertionen um reine Jiv-Sequenzen; nur bei 5 von 19 bisher erfassten Pestivirus-Stämmen schließen sich kurze Sequenzen unbekannter Herkunft mit einer maximalen Länge von 29 Aminosäuren N- (BVDV 5569, OkSt94-050-297c, 6082c) oder C-terminal (BVDV 5.19516 und ND 8799c) an. Der Mechanismus, durch den die Jiv-Insertion zu NS2-3-Spaltung führt, ist bislang unbekannt. Die Distanz der Jiv-Insertionen von der NS2-3-Spaltstelle, die zwischen AS 1529-1543 variable Position und die variable Größe der Insertion, sprechen gegen ein Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen. Daher wird angenommen, dass durch die Insertionen von Jiv in das pestivirale NS2 eine ruhende Autoprotease im NS2 aktiviert wird, die die Prozessierung von NS2-3 katalysiert (Rinck et al., 2001).

Bisher wurden zwei Stämme von BVDV beschrieben, CP8 (Müller et al., 2003) und KS86-1cp (Nagai et al., 2003), bei denen Jiv-Sequenzen nicht im NS2, sondern im Bereich der Strukturproteine inseriert sind. Der Stamm BVDV CP8 trägt im für das Kapsidprotein kodierenden Bereich eine komplexe, 1539 Basen lange Insertion, zusammengesetzt aus duplizierten viralen und zellulären Sequenzen; Teil dieser Insertion sind auch zwei Fragmente von Jiv; eines davon enthält auch die für Jiv90 kodierende

Einleitung

Sequenz. Durch N^{pro}-abhängige Prozessierung exprimiert CP8 in infizierten Zellen ein 513 AS großes Fusionsprotein, das nicht weiter prozessiert wird, zusätzlich zu einem kompletten Satz viraler Proteine. Da in CP8-infizierten Zellen NS2-3 gespalten wird, im NS2 von CP8 allerdings im Vergleich zu NCP8 keine auffälligen Veränderungen vorlagen, lag die Vermutung nahe, dass das CP8-spezifische zusätzliche Protein die Prozessierung von NS2-3 hervorruft. Es konnte gezeigt werden, dass das zusätzliche Protein tatsächlich die Fähigkeit besitzt, in trans die Spaltung von NS2-3 zu induzieren (Müller et al., 2003). Diese Beobachtung gab den entscheidenden Hinweis, dass Jiv90 nicht nur in cis (als Insertion im NS2), sondern auch in trans (separat angeboten), NS2-3-Spaltung induzieren und Zytopathogenität auslösen kann (Rinck et al., 2001). Sowohl zelluläres Jiv als auch dessen Fragment Jiv90 sind in der Lage, mit NS2 stabil zu interagieren und NS2-3-Spaltung in trans zu induzieren (Abb. A6). In Zellen, die Jiv induzierbar überexprimieren, werden BVD-Viren, welche per se noncp sind, zytopathogen (Rinck et al., 2001), da über die NS2-3-Spaltungsinduktion und NS3-Freisetzung der Biotyp des Virus wechselt. Die Tatsache, dass ein zelluläres Protein in trans Einfluss auf die virale Polyproteinprozessierung hat und gleichzeitig den Biotyp des Virus verändern kann, ist ein in der Virologie bisher einzigartiger Befund. Jiv kann die NS2-3-Spaltung regulieren, wie dieser Prozess allerdings auf molekularer Ebene abläuft, ist noch weitgehend unklar und Untersuchungen zur Funktionsweise von Jiv sind daher auch Teil dieser Arbeit. Generell sind zwei mögliche Szenarien vorstellbar: (i) Jiv hat selbst die Eigenschaft einer Protease und führt zur Spaltung von NS2-3, oder (ii) Jiv überführt eine hypothetische Autoprotease im NS2 in die aktive Konformation, wirkt also als Kofaktor einer viralen Protease. Gegen die erste Möglichkeit sprachen schon zu Beginn dieser Arbeit die Kürze des zur Spaltungsinduktion benötigten Proteinabschnitts (nur 90 Aminosäuren), das Fehlen eines charakteristischen Sequenzmotivs für eine Protease und die

Einleitung

stabile Bindung von Jiv an NS2. Typische Proteasen hingegen sind größere Proteine mit einem charakteristischen Aminosäuremotiv und binden ihr Substrat nur vorübergehend.

Natürliche Wirtszellen, wie die Zelllinie MDBK, sind nicht frei von Jiv (Rinck et al., 2001), jedoch werden unter natürlichen Bedingungen nur sehr geringe Mengen Jiv-Protein exprimiert; diese Mengen sind so klein, dass ein direkter Proteinnachweis über Immunfluoreszenz oder Western Blot bisher nicht gelungen ist; die Jiv-mRNA kann jedoch stets nachgewiesen werden. Es ist noch unklar, ob Jiv einen essentiellen Wirtsfaktor darstellt. Denkbar wäre, dass geringe Mengen Jiv in infizierten Zellen benötigt werden, um zumindest in geringem Umfang eine NS2-3-Spaltung zu induzieren. Falls die Replikation von noncp BVDV von dieser Spaltung abhängig ist, wäre eine Replikation in Jiv-freien Zellen unmöglich.

4.5.3 cp BVDV-Viren mit anderen Mutationen im NS2

Im cp BVDV-Stamm Oregon konnten weder Insertionen noch Deletionen, dafür aber mehrere AS-Austausche innerhalb von NS2 gefunden werden, die für eine partielle Spaltung von NS2-3 verantwortlich sind (Kümmerer et al., 1998). Unter allen identifizierten Mutationen kam dem Austausch zur AS Serin an Position 1555 eine besondere Bedeutung zu; Rückmutation in einem entsprechenden infektiösen Klon dieses BVDV-Stamms führte zum Verlust der Zytopathogenität (Kümmerer and Meyers, 2000). Durch N-terminale Sequenzierung des aus der Prozessierung aus NS2-3 entstehenden NS3 dieses Stamms wurde Gly₁₅₉₀ als erste Aminosäure von NS3 bestätigt (Kümmerer et al., 1998); dies ist somit die Position, oberhalb welcher bei Pe515CP und ähnlichen Stämmen die N^{pro*}-Sequenz endet und sich bei Osloss und ähnlichen Stämmen die Ubiquitin-Sequenzen befinden. Wie es beim Stamm Oregon allerdings ohne Insertion oder Deletion zur Prozessierung von NS2-3 kommen kann, bleibt weiter ungeklärt. Es war vermutet worden, dass die Punktmutationen zu einer Konformationsänderung innerhalb von NS2 führen, wodurch eine inaktive Protease im NS2 aktiviert werden könnte, die als Autoprotease, unabhängig von zellulären Enzymen, die Prozessierung von NS2-3 katalysiert.

Diese Hypothese war zuvor bereits für den Stamm CP7 (Abb. A8) aufgestellt worden (Tautz et al., 1996). Hier war eine 27 Basen lange



Abbildung A8: Das Viruspaar Nummer 7

Eine 27 Basen große Duplikation innerhalb von NS2 ist notwendig und ausreichend, um eine Prozessierung von NS2-3 herbeizuführen. Man vermutet als Mechanismus die Aktivierung einer per se inaktiven Protease im NS2. Das Viruspaar #7 diente als Grundlage für diese Arbeit.

Einleitung

Insertion, die etwa mittig im für NS2 kodierenden Bereich (zwischen den Nukleotiden 4353 und 4354) liegt, identifiziert worden. Bei genauerer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass es sich bei den 27 zusätzlichen Nukleotiden in der für NS2 kodierenden Region um eine Duplikation viraler Sequenz handelt (Ursprung sind die Nukleotide 4064 bis 4090), die etwa 300 Basen unterhalb ihres Ursprungsortes in einem anderen Leserahmen wieder eingebaut wurde und dort daher für andere Aminosäuren kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese 9 AS-Insertion im NS2 sowohl essentiell für die NS2-3-Spaltung bei CP7 als auch hinreichend für eine NS2-3-Spaltung auf der Basis eines nichtzytopathogenen Virus ist und dass die Serinprotease im NS3 an dieser Prozessierung unbeteiligt ist (Tautz et al., 1996). Die Insertion liegt 266 AS oberhalb der NS2-3-Spaltstelle; daher ist schwer vorstellbar, wie in diesem Fall eine zelluläre Protease diese Insertion nutzen könnte, um NS2-3 zu prozessieren. Der Stamm CP7 unterstützt damit, ebenso wie der Stamm Oregon, die Theorie einer abgeschalteten Autoprotease im NS2, die durch Punktmutation oder Insertionen aktivierbar ist. Auf solche Mutanten wird im System Mucosal Disease selektiert, da nur zytopathogene Stämme MD auslösen können und nur Stämme zytopathogen sind, die NS3 zu exprimieren vermögen. Somit gibt es offensichtlich neben der Möglichkeit der Insertion zellulärer Prozessierungssignale (wie z.B. Ubiquitin) oder der Deletion oder Duplikation viraler Sequenzen (N^{pro} als Protease) über die Aktivierung einer viralen Protease im NS2 noch einen anderen Weg, um die zur Entstehung zytopathogener Viren und der Krankheit MD notwendige Freisetzung von NS3 herbeizuführen.

4.6 Virale Proteinasen

Von Virusgenomen kodierte Proteasen (Synonym: Proteinasen) spielen im Lebenszyklus fast aller Viren entscheidende Rollen; ihre Funktionen und ihre Systematik sollen daher im Folgenden kurz eingeführt werden.

Bei allen RNA-Viren (z.B. Vertretern der Familien *Picornaviridae* oder *Flaviviridae*) werden viruskodierte Proteasen vorwiegend zur Prozessierung des viralen Polyproteins benötigt. So ist bei den in dieser Arbeit verwendeten Pestiviren N^{pro} autoproteolytisch aktiv, spaltet sich selbst von Polyprotein ab und generiert auf diese Weise den N-Terminus des Core-Proteins; die Protease im NS3 der Pestiviren katalysiert hingegen zusammen mit ihrem Kofaktor NS4A alle Prozessierungsschritte C-terminal von NS3 im Bereich der Nichtstrukturproteine. Bei solchen Viren, deren Proteinsynthese über ein Vorläufer-Polyprotein erfolgt, existiert keine Kontrolle der Proteinexpression auf genetischer Ebene; vielmehr steht hier die biochemische Kontrolle auf Proteinebene im Vordergrund. So sorgen virale und auch zelluläre Proteasen dafür, dass benötigte Prozessierungsprodukte zur richtigen Zeit vorliegen und genutzt werden können. Oftmals haben auch die Intermediärprodukte der Polyproteinprozessierung eigenständige Funktionen.

Virale Proteinasen sind neben ihrer Funktion bei der Polyproteinprozessierung aber auch an völlig anderen Prozessen beteiligt: So können sie beispielsweise die Freisetzung der viralen DNA ermöglichen (Adenoviren), die Aktivität regulatorischer Proteine modulieren (z.B. Picornaviren, Flaviviren), die Proteinbiosynthese der Wirtszellen unterdrücken (Picornaviren) oder auch an der Virionen-Morphogenese (Herpesviren, Adenoviren, Nodaviren, Alphaviren) oder an der Zell-Lyse (Adenoviren, Picornaviren) beteiligt sein.

Bei der enormen Anzahl der bis heute identifizierten Proteasen ist zu Vergleichszwecken eine Klassifizierung obligatorisch. Generell unterscheidet

Einleitung

man auf funktioneller Ebene, abhängig vom Ort, an dem die Protease die Peptidkette spaltet, Exopeptidasen, die am Ende der Kette ansetzen, und Endopeptidasen, die meist an sehr spezifischen Stellen innerhalb einer Kette spalten. Exopeptidasen werden auch, je nach dem an welchem Ende des Proteins sie spalten als Carboxypeptidasen (C-terminal) bzw. als Aminopeptidasen (N-terminal) bezeichnet. Die früher übliche vereinfachte mechanistische Klassifizierung von zellulären und viralen Proteinase nach dem Katalyse-Typ (Tab. A1) findet heute als Grundlage der modernen Klassifizierung Verwendung (s.u.).

Tabelle A1: Beispiele zellulärer Proteasen und ihrer katalytischen Aminosäuren, eingeteilt nach dem Katalyse-Mechanismus

Proteinase-Klasse	Katalytische Aminosäuren	Beispiele zellulärer Proteinase
Serin-Proteinase	His, Asp, Ser	Trypsin, Chymotrypsin
Cystein-Proteinase	Asn, His, Cys	Papain
Aspartat-Proteinase	Asp, Asp	Chymosin B
Metallo-Proteinase	Zn²⁺ -abhängig (His, His, Glu)	Carboxypeptidase A

Heute werden die proteolytisch aktiven Enzyme auf dieser Basis in Clans und Familien eingeteilt (aktuelle Daten im Internet: <http://mercop.sanger.ac.uk>; (Rawlings et al., 2002; Rawlings et al., 2004)). Ein Clan umfasst dabei alle bekannten Proteasen, die höchstwahrscheinlich einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen. Eine oder mehrere Familien sind in einem Clan vereint. Die Familien werden ebenfalls aufgrund der evolutionären verwandtschaftlichen Beziehung gebildet; diese Verwandtschaft drückt sich in einer ähnlichen Tertiärstruktur des gefalteten Proteins oder, sofern solche Strukturdaten nicht zur Verfügung stehen, in einem analogen Aufbau in Art und Abfolge der katalytischen Aminosäuren des aktiven Zentrums aus; oft werden auch Sequenzmotive in der näheren Umgebung der katalytischen Aminosäuren zur Klassifizierung herangezogen. Jeder Clan ist durch zwei Buchstaben gekennzeichnet, der erste repräsentiert

Einleitung

dabei den Katalyse-Typ der Enzymfamilien in diesem Clan. Der vorgestellte Buchstabe „P“ wird verwendet, wenn der Clan Familien vereint, die verschiedene Katalysemechanismen verwenden (Cys, Ser oder Thr). Grundsätzlich gibt es neben diesen Clans aus Familien mit gemischten (Cys, Ser, Thr) Katalysemechanismen auch solche, die sich aus den Familien der Cystein- (C), Serin- (S) oder Aspartat-Proteinase (A) zusammensetzen; daneben existieren Clans aus Familien der Metallo-Proteinase (M), aber auch solche, bei denen die katalytisch aktiven Aminosäuren der Enzyme noch unbekannt sind (U). Einige Familien sind bisher noch keinem Clan zugeordnet worden (symbolisiert durch „X“) und einige Clans sind weiter in Sub-Clans unterteilt.

Jeder Name einer Familie besteht aus nur einem Buchstaben (i.d.R. die Abkürzung des Nukleophils) gefolgt von einer arabischen Zahl. Einige Familien sind in Sub-Familien untergliedert, die durch die angehängten Buchstaben A, B, C, D, usw. gekennzeichnet werden. Einige Beispiele viraler Proteinase und ihrer Systematik gibt Tab. A2 wieder.

Tabelle A2: Beispiele viraler Proteinase und ihrer modernen Klassifizierung

Clan	Charakteristik	Familie	Virale Protease
P: Clans mit gemischten (Cys, Ser, Thr) Katalysemechanismen			
PA(C)	Cys als Nukleophil Katalytische AS in der Reihenfolge His-(Asp/Glu)-Cys	C3 A	3C-Proteinase von Entero- und Rhinoviren
		C3 B	2A-Proteinase von Entero- und Rhinoviren
		C3 E	3C-Proteinase von Hepatoviren
		C30	Main-Proteinase von Coronaviren
PA(S)	Ser als Nukleophil Katalytische AS in der Reihenfolge His-Asp-Ser	S7	NS3-Proteinase von Flaviviren
		S29	NS3-Proteinase von HCV und der GB-Viren
		S31	NS3-Proteinase von Pestiviren
		S32	nsp4-Serinproteinase von Arteriviren
S: Clans mit Serin-Proteinase			
SF	Serin als Nukleophil Ser-Lys/His	S50	Endopeptidase von Birnaviren
SH	Serin als Nukleophil His-Ser-His	S21	Assemblin von Herpesviren

Einleitung

C: Clans mit Cystein-Proteinasen			
CA	Cystein als Nukleophil His-Asp-Cys/Ser	C28	L-Proteinase von Aphthoviren
		C33	nsp2 von Arteriviren
CE	Cystein als Nukleophil His-Glu/Asp-Cys	C5	Proteinase des humanen Adenovirus 2
CX	Cystein als Nukleophil (keinem Clan zugeordnet)	C53	N ^{pro} der Pestiviren
M: Clans mit Metallo-Proteinasen			
MA(E)	Wasser als Nukleophil gebunden an Zn ²⁺ komplexiert an zwei His und Glu (HEXXH-Motiv)	M60	<i>Bacillus anthracis</i> (Milzbrand): Letalfaktor; keine virale Proteinase bekannt
MD	Wasser als Nukleophil gebunden an Zn ²⁺ komplexiert an His, Asp, His	M15C	ply-Endolysin von Phagen A118, A500, P27, PS3
ME	Wasser als Nukleophil gebunden an Zn ²⁺ komplexiert an zwei His und Glu (HXEH-Motiv)	M44	Metallo-Proteinase von Vacciniavirus
A: Clans mit Aspartat-Proteinasen			
AA	Wasser als Nukleophil gebunden an zwei Asp	A2	Proteinase der Retroviren (z.B. HIV)
AB	Wasser als Nukleophil gebunden an Asp und Asn	A6	Nodavirus-Peptidase
U: Clans mit unbekanntem katalytischen Mechanismus			
U	Unbekannter Mechanismus der Katalyse	U9	prohead-Proteinase des T4-Phagen
		U39	NS2-3-Proteinase von HCV

Die Art der für die eigentliche Katalyse verwendeten chemischen Gruppen ist die Grundlage der Klassifizierung der Proteasen in solche vom Cystein-, Serin-, Threonin-, Aspartat- oder Metallo-Typ. Bei den Cystein-, Serin- und Threonin-Proteasen wird das katalytische Nukleophil direkt von einer reaktiven Gruppe einer Aminosäuren-Seitenkette gebildet; dabei handelt es sich entweder um eine Hydroxylgruppe bei Serin- und Threonin-Proteasen oder um eine Sulfhydrylgruppe bei Cystein-Proteinasen. Bei Aspartat- und Metallo-Proteasen dient ein aktiviertes Wassermolekül als Nukleophil; bei ersteren wird das Wassermolekül direkt von den Seitenketten der Aspartate

Einleitung

fixiert, bei Metallo-Proteinasen dienen hierzu ein oder zwei Metallionen (Zink, Kobalt oder Magnesium), die wiederum von geladenen Aminosäuren-Seitenketten fixiert werden.

Die viruskodierten Proteasen haben meist sowohl als diskrete, prozessierte Proteine als auch als Domänen innerhalb der größeren Vorläuferproteine eine proteolytische Aktivität. Hierbei können auch die proteolytisch aktiven Vorläuferproteine ihrerseits Prozessierungsprodukte sein, man spricht dann vom Vorliegen einer proteolytischen Kaskade; die Präferenzen der Proteasen können sich dabei, je nach dem in welchem Kontext eines Vorläuferproteins sie sich befinden, bezüglich der Spaltstellen unterscheiden. Auch durch die Bindung anderer viraler oder zellulärer Proteine oder Nukleinsäuren kann die Aktivität oder Substratspezifität modifiziert werden. Es ist ebenso möglich, dass die Aktivierung einer viralen Protease verzögert wird, bis bestimmte an die Umgebung gestellte Voraussetzungen vorliegen (wichtig z.B. bei der Kapsid-Morphogenese). Oftmals sind die Enzyme sowohl in cis (d.h. intramolekular; Enzym und Substrat auf dem gleichen Molekül) als auch in trans (d.h. intermolekular; Enzym und Substrat auf zwei getrennten Molekülen) aktiv.

4.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchungen zur Prozessierung von NS2-3 des BVDV stehen im Zentrum dieser Arbeit. Dieser Prozessierungsschritt ist von entscheidender Bedeutung, da das Auftreten von großen Mengen an freiem NS3 mit gesteigerter viraler RNA-Synthese und Zytotoxizität nach der Infektion von Zellen korreliert. Bei einigen cp BVDV-Stämmen mit Duplikationen, Insertionen oder Deletionen sind entweder N^{pro} oder zelluläre Proteasen als verantwortliche Enzyme identifiziert und der Mechanismus der NS3-Synthese damit aufgeklärt worden. Jedoch gibt die bei noncp Stämmen des BDV und CSFV beobachtete geringgradige Spaltung von NS2-3, sowie der Mechanismus der NS2-3-Prozessierung bei einigen cp BVDV-Stämme, wie CP7 oder Oregon, noch Rätsel auf. Auch der Mechanismus, der zur NS2-3-Spaltung bei noncp BVDV in Anwesenheit von Jiv oder Jiv90 führt, ist bislang ungeklärt. In all diesen Fällen wurde eine Protease im NS2 postuliert, einem viralen Nichtstrukturprotein, für das bisher noch keine Funktion bekannt war. Diese Protease sollte nach den Voraussagen bei noncp BVDV prinzipiell inaktiv sein; sie könnte aber beispielsweise durch Punktmutationen (cp BVDV Oregon), Insertionen (cp BVDV CP7) oder auch durch Jiv/Jiv90 in einen aktivierten Zustand versetzt werden und dann die Spaltung von NS2-3 katalysieren. Daraus leiteten sich drei die NS2-3-Prozessierung betreffenden Fragestellungen ab, die im Zuge dieser Arbeit bearbeitet wurden:

1. Existiert eine Protease im NS2 des BVDV-Stammes CP7, die für die NS2-3-Spaltung verantwortlich ist?
2. Ist dieses putative Enzym auch im Kontext von noncp BVDV aktiv und wird diese Enzymfunktion zur Virus-Replikation benötigt?
3. Welche Rolle spielt das zelluläre Protein Jiv bei der Prozessierung von NS2-3?

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

1 kb-DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
¹⁴ C-methylierte Proteine als Molekulargewichts-Standard	Amersham, Freiburg
³² P Orthophosphat	Amersham, Freiburg
³⁵ S-Methionin	Amersham, Freiburg
³⁵ S-Methionin und -Cystein (ProMix)	Amersham, Freiburg
Acridinorange	Fluka, Schweiz
Acrylamid:N,N'-Methylen-bisacrylamid 29:1; 40% (w/v)	AppliChem, Darmstadt
Agarose ultraPURE™	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Biotin (B-4639)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	BioRad, München
Desoxycholat	Fluka, Schweiz
DMEM ohne Methionin, Cystein und Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat)	Merck, Darmstadt
Enlightning Lösung „Amplify“ (Fluorographie-Lösung)	Amersham, Freiburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Fluka, Schweiz
Ethanolamin	Fluka, Schweiz
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Österreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Fluka, Schweiz
Glyoxal	Fluka, Schweiz
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HPR I (Ribonuclease Inhibitor Human Placenta)	TaKaRa, Frankreich
Hypoxantin	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	ICN, Eschwege
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
L-Alanin, L-Aspartat, L-Glutamat, L-Prolin	Fluka, Schweiz
Magermilchpulver	DE-VAU-GE Gesundheitswerk
Methanol	Fluka, Schweiz
Minimum Essential Medium Eagle, phosphatfrei	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt
N-octyl-β-D-glucopyranosid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Material und Methoden

NP-40 (Nonidet P 40, Nonylphenyl-polyethylenglycol)	Fluka, Schweiz
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
Orange-G	Fluka, Schweiz
Paraformaldehyd	Fluka, Schweiz
Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid, Hydrochlorid) als Serinprotease-Inhibitor	Roche, Mannheim
Penicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenolrot	Fluka, Schweiz
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-G-Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti-Blot® A und Roti-Blot® K Anoden- bzw. Kathodenpuffer für Western Blot	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol®	Roth, Karlsruhe
SDS	ICN, Eschwege
SequaGel® XR Monomer Solution und SequaGel® Complete Buffer (für Sequenzgele)	National diagnostics, Atlanta, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Superfect Transfektions-Reagenz	Qiagen, Hilden
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tricin	ICN, Eschwege
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Schweiz
Trypan Blau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser, doppelt destilliert	Roth, Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	ICN, Eschwege
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

Die hier nicht alle im Einzelnen aufgelisteten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Material und Methoden

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Duralon-UV™ Membran	Fa. Stratagene
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Handschuhe rotiprotect® LATEX und rotiprotect® NITRIL	Fa. Roth
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Nitrocellulose-Membran Optitran BA-S83 reinforced NC™	Fa. Schleicher & Schüll
PVDF Membran Sequi-Blot™ for protein sequencing (0,2 µm)	Fa. Bio-Rad
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Röntgenfilme Biomax™	Fa. Kodak

5.1.3 Geräte

Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Fa. Forma Scientific; Fa. Labotec
Digitalkamera FView®	Fa. Soft Imaging System (SIS)
DNA-Sequenzierer	LI-COR 4000 L; Fa. Licor
Elektroporationsapparatur	Fa. BioRad
Elektroporationsküvetten (2 mm)	Fa. Molecular BioProducts
Gel-Dokumentationssystem	Fa. MWG
Gelelektrophoresekammern für Agarosegele (DNA und RNA)	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Glaswaren	Fa. Schott
Heizblöcke	Fa. Eppendorf und Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Kühl- und Gefrierschränke	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA-Werke
Nass-Blot-Apparatur: TransBlot Cell	Fa. BioRad
Phosphorimager Typhoon 9200	Fa. Amersham
Phosphorimager imaging plates BAS III	Fa. Fuji
Photometer	Fa. Pharmacia
Pipetten	Fa. Gilson
Proteingelelektrophoresekammern	Fa. Hoefer und Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Reinstwasseranlage	Fa. Purolab
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Fa. Protec
Schüttler	Fa. Janken und Kunkel
Semi-Nass-Blot-Apparatur (Semi-dry)	Fa. BioRad
Spannungsgeräte	Fa. Biometra
Sterilbank	Fa. Kendro
Thermocycler	Fa. Techne
Tischzentrifuge: Biofuge Pico	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge für 15 und 50 ml Gefäße: Biofuge primo	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge, gekühlt: Biofuge fresco	Fa. Heraeus
Vortexer	Fa. IKA
Waagen	Fa. Mettler

Material und Methoden

5.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Biotherm (Taq-Polymerase)	Natu-Tec, Frankfurt
Klenow-Fragment	NEB, Schwalbach
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; NEB, Schwalbach; Promega, Mannheim; TaKaRa, Frankreich
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	TaKaRa, Frankreich

5.1.5 Kits

Nucleobond® AX100™ Säulen zur DNA Präparation aus Bakterien	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® RNA II Total RNA Isolation zur RNA Präparation aus eukaryontischen Zellen	Macherey-Nagel, Düren
DNA Gel Extraction Kit zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Millipore, Bedford, USA
p-GEM®-T Vektor System I zur Klonierung von PCR Produkten	Promega, Madison, USA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus für die Auswertung von Western Blots	PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA
MAXIscript™ SP6 zur in-vitro Transkription von Plasmid-DNA in RNA	Ambion® Inc., Austin, Texas, USA
BC-Assay protein quantification kit zur Bestimmung der Proteinmengen nach Reinigung von Antikörpern	Fa. Uptima, Frankreich
HiTrap Protein-G HP affinity columns (1 ml) zur Aufreinigung von Antikörpern	Amersham Biosciences , Freiburg

Material und Methoden

5.1.6 Antikörper

Code4	monoklonaler Antikörper gegen NS3 (α NS3-mAk); erkennt ein Epitop im viralen NS3 und NS2-3-Protein bei allen bisher untersuchten Spezies aus dem Genus Pestivirus; zur Verfügung gestellt von E. J. Dubovi (New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA; (Corapi et al., 1988))
Anti-flag M2	monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen das flag-Epitop „DYKDDDDK“ (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Anti-GST	monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen Glutathion-S-Transferase (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Anti-myc	monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen das myc-Epitop „EQKLISEEDL“ (Cell Signaling Technology, Inc.)
Cy3-konjugierter Anti-Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus und mit Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugiert (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA)
Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Anti-Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus und mit dem Enzym Peroxidase konjugiert (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA)

5.1.7 Basis-Plasmide

pCITE-2A	Enthält die IRES des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) nach einem T7-RNA-Polymerase-Promotor; die IRES verstärkt die cap-unabhängige Transkription im MVA-T7pol-Vacciniavirus-Expressionssystem; bezogen von Novagen, Madison, USA
pCITE-GST	Basiert auf pCITE-2A und kodiert zwischen EMCV-IRES und Polylinker zusätzlich für Glutathion-S-Transferase (Tautz et al., 2000)
pGEM-T	Zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen; bezogen von Promega, Madison, USA
pNCP7-5A	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von noncp BVDV NCP7; bereits beschrieben (Becher et al., 2000)
pCP7-5A	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von cp BVDV CP7; bereits beschrieben (Baroth et al., 2000)
pC/E2-NS4A	Basiert auf pCITE-2A und kodiert nach einer fremden Signalsequenz (Harada et al., 2000) für die Aminosäuren 693 bis 2343 des Polyproteins von cp BVDV CP7 (NS2-NS4A i+); bereits beschrieben (Rinck et al., 2001)
pN/E2-NS4A	Entspricht pC/E2-NS4A, allerdings wurde die CP7-spezifische 27nt große Insertion im NS2 deletiert (CP7 i-) (Rinck et al., 2001); kodiert für NS2-NS4A i-
pFlagNS2	Basiert auf pCITE-2A und kodiert hinter dem Startkodon (M) für das flag-Epitop (DYKDDDDK) gefolgt von einem Leucin und NS2 von BVDV CP7i- (AS 1137-1589) (Rinck et al., 2001)

5.1.8 NS2-Punktmutanten mit stillen Marker-Schnittstellen für Restriktionsenzyme

Name	RE-Site (silent)	Name	RE-Site (silent)
pC/E2-NS4A C1220S	<i>Bam</i> HI	pC/E2-NS4A C1487S	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A C1220A	<i>Sspl</i>	pC/E2-NS4A C1487A	<i>Nrul</i>
pC/E2-NS4A C1372S	<i>Xho</i> I	pC/E2-NS4A C1487E	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A C1372A	<i>Ha</i> ell	pC/E2-NS4A C1487H	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A H1394A	<i>Bss</i> HII	pC/E2-NS4A C1490S	<i>Nde</i> I
pC/E2-NS4A H1394R	<i>Fspl</i>	pC/E2-NS4A C1490A	<i>Alw</i> NI
pC/E2-NS4A H1447A	<i>Fspl</i>	pC/E2-NS4A C1490E	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A H1447C	<i>Fspl</i>	pC/E2-NS4A C1490H	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A H1447D	<i>Aat</i> II	pC/E2-NS4A C1491A	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A H1447E	<i>Xmn</i> I	pC/E2-NS4A C1500S	<i>Eco</i> RI
pC/E2-NS4A H1447R	<i>Fspl</i>	pC/E2-NS4A C1500A	<i>Bsm</i> I
pC/E2-NS4A H1447Y	<i>Fspl</i>	pC/E2-NS4A C1500E	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A E1460A	<i>Nhe</i> I	pC/E2-NS4A C1500H	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A E1461A	<i>Bst</i> Z17I	pC/E2-NS4A C1503S	<i>Nar</i> I
pC/E2-NS4A E1461C	<i>Bst</i> Z17I	pC/E2-NS4A C1503A	<i>Bgl</i> I
pC/E2-NS4A E1461D	<i>Bst</i> Z17I	pC/E2-NS4A C1503E	<i>Aat</i> II
pC/E2-NS4A E1461H	<i>Bst</i> Z17I	pC/E2-NS4A C1503H	Verlust von <i>Not</i> I
pC/E2-NS4A E1461Q	<i>Bst</i> Z17I	pC/E2-NS4A I1511T	<i>Bgl</i> I
pC/E2-NS4A E1462A	<i>Pvu</i> II	pC/E2-NS4A C1512S	<i>Nhe</i> I
pC/E2-NS4A E1462C	<i>Nhe</i> I	pC/E2-NS4A C1512A	<i>Nhe</i> I
pC/E2-NS4A E1462D	<i>Aat</i> II	pC/E2-NS4A C1512E	<i>Nhe</i> I
pC/E2-NS4A E1462H	<i>Nhe</i> I	pC/E2-NS4A C1512H	<i>Nhe</i> I
pC/E2-NS4A E1462Q	<i>Bst</i> Z17I	pC/E2-NS4A C1512T	<i>Nhe</i> I
pC/E2-NS4A C1476S	<i>Sal</i> I	pC/E2-NS4A C1512Y	<i>Nhe</i> I
pC/E2-NS4A C1476A	<i>Dra</i> I	pC/E2-NS4A E1520A	<i>Nhe</i> I
pC/E2-NS4A H1483A	<i>Hind</i> III	pC/E2-NS4A E1521A	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A H1483C	<i>Nde</i> I	pC/E2-NS4A H1523A	<i>Bss</i> HII
pC/E2-NS4A H1483E	<i>Nde</i> I	pC/E2-NS4A E1531A	<i>Sspl</i>
pC/E2-NS4A C1484S	<i>Nde</i> I	pC/E2-NS4A E1541A	<i>Hind</i> III
pC/E2-NS4A C1484A	<i>Nde</i> I	pC/E2-NS4A E1541D	<i>Bgl</i> I
pC/E2-NS4A C1484E	<i>Nde</i> I	pC/E2-NS4A E1541H	<i>Bgl</i> I
pC/E2-NS4A C1484H	<i>Nde</i> I	pC/E2-NS4A E1541Q	<i>Bgl</i> I

Material und Methoden

5.1.9 BVDV-CP7-Expressionsplasmide auf Basis des pCITE-2A

Name	Kodierender Bereich		
	N-terminal	BVDV Sequenz (AS nach SD-1)	C-terminal
pFlagNS2-3/1645GST	MDYKDDDDKL	1137-1645	F-GST
pFlagNS2-3/1645GST C1512A	MDYKDDDDKL	1137-1645 C1512→A	F-GST
pFlagNS2-3/1645GST R1589P	MDYKDDDDKL	1137-1645 R1589→P	F-GST
pFlagNS2-3/1645GST G1590P	MDYKDDDDKL	1137-1645 G1590→P	F-GST
p1210/NS2-3/1645GST	M	1210-1645	F-GST
p1272/NS2-3/1645GST	M	1272-1645	F-GST
pFlagNS2-3/1599GST	MDYKDDDDKL	1137-1599	F-GST
pFlagNS2-3/1596GST	MDYKDDDDKL	1137-1596	F-GST
pFlagNS2-3/1595GST	MDYKDDDDKL	1137-1595	F-GST
pFlagNS2-3/1596-Met-GST	MDYKDDDDKL	1137-1596	MLTMAM-GST
pFlagNS2-4A i+	MDYKDDDDKL	1137-2343 mit 9aa Insertion des CP7 im NS2	-
pFlagNS2-4A i-	MDYKDDDDKL	1137-2343 ohne 9aa Insertion im NS2	-
pGST-NS2	MPGEF-GST	1137-1589	-
pGST-NS2 A	MPGEF-GST	1137-1235	-
pGST-NS2 B	MPGEF-GST	1236-1333	-
pGST-NS2 C	MPGEF-GST	1334-1433	-
pGST-NS2 D	MPGEF-GST	1434-1531	-
pGST-NS2 E	MPGEF-GST	1532-1589	-
pFlag NS2 CD	MDYKDDDD KLEPGEF	1334-1531	-
pMycMBP NS2 D	MPEQKLISEEDLA- MBP	1434-1531	-
pMycMBP NS2 E	MPEQKLISEEDLA- MBP	1532-1589	-
pGST-NS2 1450-1515	GST	1450-1515	
pGST-NS2 1470-1515	GST	1470-1515	
pGST-NS2 1490-1515	GST	1490-1515	
pGST-NS2 1450-1495	GST	1450-1495	
pGST-NS2 1470-1495	GST	1470-1495	
pGST-NS2 D C1487/90A	MPGEF-GST	1434-1531 C1487→A C1490→A	
pGST-NS2 D C1500/03A	MPGEF-GST	1434-1531 C1500→A C1503→A	
pGST-NS2 1540-1589	GST	1540-1589	

Material und Methoden

pGST-NS2 1550-1589	GST	1550-1589	
pGST-NS2 1560-1589	GST	1560-1589	
pGST-NS2 1570-1589	GST	1570-1589	
pGST-NS2 1537-1579	GST	1537-1579	
pGST-NS2 1537-1570	GST	1537-1570	
pGST-NS2 1537-1560	GST	1537-1560	
pGST-NS2 1537-1550	GST	1537-1550	
pMyc NS2-4A	MPEQKLISEEDLA	1137-2343	-

5.1.10 Jiv-Expressionsplasmide auf Basis des pCITE-2A

Name	Kodierender Bereich		
	N-terminal	Jiv Sequenz (AS)	C-terminal
pGST-Jiv90	GST	533-622	-
pGST-Jiv90 C2A	GST	533-622 C534→A	-
pGST-Jiv90 C2S	GST	533-622 C534→S	-
pGST-Jiv90 C24A	GST	533-622 C556→A	-
pGST-Jiv90 C24S	GST	533-622 C556→S	-
pGST-Jiv90 ΔN5	GST	538-622	-
pGST-Jiv90 ΔN10	GST	543-622	-
pGST-Jiv90 ΔN20	GST	553-622	-
pGST-Jiv90 ΔN30	GST	563-622	-
pGST-Jiv90 ΔN40	GST	573-622	-
pGST-Jiv90 ΔN50	GST	583-622	-
pGST-Jiv90 ΔN60	GST	593-622	-
pGST-Jiv90 ΔC5	GST	533-617	-
pGST-Jiv90 ΔC10	GST	533-612	-
pGST-Jiv90 ΔC20	GST	533-602	-
pGST-Jiv90 ΔC30	GST	533-592	-
pGST-Jiv90 ΔC40	GST	533-582	-
pGST-Jiv90 ΔC50	GST	533-572	-
pGST-Jiv90 ΔC60	GST	533-562	-
pGST-Jiv90 ΔN40/ΔC30	GST	573-592	-
pGST-Jiv90 aa11/12	GST	533-622 R543+F544→AA	-
pGST-Jiv90 aa13/14	GST	533-622 E545+M546→AA	-
pGST-Jiv90 aa15/16	GST	533-622 D547+R548→AA	-
pGST-Jiv90 aa17/18	GST	533-622 E549+P550→AA	-
pGST-Jiv90 aa19/20	GST	533-622 K551+S552→AA	-
pGST-Jiv90 aa22/23	GST	533-622 554+Y555→AA	-
pGST-Jiv90 aa24/25	GST	533-622 C556→A	-
pGST-Jiv90 aa26/27	GST	533-622 E558+C559→AA	-
pGST-Jiv90 aa28/29	GST	533-622 N560+R561→AA	-
pGST-Jiv90 aa30/31	GST	533-622 L562+H563→AA	-
pGST-Jiv90 aa32/33	GST	533-622 P564+A565→AA	-
pGST-Jiv90 aa34/35	GST	533-622 E566+E567→AA	-
pGST-Jiv90 aa36/37	GST	533-622 G568+D569→AA	-

Material und Methoden

pGST-Jiv90 aa38/39	GST	533-622 F570+W571→AA	-
pGST-Jiv90 F38A	GST	533-622 F570→A	-
pGST-Jiv90 W39A	GST	533-622 W571→A	-
pGST-Jiv90 aa41/42	GST	533-622 E573+S574→AA	-
pGST-Jiv90 aa43/44	GST	533-622 S575+M576→AA	-
pGST-Jiv90 aa45/46	GST	533-622 L577+G578→AA	-
pGST-Jiv90 aa47/48	GST	533-622 L579+K580→AA	-
pGST-Jiv90 aa49/50	GST	533-622 I581+T582→AA	-
pGST-Jiv90 aa51/52	GST	533-622 Y583+F584→AA	-
pGST-Jiv90 aa53/54	GST	533-622 A585+L586→AA	-
pGST-Jiv90 aa55/56	GST	533-622 M587+D588→AA	-
pGST-Jiv90 aa57/58	GST	533-622 G589+K590→AA	-
pGST-Jiv90 aa59/60	GST	533-622 V591+Y592→AA	-
pGST-Jiv90 Y51A/F52/Y60A	GST	533-622 Y583+F584+Y592→AAA	-
pGST-Jiv90 aa61/62	GST	533-622 D593+I594→AA	-
pGST-Jiv90 D61A	GST	533-622 D593→A	-
pGST-Jiv90 I62A	GST	533-622 I594→A	-
pGST-Jiv90 aa63/64	GST	533-622 T595+E596→AA	-
pGST-Jiv90 aa65/66	GST	533-622 W597 →A	-
pGST-Jiv90 aa67/68	GST	533-622 G599+C600→AA	-
pGST-Jiv90 aa69/70	GST	533-622 Q601+R602→AA	-
pGST-Jiv90 aa71/72	GST	533-622 V603+G604→AA	-
pGST-Jiv90 aa73/74	GST	533-622 I605+S606→AA	-
pGST-Jiv90 aa75/76	GST	533-622 P607+D608→AA	-
pGST-Jiv90 aa77/78	GST	533-622 T609+H610→AA	-
pGST-Jiv90 aa79/80	GST	533-622 R611+V612→AA	-
pGST-Jiv90 a81	GST	533-622 P613→A	-
pGST-Jiv90 a81	GST	533-622 Y614→A	-
pGST-Jiv90 a81	GST	533-622 H615→A	-
pGST-Jiv90 a81	GST	533-622 I616→A	-
pGST-Jiv90 a81	GST	533-622 S617→A	-
pJiv-C-flag	MG	533-699	PPDYKDD DDK

Material und Methoden

5.1.11 Gesamtklone

pNCP7-5A H1447A	Basiert auf pNCP7-5A; Punktmutation H1447→A
pNCP7-5A C1512A	Basiert auf pNCP7-5A; Punktmutation C1512→A
pCP7-5A H1447A	Basiert auf pCP7-5A; Punktmutation H1447→A
pCP7-5A E1462A	Basiert auf pCP7-5A; Punktmutation E1462→A
pCP7-5A C1484A	Basiert auf pCP7-5A; Punktmutation C1484→A
pCP7-5A C1503A	Basiert auf pCP7-5A; Punktmutation C1503→A
pCP7-5A C1512A	Basiert auf pCP7-5A; Punktmutation C1512→A
pCP7-5A C1512S	Basiert auf pCP7-5A; Punktmutation C1512→S
pCP7-5A C1589P	Basiert auf pCP7-5A; Punktmutation C1589→P

5.1.12 *E. coli* K12-Stämme

DH5 α	Für Klonierungen in pGEM-T, da dieser Stamm eine β -Galaktosidase Blau-Weiß-Selektion erlaubt
HB101	In allen anderen Fällen

5.1.13 Eukaryontische Zellen

BHK	Baby Hamster Kidney Zellen, Klon BSR, erhalten von J. Cox, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
MDBK	Marbin Darby Bovine Kidney Zellen, bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA

5.1.14 Viren

CP7	cp BVDV-1 Stamm CP7, erhalten von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaca, New York, USA; (Corapi et al., 1988)
NCP7	noncp BVDV-1 Stamm NCP7, erhalten von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaca, New York, USA; (Corapi et al., 1988)
NCP1	noncp BVDV-1 Stamm NCP1, erhalten von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaca, New York, USA; (Corapi et al., 1988)
MVA	Rekombinantes Vacciniavirus-MVA-(Modified Vaccinia Ankara)-T7pol, erhalten von G. Sutter, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Oberschleißheim (Sutter et al., 1995); Vermehrung am Institut für Virologie der JLU Gießen durch K. Müller

Material und Methoden

5.1.15 Lösungen und Puffer

Lösung	Verwendung	Zusammensetzung (Lösungsmittel ist ddH ₂ O, sofern nichts anderes angegeben ist)
10xLongRun-Konzentrat	Sequenzierung	162 g Tris; 27,5 g Borsäure; 9,3 g EDTA-Na ₂ ; mit ddH ₂ O auf 1 l
Anodenpuffer	SDS-PAGE	200 mM Tris/HCl pH 8,9
BFA-34	Zellkultur	4,5 g/l DMEM-Pulver; 200 µM L-Alanin; 225 µM L-Aspartat; 933 µM Glycin; 510 µM L-Glutamat; 217 µM L-Prolin; 184 µM Hypoxantin; 0,1 mg/l Biotin; 44 mM NaHCO ₃
Coomassie-Brilliant-Blue	SDS-PAGE	0,25 % Coomassie Blau; 45 % Methanol; 10 % Essigsäure
dNTP-Lösung	PCR	jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Entfärbelösung	SDS-PAGE	45 % Methanol; 10 % Essigsäure
Fixierlösung	SDS-PAGE	30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Gelpuffer	SDS-PAGE	1 M Tris/HCl pH 8,45; 0,1 % (w/v) SDS
gesättigtes Phenol	Plasmid-DNA Reinigung	Roti-Phenol, gesättigt mit 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; 0,1 % (w/v) Hydroxychinolin
Hungermedium	Radioimmunpräzipitation	Dulbecco's modified Eagle's medium ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure (Sigma-Aldrich); 1 % (v/v) 100x Glutamax-Lösung (Invitrogen)
Kathodenpuffer	SDS-PAGE	100 mM TrisHCl pH 8,25; 100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
LB Medium	Flüssigkultur für Bakterien	1 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; auf pH 7,5 mit NaOH
LB ⁺⁺ Medium	Kompetente Bakterien	20 mM MgSO ₄ und 10 mM KCl in LB Medium
P1	Plasmid-DNA Präparation	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mg/l RNase A
P2	Plasmid-DNA Präparation	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
P3	Plasmid-DNA Präparation	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
PBS	Zellkultur	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; auf pH 7,4 mit HCl
PBS ⁺⁺	Immunfluoreszenz	0,49 mM MgCl ₂ ; 0,68 mM CaCl ₂ in PBS
PBS-Tween	Western-Blot	0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS
50x-Phosphat-Puffer	RNA-Gele	250 mM Na ₂ HPO ₄ ; 250 mM NaH ₂ PO ₄ ; auf pH 6,8 mit NaOH (entspricht 0,5 M Phosphat-Konzentration)
Probenpuffer	Agarosegel-Elektrophorese	0,1 % (w/v) Orange-G; 30 % Glycerin
Protein-A-Sepharose Suspension	Radioimmunpräzipitation	25 % (v/v) gequollene Protein-A-Sepharose in RIPA-Puffer; 1 mM NaN ₃
Puffer A	RT-PCR	125 mM Tris pH 8,3; 187,5 mM KCl; 7,5 mM MgCl ₂ ; 25 mM DTT; 1,25 mM dNTPs
Puffer B	RT-PCR	25 mM Tris pH 8,3; 100 mM KCl; 6,5 mM MgCl ₂ ; 1,25 mM dNTPs; 0,5 % Triton X100; 0,1 % BSA

Material und Methoden

RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitation	150 mM NaCl; 1 % (v/v) NP-40; 0,5 % (w/v) Desoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl pH 8,0
SDS-Lysepuffer	SDS-PAGE	2 % (w/v) SDS; 6 M Harnstoff; 10 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Stop-Lösung	Sequenzierung	20 mM EDTA pH 8,0 und 300 mg/l Bromphenolblau in deionisiertem Formamid
TAE-Puffer	Agarosegel-Elektrophorese	2 % (v/v) modifiziertes TAE-Puffer-Konzentrat (50x Modified Tris-Acetate EDTA buffer, Millipore; 100 µg/l Ethidiumbromid
TfBI	Kompetente Bakterien	30 mM K-Acetat; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl ₂ ; 50 mM MnCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin; auf pH 5,8 mit Essigsäure; sterilfiltriert
TfBII	Kompetente Bakterien	10 mM MOPS; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM RbCl; 15% (v/v) Glycerin; auf pH 6,5 mit KOH; sterilfiltriert
Trypsin-Lösung	Zellkultur	2,5 g/l Trypsin; 16 mg/l Phenolrot; 3,3 mM EDTA in PBS
Western-Blot-Puffer	Nassblot	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,037 % (w/v) SDS

5.2 Methoden

5.2.1 Arbeiten mit DNA

Zahlreiche Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden in Zusammenarbeit mit der Medizinisch-Technischen Assistentin unserer Arbeitsgruppe, Sylvaine Jacobi, hergestellt. Vorläufer-Plasmide waren zum Teil aus vorherigen Arbeiten von M. Zies, Dr. C. Birghan und Dr. G. Rinck bereits vorhanden.

5.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Präparation kompetenter *E. coli* Bakterien der Stämme HB101 und DH5 α erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 10 ml LB (Luria-Bertani) Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. 1 ml der Bakteriensuspension diente am nächsten Morgen zum Beimpfen von 100 ml LB⁺⁺ Medium. Die Inkubation unter Schütteln bei 37 °C erfolgte solange, bis die optische Dichte OD₆₀₀ einen Wert von 0,4 bis 0,55 erreichte. Die Bakteriensuspension wurde unter gelegentlichem Schwenken etwa 10 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend bei 3.000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 30 ml kaltem TfBI resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet in 4 ml TfBII gelöst. Die Suspension der kompetenten Bakterien wurde in 50 und 200 μ l Aliquots bei -70 °C gelagert.

5.2.1.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab zu analytischen Zwecken erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Zellen (Birnboim and Doly, 1979) und anschließender Präzipitation der Plasmid-DNA. Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, vermitteln alle eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin. Mit einer Einzelkolonie von einer Ampicillin-haltigen Agarplatte (1,5 % Agar-Agar in LB-

Material und Methoden

Medium; 50 mg/l Ampicillin) wurden 3 ml eines Ampicillin-haltigen (100 mg/l) LB-Mediums beimpft; die Flüssigkultur wurde unter Schütteln bei 37 °C für mindestens sechs Stunden oder über Nacht inkubiert. 1,5 ml der gewachsenen Kultur wurden bei 16.000 g für 30 sec abzentrifugiert und das Pellet danach in 200 µl eiskaltem P1 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 200 µl P2 vermischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl P3 erfolgte die Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 10 min. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und bei 16.000 g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol auf dem Heizblock bei 50 °C getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

5.2.1.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen und Konzentrationsbestimmung

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im größeren Maßstab zum Zwecke der weiteren Verwendung wurden die Anionen-Austauscher-Säulen Nucleobond® AX 100 und die mitgelieferten Puffer (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Im Regelfall wurde von einem Flüssigkulturvolumen von 50 ml ausgegangen; bei der Präparation von Gesamtklon-DNA wurde das Volumen der Flüssigkultur und aller Pufferlösungen verdoppelt.

Die Bakterien wurden in 4 ml S1 resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml S2 und vorsichtigem Mischen für 5 min bei Raumtemperatur lysiert; nach Zugabe von 4 ml S3 und Mischen lief die filtrierte Lösung durch eine mit 2,5 ml N2 äquilibrierte Säule. Nach dem Ablauf der Lösung wurde die Säule mit 10 ml N3 gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 3 ml N5 eluiert. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 3 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 45 min. Nach dem Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol und Trocknen des Pellets auf dem Heizblock bei 50 °C wurde die DNA in 210

μl ddH₂O aufgenommen.

Um den DNA-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurde die UV-Licht-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia-Biotech) gemessen; 4 μl der DNA-Lösung wurden hierzu mit 196 μl ddH₂O verdünnt und die Absorption durch diese Lösung, gegen reines Wasser als Referenz, bestimmt. Doppelsträngige DNA in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ ergibt bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Absorptionswert von 1. Ausgehend von diesen Werten und dem Verdünnungsfaktor von 50 ergab sich die DNA-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 2,5.

5.2.1.4 Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken

Die für die spezifische Spaltung von DNA-Molekülen eingesetzten Restriktionsendonukleasen der Klasse II dienen der bakteriellen Zelle in vivo zum Schutz vor fremder DNA, die z.B. durch Phagenbefall eingebracht werden kann. Diese unerwünschte Fremd-DNA wird fragmentiert und dadurch unschädlich gemacht; zelleigene DNA ist durch entsprechende DNA-Modifikationen (Methylierungen) vor dem Abbau geschützt. Die Endonukleasen bilden zusammen mit den Methylasen so genannte Restriktions-Modifikations-Systeme. Sowohl zur Analyse von DNA als auch für Klonierungszwecke wurden in dieser Arbeit Restriktionsenzym-Verdaue durchgeführt. Die hierfür verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Die Reaktionsbedingungen zum Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen richteten sich bezüglich der Auswahl des Puffers, der Inkubationstemperatur und der Inkubationsdauer nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers und eigenen Erfahrungen. Der Enzymanteil im Ansatz sollte 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Enzyme in glycerolhaltigen

Material und Methoden

Puffern aufbewahrt werden und zu hohe Glycerolkonzentrationen die Reaktion negativ beeinflussen können; in einigen Fällen führen zu hohe Enzym-Konzentrationen oder ungeeignete Puffer auch zu einem teilweisen Verlust der Spezifität des Enzyms (Stern-Aktivität).

Zur Analyse von Plasmid-DNA (analytischer Verdau) wurden 200 ng DNA aus Midi-Präparation oder 1-3 µl der Lösung aus Mini-Präparationen mit ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut. Die Auswahl des oder der Enzyme richtete sich nach dem analytischen Zweck (z.B. Überprüfen der Intaktheit von Schnittstellen nach Klonierung über diese Schnittstellen; Überprüfen auf Vorhandensein einer Marker-Schnittstelle nach Mutagenese etc.). Ein analytischer Verdau fand stets im 10 µl-Maßstab statt; hierzu wurde die DNA unter Zugabe von 10 % (v/v) eines passenden Puffers (meist NEB 10x Puffer 1, 2, 3 oder 4) und 1 % (v/v) BSA (NEB) durch Zugabe von 0,05-0,25 µl Restriktionsenzym (je Konzentration in U/µl) für etwa 15 min bei der Enzym-abhängigen optimalen Temperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese und UV-Durchleuchtung (s.u.).

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur weiteren Klonierung (präparativer Verdau) wurde mit 3-5 µg Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen in 60 µl Ansätzen nach dem gleichen Schema verfahren. Wenn immer möglich, wurden Klonierungstechniken mit Restriktionsenzymen bevorzugt, bei denen auf beiden Seiten der DNA-Fragmente kompatible 5'- oder 3'-Überhänge bestehen blieben (sticky-sticky-Klonierung). Auf diese Weise konnten intramolekulare Rück-Ligationen der Vektor-DNA reduziert und der erfolgreiche Einbau des Fragmentes in der gewünschten Orientierung mit intakten Übergängen sichergestellt werden. In einigen Fällen, z.B. wenn kompatible Schnittstellen der beiden Klonierungspartner fehlten, wurde auch mit glatten DNA-Enden (blunt-end) gearbeitet. Hierzu wurden Enzyme verwendet, die ein solches Ende ohne Überhang erzeugen (z.B. EcoR V)

Material und Methoden

oder der Überhang wurde mittels Zugabe von 0,5 µl Klenow-Fragment (DNA Polymerase I, großes Fragment; 50 U/µl; NEB) nach dem Verdau mit dem ersten Enzym abgebaut; hierzu wurde die Reaktion 5 min bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM) für weitere 15 min stehen gelassen. Alternativ wurde das Klenow-Fragment auch dazu genutzt, 5'-Überhänge der geschnittenen DNA in 5'→3'-Richtung aufzufüllen, um auf diese Weise ein glattes DNA-Ende zu erhalten.

Vor dem Schnitt mit dem zweiten Enzym musste das Klenow-Fragment durch Phenol-Chloroform Extraktion entfernt werden. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen gesättigtem Phenol (Roti-Phenol, gesättigt mit 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; 0,1 % (w/v) Hydroxychinolin) gründlich vermischt; nach Zentrifugation bei 16.000 g für 5 min wurden Phenol-Reste durch die Zugabe von einem Volumen Chloroform zur wässrigen Phase entfernt und das Gemisch erneut zentrifugiert (s.o.). Die DNA wurde durch die Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol und $\frac{1}{10}$ Volumen 4 M LiCl zur wässrigen Phase für 30 min bei -25 °C gefällt und anschließend bei 16.000 g und 4 °C ebenso lange abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol und erneuter Zentrifugation (16.000 g; 5 min) wurde das Pellet getrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

Um die intramolekulare Ligation der Molekülen eines geschnittenen Vektors ohne Einbau des Inserts zu verhindern, wurde bei Bedarf, vor allem aber bei Arbeiten mit einem glatten DNA-Ende, das geschnittene Vektor-Plasmid dephosphoryliert. Hierzu wurden nach dem Verdau der DNA 10 % (v/v) Dephosphorylierungs-Puffer (Roche, Mannheim) und 1 U Alkalische Phosphatase (CIP, calf intestine phosphatase; 1 U/µl; Roche, Mannheim) zugegeben und die Reaktion 5 min bei 37 °C inkubiert.

Die geschnittene DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und die entsprechende Bande unter UV-Durchleuchtung (312

nm) aus dem Gel ausgeschnitten (s.u.)

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

Zur Herstellung von TAE-Puffer diente das modifizierte TAE-Puffer-Konzentrat (50x Modified Tris-Acetate EDTA buffer, Millipore), das mit Wasser auf einfache Konzentration verdünnt und mit 100 µg/l Ethidiumbromid versetzt wurde. Das enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert dann bei Anregung durch UV-Licht (254 oder 312 nm Wellenlänge). Standardmäßig wurden Gele mit 0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet; bei kleinen DNA-Fragmenten (< 500 bp) lag die Agarosekonzentration bei 1,5 % (w/v); die Agaroselösung wurde nach dem Aufkochen bei 60 °C im Wasserbad gelagert. Vor dem Auftrag der DNA-Proben wurden diese im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer vermischt (0,1 % (w/v) Orange-G; 30 % Glycerin). Parallel zu den Proben wurde auf jedem Gel auch die 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen) als Größenstandard aufgetragen. Die Gel-Apparaturen aus der Werkstatt des Mehrzweckinstitutes (MZI) Gießen hatten einen Elektrodenabstand von 15 cm. Die Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer elektrischen Gleichspannung von 120 V für etwa 25 min. Die Fluoreszenz der Proben in analytischen Gelen wurde im UV-Durchlicht (254 nm Wellenlänge) betrachtet und computergestützt mittels des Systems GelPrint 2000i (MWG) durch Thermoausdruck dokumentiert.

Präparative Gele wurden zur Schonung der DNA (Vermeidung von Strangbrüchen) im UV-Durchlicht bei 312 nm Wellenlänge betrachtet, die gesuchten DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur weiteren Verwendung aus dem Gelfragment isoliert; hierzu dienten die Säulen des „DNA Agarose Gel Extraction Kit (Ultrafree DA)“, die nach Vorschrift des Herstellers (Millipore) eingesetzt wurden; nach einer zehninütigen Zentrifugation bei 3.500 g, bei der die festen Gelbestandteile in der Säule zurückgehalten werden, befindet sich die extrahierte DNA im

Filtrat und kann direkt weiter verwendet werden.

Vektor-DNA aus Gesamtklonen wurde ohne direkte UV-Durchleuchtung aus präparativen Gelen isoliert; hierzu diente ein Aliquot der geschnittenen DNA als Größenmarker; nach dem „blinden“ Ausschneiden des Fragmentes auf gleicher Höhe im Gel wurde der Erfolg erst nach der Isolierung im UV-Durchlicht begutachtet.

5.2.1.6 Ligation und Transformation in *E. coli*

Die isolierten Vektoren und Inserts (s.o.) wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (350 U/ μ l; TaKaRa) neu zusammengefügt. Dieses Enzym katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3'-OH mit der 5'-PO₄-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNA durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch.

Im Regelfall wurden 2 μ l Vektor-DNA-Lösung und 6,5 μ l Fragment-DNA-Lösung zusammen mit 1 μ l Ligase-Puffer (10x; TaKaRa) und 0,5 μ l T4-DNA-Ligase (TaKaRa) vermischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Im Falle einer Ligation mit drei DNA Fragmenten wurden 1,5 μ l Vektor- und jeweils 3,5 μ l Fragment-DNA-Lösungen eingesetzt. Zu jeder Ligation wurde parallel auch eine Religations-Kontrolle angesetzt; diese bestand aus den gleichen Komponenten wie der Ligations-Ansatz, jedoch wurde anstelle der Fragment-DNA-Lösung ddH₂O zugegeben. Diese Kontrolle diente später zur Abschätzung der Effizienz des Fragment-Einbaus im Vergleich zur intramolekularen Rückligation des Vektors.

Zur Transformation wurden jeweils 50 μ l transformationskompetenter *E. coli* K12 HB101 Bakterien nach dem Auftauen auf Eis zum Ligations- und Religationsansatz pipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min. Die Zellen wurden danach auf Eis abgekühlt und auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agar Platte (50 mg/l Ampicillin) ausplattiert. Die Inkubation bei 37 °C über Nacht erlaubte das Heranwachsen

von Kolonien.

Zum Zwecke der Retransformation bereits isolierter Plasmide (z.B. zur Vermehrung nach einer Mini-Präparation im Midi-Maßstab) wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren, allerdings genügte hierfür 1 µl Plasmid-Lösung und 10 µl *E. coli*-Suspension; die (re)transformierten Bakterien dienen dann sowohl zur direkten Animpfung einer Flüssigkultur als auch dem Plattieren auf einer Agarplatte.

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

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

Material und Methoden

Standardmäßig wurden PCRs zur späteren Klonierung der Produkte im 50 µl Maßstab durchgeführt. 30-50 ng des als Template dienenden Ausgangs-Plasmides wurden hierzu mit jeweils 0,5 µl beider Primerlösungen (100 pmol/µl), 1 µl dNTP-Lösung (jeweils 10mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 µl Puffer (10x Puffer Biotherm™), ddH₂O und 1 µl Biotherm™ DNA-Polymerase (5 U/µl) gemischt und im Thermocycler inkubiert: Eine zweiminütige Inkubation bei 40 °C vermied Kondensationen am Deckel der PCR Gefäße während der Aufheizphase der oberen Heizplatte. Anschließend erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min und dann 30 Zyklen aus Denaturierung (94°C, 30 sec), Hybridisierung (50-56 °C, 30 sec) und Synthese (72 °C, 1 min je kb); im letzten Zyklus wurde die Elongationszeit auf 5 min verlängert und die Reaktion anschließend auf 4 °C abgekühlt.

Solche PCR-Reaktionen wurden in dieser Arbeit vor allem dazu genutzt, um Verkürzungsstufen von NS2-3 und Jiv90 und die NS2-Fragmente herzustellen, oder um für Epitope kodierende (z.B. flag-Epitop) oder andere künstliche Sequenzen einzufügen. Sofern möglich, wurden die Primer für das 5'- und 3'-Ende des PCR-Produktes so gestaltet, dass der spätere Einbau in den Expressionsvektor so unkompliziert und mit so wenigen zusätzlich exprimierten Aminosäuren wie möglich vonstatten ging; meist wurde zum Einbau in pCITE-2A oder pCITE-GST 5'-terminal die *Nco*I und 3'-terminal die *Pst*I Schnittstelle benutzt. Die Restriktionsenzym-Schnittstelle von *Bsm*BI wurde gelegentlich verwendet, um am 5'-terminalen Ende von PCR Produkten beliebige 5'-Überhänge mit einer Länge von vier Nukleotiden nach Wunsch zu erzeugen, z.B. wenn die Verwendung anderer Enzyme aufgrund intern vorhandener Schnittstellen nicht möglich war. Auf diese Weise konnten bevorzugte Schnittstellen in der Vektor-DNA (v.a. die *Nco*I-Site von pCITE-2A und pCITE-GST mit dem 5'-Überhang CATG) auch in solchen Fällen zur Klonierung des Fragmentes verwendet und die Zahl zusätzlicher fremder

Material und Methoden

Aminosäuren im exprimierten Protein verringert werden. Das Design der zu bestellenden Oligonukleotide wurde mit Hilfe des GCG-Programm Paket (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) im HUSAR-System (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) bestimmt; hierbei fanden vorwiegend die Programme „seqed“ (Festlegung der Sequenz der Primer), „map“ (Überprüfen der Restriktionsenzym-Schnittstellen und Auffinden von stillen Schnittstellen) und „gap“ (Überprüfung der Homologie zur Matrize) Anwendung.

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

Das Ergebnis jeder (RT-)PCR wurde durch Agarosegel-Elektrophorese auf Größe und Reinheit des Produktes hin untersucht. Die amplifizierte DNA wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Durchlicht-Kontrolle (312 nm Wellenlänge) aus dem Gel ausgeschnitten und über die Säulen des „DNA Agarose Gel Extraction Kit (Ultrafree DA)“ zurückgewonnen (s.o.).

3 µl dieser DNA-Lösung wurden mit 1 µl pGEM-T Vektor (54 ng/µl), 5 µl des mitgelieferten 2-fachen Puffers und 1 µl (35 U) der mitgelieferten T4 DNA Ligase gemischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Der gesamte Ligations-Ansatz wurde zur Transformation von 50 µl einer Suspension mit

kompetenten *E. coli* DH5 α Bakterien verwendet, die eine β -Galaktosidase blau-weiß-Selektion erlauben. Das Gemisch aus Bakterien und Ligations-Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert; nach dem Hitzeschock (2 min bei 42 °C), Abkühlen auf Eis (2 min) und der Zugabe von 200 μ l LB-Medium wurden die Zellen für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Vor dem Ausplattieren auf einer Ampicillin-haltigen (50 mg/l) Agarplatte erfolgte die Zugabe von 20 μ l einer 4 %igen (w/v) X-Gal-Lösung.

5.2.1.8 Gerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden über die QuikChangeTM-Methode (Stratagene, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers in die entsprechenden Plasmide eingeführt. Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte ebenfalls nach den Empfehlungen von Stratagene: Zur Generierung einer Mutation werden immer zwei Oligonukleotide benötigt, die jeweils komplementär zum identischen Bereich beider Stränge der DNA-Matrize sind und die gewünschte Mutation tragen; diese Oligonukleotide sind in der Regel 30-40 bp lang, da sich zu beiden Seiten der Mutation noch etwa 15 Basen Matrizen-homologe Sequenz befinden sollte; der GC-Gehalt sollte über 40 % und die Schmelztemperatur (T_m) oberhalb von 78°C liegen. Meist enthielten die Oligonukleotide zusätzlich zur eigentlichen Mutation noch eine zusätzliche Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, deren Einbau keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins hatte (silent marker site); diese Schnittstelle erleichterte später die Analyse auf Vorhandensein der Mutation bei weiteren Klonierungsschritten.

Die beiden Oligonukleotide dienten als Primer in einer PCR-Reaktion mit dem wt-Plasmid als Matrize, in deren Verlauf das gesamte Plasmid mit der gewünschten Mutation amplifiziert werden konnte. Hierzu wurden im 50 μ l Ansatz zu ddH₂O 10-50 ng wt-Plasmid, 0,5 μ l von beiden Primern (100 pmol/ μ l), 1 μ l dNTP-Mix (jeweils 10 mM), 5 μ l Puffer (Pfu-Polymerase 10x buffer) und 1 μ l Pfu DNA Polymerase (2,5 U/ μ l; Promega) gegeben. Im

Material und Methoden

Thermocycler erfolgten 14-18 Zyklen mit 30 sec Denaturierung (95 °C), 1 min Hybridisierung (55 °C) und 2 min je kb Plasmidlänge Synthese (68 °C). Nach der Reaktion wurden 5 µl zur späteren Analyse abgenommen und der Rest nach Zugabe von 1 µl *DpnI* (10 U/µl) eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur methylierte, d.h. die aus Bakterien (*E. coli*) stammende DNA, nicht aber die während der PCR in vitro entstandene unmethylierte DNA; auf diese Weise wird die wt-Matrize zerstört. Nach dem Verdau mit *DpnI* wurde erneut eine 5 µl Probe aus der Reaktion entnommen und zusammen mit der ersten Probe über Agarosegel-Elektrophorese analysiert; eine kaum sichtbare oder nur schwache Reduktion der Signalstärke durch den *DpnI*-Verdau war ein Hinweis auf eine erfolgte DNA-Synthese. Die neu synthetisierte DNA ist wie die Ausgangs-DNA doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche an den Enden der jeweiligen eingebauten Primer auf. Erst nach Transformation der neu synthetisierten DNA in Bakterien erfolgt die „Reparatur“ dieser Brüche durch zelleigene Ligations-Mechanismen, was zur Entstehung eines intakten Plasmids führt.

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

5.2.1.9 Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen

Die enzymatische Methode zur Ermittlung von DNA-Sequenzen durch Kettenabbruch wurde 1977 entwickelt (Sanger et al., 1977). Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wird hierbei, ausgehend von einem Oligonukleotid als Primer, durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase in vier getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert. Jede dieser Reaktionen enthält sowohl ddH₂O, Puffer, DNA-Polymerase, einen Primer sowie alle vier dNTPs. In den einzelnen Reaktionsansätzen befinden sich neben diesen regulären

Material und Methoden

dNTPs in einem gewissen Verhältnis auch jeweils eine Sorte von deren 2'3'-Dideoxyanaloga (ddCTP, ddATP, ddTTP oder ddGTP). Diese Analoga werden von der Polymerase genauso in die entstehende DNA eingebaut wie die dNTPs, allerdings bricht die Kettenverlängerung nach einem ddNTP ab, da keine 3'-OH-Gruppe mehr zur Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbindung vorhanden ist. Da diese Kettenabbrüche statistisch verteilt erfolgen, werden DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge synthetisiert; in der ersten Reaktion sammeln sich alle Fragmente, die mit einem C enden, in der zweiten die mit A, in der dritten die mit T und in der letzten alle mit einem G am Ende. Die Auftrennung der DNA-Moleküle aus den einzelnen Proben in vier benachbarten Spuren eines hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgels erlaubt einen Nachweis der entstandenen Fragmente, auch wenn der Größenunterschied nur ein Nukleotid beträgt. Da der zur Reaktion verwendete Primer an einen Fluoreszenzfarbstoff (IRD-800, MWG-Biotech) gekoppelt ist, können die Fragmente durch Anregung über einen Laser und Detektion des emittierten Lichtes sichtbar gemacht und die Sequenzen softwaregestützt ausgelesen werden.

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

Material und Methoden

Das Auftrennen der Proben in 0,2 mm dicken Polyacrylamidgelen und die Detektion der Sequenzmuster erfolgte mit dem LI-COR 4000 LTM DNA-Sequencer (Licor). Lange Gele (66 cm) wurden für das Lesen von bis zu 1.200 Basen verwendet; kurze Gele (40 cm) für die Auftrennung von Fragmenten bis zu 800 Basen Länge. Nach Reinigung, Entfettung und Zusammenbau der Glasplatten wurde die Polyacrylamidlösung mittels Spritze durch einen 0,45 µm-Filter zwischen die Platten gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente eine 1:10 Verdünnung des 10xLongRun-Konzentrates. Die Polyacrylamidlösung für lange Gele (4 %) bestand aus 32 ml Sequagel® XR (national diagnostics), 8 ml Sequagel-Puffer, 2 ml 10xLongRun-Puffer, 15 ml H₂O, 8 g Harnstoff, 400 µl 10 %igem APS und 20 µl TEMED; für ein kurzes Gel kamen 30 ml Sequagel XR, 7,5 ml Sequagel-Puffer, 300 µl 10 %iges APS und 400 µl DMSO zum Einsatz. Die Gelsubstanz polymerisierte nach dem Gießen mindestens eine Stunde lang; danach wurden die Glasplatten von außen erneut gereinigt und zwischen die Elektroden des Sequenzers montiert. Nach dem Auffüllen der Elektroden-Tanks mit LongRun-Puffer folgte ein Vorlauf für 30 Minuten (Lange Gele: 2000 V, 37 mA, 50 W, 45 °C; kurze Gele: 1500 V, 37 mA, 50 W, 50 °C). Anschließend wurde der 48er-Haifischzahn-Kamm eingesteckt, in jede Aussparung 1 µl der entsprechenden Proben aufgetragen und die Hochspannung zu den gleichen Bedingungen wie beim Vorlauf wieder eingeschaltet. Durch die Software-Funktionen des Programms DataCollection „Autofocus“ und „Autogain“ wurde eine korrekte Justierung der Optik von Laser und Scanner sowie eine optimale Signal-Verstärkung sichergestellt und anschließend der Scanner eingeschaltet. Das virtuelle Gel-Abbild konnte schon während des Laufes betrachtet und später mittels zugehöriger Software (Programm ImageAnalysis) automatisch oder manuell ausgewertet werden.

Die Sequenzdateien wurden zusammen mit den zur Auswertung

Material und Methoden

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

5.2.2 Arbeiten mit Zellen

5.2.2.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken

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

Die Zellen wurden im Abstand von drei bis vier Tagen passagiert; hierzu wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit 4 ml Trypsin-Lösung kurz abgespült; nach Abnahme der Lösung und Inkubation bei 37 °C für einige Minuten konnten die Zellen durch leichtes Klopfen an den Schalenrand gelöst und vereinzelt werden. Nach Resuspension in 10 ml Zellkulturmedium wurde $\frac{1}{30}$ dieser Suspension in einer neuen Schale mit 10 ml Medium gemischt und wieder bei den oben genannten Bedingungen inkubiert.

Um Zellen der gewünschten Dichte für Experimente am nächsten Tag zur Verfügung zu haben, wurden diese nach der Trypsinbehandlung dichter ausgesät; in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte (pro Well 3,5 cm

Material und Methoden

Durchmesser) wurde hierzu etwa $1/25$ (BHK) oder $1/20$ (MDBK) der Zellsuspension einer 10 cm Schale mit dichtem Monolayer verwendet und auf 2 ml/Well Gesamtvolumen mit Medium verdünnt. Die zur Elektroporation von MDBK-Zellen benötigten dicht bewachsenen 10 cm Schalen konnten durch Aussäen dieser Zellen am Vortag im Verhältnis 1:4 erhalten werden.

5.2.2.2 T7-Vaccinia-Expression und metabolische Proteinmarkierung

Durch Infektion von BHK-Zellen mit rekombinantem MVA-T7pol-Vacciniavirus kommt es im Zytoplasma der Zellen zur Expression der T7-DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Nach anschließender Transfektion entsprechender Plasmide werden RNAs transkribiert, die unter Kontrolle des T7-Polymerase-Promotors stehen (Sutter et al., 1995). Da es durch die T7-Polymerase des Vacciniavirus nur zu einem uneffizienten capping der transkribierten RNAs kommt, wurden in dieser Arbeit Plasmide zur T7-Vaccinia-Expression verwendet, die auf dem Vektor pCITE basieren; dessen IRES verbessert die Effizienz der Translation der entstehenden mRNAs entscheidend.

Die zur Expression verwendeten BHK-Zellen wurden am Vortag im 6-Well-Format so ausgesät, dass am nächsten Tag ein optisch dichter Monolayer vorlag (s.o.). Die Infektion mit MVA-T7pol erfolgte in 1 ml FCS-freiem Medium für 1 h im Brutschrank mit einer MOI von 3. Zur Transfektion (in Form einer Lipofektion) der Expressionsplasmide wurde Superfect® Transfektions-Reagenz nach der Vorschrift des Herstellers (Qiagen) verwendet; dabei handelt es sich um eine kationische Trägersubstanz, die eine endosomale Aufnahme von DNA ermöglicht und den pH-Wert im Lysosom abpuffert, sobald die Fusion von Endosom und Lysosom stattgefunden hat, wodurch ein Transport der auf diese Weise stabilisierten DNA in die Zelle ermöglicht wird. 2 µg Plasmid-DNA, bei Doppeltransfektionen pro Plasmid 1,5 µg, wurden hierzu mit 70 µl Medium ohne FCS und Antibiotika vermischt; diese Lösung wurde mit 10 µl Superfect versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Material und Methoden

Nach Abschluss der Vacciniavirus-Infektion wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und durch 1 ml Zellkulturmedium mit FCS und Penicillin/Streptomycin ersetzt. Die Transfektionsansätze wurden anschließend zu den Überständen der Zellen pipettiert und durch Schwenken der Platte untergemischt.

Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und der Überstand durch 1 ml methionin- und cysteinfreies Hungermedium ersetzt (Dulbecco's modified Eagle's medium ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure (Sigma-Aldrich) mit Zusatz von 1 % (v/v) Glutamax-Lösung (Invitrogen)); die Inkubation in diesem Medium für eine Stunde führt zur Entleerung der intrazellulären Speicher dieser schwefelhaltigen Aminosäuren und erhöht die Effizienz der nachfolgenden metabolischen Markierung der Proteine. Nach einem erneuten Austausch des Mediums mit methionin- und cysteinfreiem DMEM erfolgte die Zugabe von 75 μCi ^{35}S -markiertem Methionin und Cystein (ProMix, Amersham). Die radioaktiv markierten Aminosäuren wurden durch Schwenken der Platte untergemischt, die Zellen für weitere drei Stunden im Brutschrank inkubiert und schließlich mit PBS gewaschen und mit 450 μl RIPA-Puffer unter Zusatz von 0,5 % (v/v) des Proteinase-Inhibitors Pefabloc-SC (Merck) unter Schwenken lysiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

5.2.2.3 Infektion von MDBK-Zellen und Markierung mit ^{35}S und ^{32}P

Zur Infektion wurden am Vortag in 35 mm Schalen ausgesäte MDBK-Zellen verwendet, die zum Zeitpunkt der Infektion eine optische Dichte von 60-80 % zeigten. Nach dem Abnehmen des Überstandes und dem Waschen mit 2 ml PBS wurden die Zellen bei einer MOI von 10 mit BVDV in 1 ml Überstandsvolumen aus FCS-freiem Medium infiziert. Nach einer Stunde wurde der Überstand wieder durch 2 ml FCS-haltiges Medium ersetzt.

Zur weiteren Analyse mittels Western Blot wurden die Zellen nach

Material und Methoden

unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe Ergebnisteil) in jeweils 500 µl SDS-Lysepuffer unter Zusatz von 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol lysiert und bei -20 °C gelagert.

Zur metabolischen Markierung synthetisierter Proteine in infizierten Zellen wurde das Medium, nach dem Waschen der Zellen mit PBS, eine halbe Stunde vor Beginn der Markierungs-Periode durch 1 ml methionin- und cysteinfreies DMEM (s.o.) ersetzt; nach erneutem Wechsel des Mediums erfolgte die Zugabe von 280 µCi ³⁵S-markiertem Methionin und Cystein (ProMix, Amersham) je Schale. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit jeweils 400 µl RIPA-Puffer mit Pefabloc-Zusatz (s.o.) unter Schwenken lysiert und die Proben bei -20 °C bis zur Immunpräzipitation gelagert.

Zur metabolischen Markierung viraler RNA in infizierten Zellen wurde das Medium, nach dem Waschen der Zellen mit PBS, eine halbe Stunde vor Beginn der Markierungs-Periode durch 1 ml phosphatfreies „Minimum Essential Medium Eagle“ (Sigma-Aldrich) ersetzt; gleichzeitig erfolgte die Zugabe von 2 µg/ml Dactinomycin (Sigma-Aldrich); dieser Inhibitor der zellulären RNA-Polymerasen verhindert die Synthese zelleigener mRNAs, hat jedoch keinen Einfluss auf die virale RNA-Replikation. Vor Beginn der radioaktiven Markierung mit 300 µCi ³²P Orthophosphat je Schale wurde dieses Medium noch einmal gewechselt. Die Markierung viraler RNA erfolgte anschließend für vier Stunden im Brutschrank, bevor die Zellen mit jeweils 350 µl RA1-Puffer (Nucleospin® RNA II Kit; Macherey-Nagel) unter Zugabe von 3,5 µl β-Mercaptoethanol lysiert wurden. Die Lagerung bis zur RNA-Präparation erfolgte bei -20 °C.

5.2.2.4 Elektroporation von MDBK-Zellen

Die Elektroporation ist neben der Lipofektion (s.o.) eine zweite Methode zur Transfektion eukaryontischer Zellen; infolge eines kurzen elektrischen

Material und Methoden

Impulses wird die Zellmembran kurzzeitig durchlässig und extrazellulär vorhandene RNA oder DNA kann ins Zytoplasma gelangen. Zum Einbringen von RNA in MDBK-Zellen ist die Elektroporation erfahrungsgemäß die geeignetste Methode und kam für diesen Zweck zur Anwendung (Tautz et al., 1999).

Für eine Elektroporation wurden vergleichbare Mengen an RNA, in der Regel etwa ein Drittel eines Transkriptions-Ansatzes (s.u.) und ein Drittel der Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm Zellkulturschale (etwa 1×10^6 Zellen) verwendet. Die Zellen einer 10 cm Schale wurden hierzu durch Trypsinbehandlung von dem Boden der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt, und in FCS-haltigem Medium resuspendiert, um Reste von Trypsin zu inaktivieren. Nach Zentrifugation bei 200 g für 5 min wurde das Pellet zweimal mit PBS gewaschen und schließlich wieder in 1,3 ml PBS aufgenommen. Pro Elektroporationsansatz wurden jeweils 400 µl dieser Zellsuspension auf Elektroporationsküvetten (Elektroden-Abstand: 2 mm) verteilt. Sofort nach Zugabe der RNA erfolgte der elektrische Puls (0,18 kV, 950 µF) und die elektroporierte Zellsuspension wurde in eine 3,5 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 2 ml FCS-haltigem Zellkulturmedium aufgefüllt.

5.2.2.5 Bestimmung des Virus-Titers von Zellkulturüberständen

Um den Titer von Zellkulturüberständen nach Elektroporation viraler RNA zu bestimmen, wurden MDBK-Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen des virushaltigen Überstandes in 96-Well-Mikrotiterplatten inkubiert und die Etablierung einer erfolgreichen Infektionen später über Immunfluoreszenz ausgewertet.

Beginnend mit einer Vorverdünnung des Überstandes in Zellkulturmedium von 1:10 oder 1:100 wurde der Verdünnungsfaktor in acht Stufen von Well zu Well jeweils um den Faktor 3 erhöht. Hierzu wurden in alle Wells 100 µl

Material und Methoden

Zellkulturmedium vorgelegt und jeweils 50 µl von einer Stufe zur nächsten weiter pipettiert; 50 µl aus der letzten Stufe wurden verworfen. Für jede Titerbestimmung wurde diese Verdünnungsreihe in vierfacher Ausführung durchgeführt.

Parallel wurden MDBK-Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm Zellkulturschale durch Trypsinbehandlung vereinzelt und in 30 ml Zellkulturmedium resuspendiert; zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 10 µl dieser Suspension mit 90 µl einer 0,01 % (w/v) Trypan-Blau Lösung vermischt und in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Kleinquadrat-Fläche: 0,0625 mm²; Höhe 0,2 mm) die durchschnittliche Anzahl von Zellen in einem Großquadranten bestimmt; die Zellzahl pro ml der Ausgangs-Suspension ergab sich durch Multiplikation dieses Wertes mit 3.100. Diesem Ergebnis entsprechend wurde die Suspension anschließend durch Verdünnung auf eine Dichte von 2 x10⁵ Zellen je ml eingestellt.

100 µl der verdünnten Zellen (2 x10⁴) wurden zu jedem Well der Virus-Verdünnungsreihe pipettiert. Nach Inkubation im Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂; 96 % rel. Feuchte) für drei Tage wurden die Zellen in einer Immunfluoreszenz-Analyse auf das Vorhandensein des viralen Proteins NS3 und damit auf Virusinfektion hin untersucht (s.u.).

Titerberechnungen bei Endpunktverdünnungsverfahren erfolgen stets mit Hilfe statistischer Schätzverfahren. In dieser Arbeit fand die Formel nach

Spaermann und Kärber Anwendung: $m = x_i + \frac{d}{2} - d \sum R_i$

m negativer Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen, d.h. der Titer des Testvolumens ergibt sich aus 10^{-m}. Da als Testvolumen 50 µl eingesetzt wurden, muss dieser Wert mit 20 multipliziert werden, um die Anzahl infektiöser Viren je ml zu erhalten (TCID₅₀).

x_i Logarithmus der kleinsten Verdünnung, die eine Infektion in allen

vier Replikaten verursacht (z.B. in Stufe 6 wäre $x_i = \lg(1/72.900) = -4,86$)

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

ΣR_i Summe der Reaktionsraten; in diese Summe werden alle positiven Reaktionen ab der Verdünnungstufe, in der zum letzten Mal alle Replikate positiv waren, einbezogen und durch die Anzahl der Replikate dividiert (wenn in der nächsten Verdünnungstufe also noch 3 von 4 Replikaten positiv reagieren ist $\Sigma R_i = 1 + \frac{3}{4} = 1,75$)

5.2.3 Arbeiten mit Proteinen

5.2.3.1 Radioimmunpräzipitation

Grundlage der Radioimmunpräzipitation (RIP) ist die metabolische Markierung synthetisierter Proteine durch Zugabe z.B. radioaktiver Aminosäuren wie ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein; durch Inkubation des Zell-Lysates mit einem spezifischen Antikörper entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe, die durch Zugabe einer Affinitätsmatrix (z.B. Protein-A- oder Protein-G-Sepharose) aus der Lösung durch Zentrifugation gereinigt werden können (Harlow and Lane, 1998). Nach Denaturierung und Auftrennung über SDS-PAGE (siehe 5.2.3.2) können die präzipitierten Proteine in einem Autoradiogramm nachgewiesen werden. Da während der Lyse und des Waschens des Präzipitates meist keine denaturierenden Bedingungen vorliegen, werden nicht nur die direkt mit dem Antikörper reagierenden Proteine, sondern auch solche, die mit diesen Proteinen stabil interagieren, aufgereinigt. Diesen Vorgang nennt man Kopräzipitation; er beruht auf Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Das radioaktive Zell-Lysat (450 μl , siehe 5.2.2.2) wurde eine Stunde bei 4 °C auf einem vertikalen Drehrad inkubiert, um ein schonendes Auftauen und eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Es folgte eine Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 30 min, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren.

Material und Methoden

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und stand nun zum Einsatz in der Immunpräzipitation zur Verfügung. In der Regel wurden 200 µl dieses Lysates für eine Präzipitation verwendet und zusammen mit dem gewünschten Antikörper für eine Stunde auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert; zum Einsatz kamen monoklonale Antikörper aus der Maus gegen NS3 (Code4; gereinigt; 2 µl), GST (Sigma; 1 µl), das flag-Epitop (Sigma; 0,2 µl) oder das myc-Epitop (Cell Signaling Technology; 0,3 µl). Nach der Bindung des Antikörpers wurden 70 µl einer Protein-A-Sepharose Suspension (25 % (v/v) gequollene Protein-A-Sepharose in RIPA Puffer; 1 mM NaN₃) verwendet; für Immunpräzipitationen mit dem Antikörper Code4, der der Subklasse IgG₁ angehört, wurde teilweise auch Protein-G-Sepharose Suspension gleicher Zusammensetzung eingesetzt, da Protein-G eine höhere Affinität zu Antikörpern dieser Subklasse aufweist als Protein-A. Nach einer weiteren Inkubation auf dem Drehrad bei 4 °C für eine Stunde wurde die Suspension zentrifugiert (16.000 g; 30 sec), der Überstand verworfen und das Pellet insgesamt noch drei Mal mit 900 µl RIPA Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde es nach Zugabe von 100 µl SDS-Lysepuffer mit 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 10 min bei 95 °C inkubiert, anschließend kurz abgekühlt und abzentrifugiert. Der komplette Überstand wurde zur Beladung einer Tasche eines großen Polyacrylamidgels verwendet (s.u.).

Da bis zur Zugabe des SDS-Lysepuffers keine denaturierenden Bedingungen vorlagen, blieben Protein-Protein Wechselwirkungen während der Immunpräzipitation bestehen. Sollten solche Interaktionen allerdings aufgelöst werden, wurde das Zell-Lysat vor der Immunpräzipitation mit 1/10 Volumen 20 % (w/v) SDS-Lösung versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Vor der weiteren Verarbeitung der Proben wurde das Lysat abgekühlt und mit SDS-freiem RIPA-Puffer auf eine Endkonzentration von 0,2 % (w/v) SDS eingestellt. Danach schloss sich mit Zugabe entsprechender Antikörper eine

standardmäßige Immunpräzipitation an (s.o.).

5.2.3.2 SDS-PAGE, Autoradiographie und Auswertung über Phosphorimager

Für die Durchführung von Natrium-dodecyl-sulfat (SDS) - Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen in Tracingelen (Schägger and Jagow, 1987) kamen für kleine Gele (8,5 x 6,0 cm) Gelapparaturen aus der Werkstatt des MZI (Gießen) und für große Gele (13 x 15 cm) Apparaturen der Firma Hoefer zum Einsatz. Die Trenngele hatten je nach Größe der gesuchten Proteine einen Acrylamid-Anteil von 7 bis 12 % (w/v) in Gelpuffer. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von jeweils 0,05 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1 % (v/v) TEMED gestartet. Die Sammelgele bestanden aus 4 % (w/v) Acrylamid in Gelpuffer mit 0,08 % (w/v) APS und 0,1 % (v/v) TEMED. Die verwendete Acrylamid-Lösung hatte eine Konzentration von 40 % (w/v) und bestand im Verhältnis 29:1 aus Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid (Fa. AppliChem).

Die Proben, entweder Zellmaterial oder gereinigte Protein-A-Sepharose Komplexe, wurden in SDS-Lysepuffer mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 10 min auf 95 °C zur Denaturierung erhitzt. Als Molekulargewichts-Größenstandard diente ein auf jedem Gel aufgetragener gefärbter Protein-Marker (Prestained Protein Marker, Broad Range, Fa. NEB); wenn eine weitere Analyse über Autoradiographie vorgesehen war, wurden zusätzlich noch 2 μ l eines durch 14 C-Methylierung radioaktiv markierten Molekulargewichtstandards (Amersham) auf dem Gel aufgetragen.

Als Laufpuffer zur Elektrophorese dienten Anoden- und Kathodenpuffer; die angelegte elektrische Spannung betrug bei kleinen Gelen 120 V für etwa 90 min; große Gele liefen über Nacht bei Spannungen zwischen 45 und 60 V, je nach der Konzentration des Acrylamids im Trenngel und der gewünschten Laufweite. Die Elektrophorese wurde in der Regel abgebrochen, sobald die

Material und Methoden

Bromphenolblau-Front an der Anoden-Seite des Gels ausgetreten war.

Nach Abbau der Gelapparatur wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und von der unteren Glasplatte gelöst; es wurde entweder zur Durchführung eines Western Blots verwendet (s.u.) oder, im Falle radioaktiver Proben, für 45 min bei Raumtemperatur in Fixierlösung (30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) und anschließend ebenso lange in Amplify-Lösung® (Amersham) zur Fluorographie geschwenkt; nach diesem Vorgang wurden die Gele auf Filterpapier unter Vakuum bei einer Temperatur von 65 °C für zwei Stunden getrocknet.

Die Position und Intensität radioaktiv markierter Proteine kann nach Auftrennung in einem Elektrophoresegel durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das getrocknete Gel ermittelt werden; der Röntgenfilm wird an den entsprechenden Stellen durch die radioaktive Strahlung geschwärzt. Biomax® Röntgenfilme (Fa. Kodak) wurden zur Herstellung dieser Autoradiogramme in lichtdichten Filmkassetten direkt auf die getrockneten Gele gelegt und für mindestens einen Tag bei -70 °C dort belassen und anschließend entwickelt. Je nach Signalstärke wurden auch kürzere oder längere Expositionen durchgeführt.

Zum Zwecke der Quantifizierung von Signalen wurden getrocknete Gele radioaktiver Proben auch mittels Phosphorimager (Typhoon 9200; Amersham) und zugehöriger PC-Software (ImageQuant) ausgewertet. Bei diesem Verfahren werden zum Nachweis radioaktiver Strahlung Spezialplatten („Imaging Screens“) anstelle von Röntgenfilmen verwendet. Diese Screens sind mit einer etwa 700 µm dicken BaFBrEu-Beschichtung versehen und können radioaktive Strahlungsenergie in Form von an Kristallgitterfehlstellen haftenden Elektronen speichern. Das Auslesen erfolgt durch Anregung mit einem HeNe-Laser im roten Spektralbereich; die Platten können anschließend durch Bestrahlung mit gelbem Licht wieder „gelöscht“

Material und Methoden

und beliebig oft wieder verwendet werden. Zur Quantifizierung wurden die Gele für mindestens 24 Stunden auf Phosphorimager-Platten gelegt und anschließend die absorbierte β -Strahlung ausgelesen (Software „Typhoon ScannerControl“; beste Signalverstärkung; Auflösung: 100 microns). Die zu quantifizierenden Banden und ein Hintergrundbereich gleicher Fläche für jede Spur wurden eingerahmt und die Menge der enthaltenen Signale über den Befehl „Volume-Report“ ohne automatische Hintergrund-Korrektur ausgegeben (Software „Typhoon ImageQuant“). Die Daten konnten anschließend in das Tabellenkalkulations-Programm Excel (Microsoft™) exportiert und weiter verarbeitet werden. Der Wert des Signals einer Bande abzüglich des entsprechenden Hintergrund-Wertes unter Berücksichtigung der Anzahl von schwefelhaltigen Aminosäuren in einem Protein diente zur Errechnung der einzelnen Proteinmengen. Die Effizienzen der NS2-3-Spaltung wurden als Quotient ($NS3 / (NS2-3 + NS3)$) berechnet. Die Prozessierungs-Effizienz der wt Kontrolle wurde als 100 % definiert und die anderen Werte entsprechend umgerechnet.

5.2.3.3 Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper (mAk)

Zur Reinigung des monoklonalen Antikörpers Code4 für dessen Einsatz in der Immunpräzipitation aus dem Hybridomüberstand diente die Protein-G-Sepharose Säule „HiTrap Protein-G HP 1 ml“ (Amersham Biosciences). Protein-G ist ein Zelloberflächenprotein von Streptokokken der Gruppe G und ein Typ-III-Fc-Rezeptor, der, ähnlich wie das Protein-A aus *Staphylococcus aureus*, an die Fc-Region von IgG bindet; im Gegensatz zu Protein-A bindet Protein-G effizienter an die Fc-Region von Antikörpern der Subklasse IgG₁, zu der auch der Antikörper Code4 gehört.

300 ml Hybridomüberstand wurden von Dr. M. König (Institut für Virologie, Gießen) zur Verfügung gestellt; die Lösung wurde zur Pufferung auf eine Endkonzentration von 10 mM Tris/HCl (pH 7,0) eingestellt und durch 1 mM NaN₃ konserviert. Der Überstand wurde durch einen 0,45 μ m Filter filtriert,

Material und Methoden

um unlösliche Bestandteile zu entfernen und anschließend mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min durch die Säule gepumpt; nach einem kompletten Durchlauf der Lösung wurde sie über weitere zwei Tage über die Säule umgepumpt. Als Waschlösung dienten 10 ml eines 10 mM Tris/HCl-Puffers (pH 7,0). Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 10 ml eines Glycin-HCl Puffers (pH 2,7); jeweils 1 ml der Elutionslösung wurden in getrennten Reaktionsgefäßen gesammelt, in die jeweils schon 100 µl einer 1 molaren Tris/HCl-Lösung (pH 9,0) vorgelegt waren; auf diese Weise erfolgte eine schnelle Abpufferung des pH-Wertes in einen neutralen Bereich zur Schonung der eluierten Antikörper.

Jeweils 3 µl jeder Fraktion wurden mit 12 µl SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt; nach Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blue Lösung für 20 Minuten und anschließender Entfärbung mit häufig gewechselter Entfärbelösung für mehrere Stunden wurden die 5 Elutions-Fraktionen mit der höchsten Antikörper-Konzentration bestimmt und gepoolt. Die genaue Proteinkonzentration dieses Pools wurde über den BC-Assay (BCA = Bi-chinolin-dicarbonsäure-Assay; protein quantification kit; Fa. Uptima) nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Die Inkubation der BSA-Verdünnungsreihe und der zur messenden Probe erfolgte bei 60 °C für eine Stunde. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Extinktion im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

Der gereinigte Antikörper wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

5.2.3.4 Western Blot (semidry)

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose Membran Optitran BA-S83 (Schleicher & Schüll, Düren) im elektrischen Feld (Western Blot) wurde standardmäßig mit Hilfe der Elektro-

Material und Methoden

Blot Apparatur Trans-Blot® SD (BioRad) in einem halbtrockenen Verfahren (semidry) durchgeführt. Die Puffer Roti-Blot A und K (Roth) wurden hierzu nach den Angaben des Herstellers eingesetzt (10 % (v/v) Pufferkonzentrat und 20 % (v/v) Methanol in Wasser). Die Gele wurden 10 min im Kathodenpuffer geschwenkt, während die Membran mit Anodenpuffer befeuchtet wurde; anschließend wurden auf der Anode der Blot-Apparatur drei mit Anodenpuffer befeuchtete Filterpapiere (Whatman) passender Größe und die Membran übereinander platziert; auf die Membran wurde das Gel, darüber weitere drei mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. Nach dem Entfernen von Luftblasen zwischen den Schichten und dem Anbringen der Kathode wurde eine elektrische Gleichspannung (maximal 13 V) angelegt; für den Proteintransfer aus kleinen Gelen wurde der Stromfluss auf 5 mA/cm², bei großen auf 3 mA/cm² begrenzt; die Transferdauer lag für kleine Gele bei 30, für große bei 60 min. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach dem Proteintransfer für mindestens eine Stunde in einer Lösung aus 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Tween (0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS) unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Waschen der Membran mit PBS-Tween erfolgte die Zugabe der Lösung des Primärantikörpers (Hybridomüberstand Code4; verdünnt mit PBS-Tween im Verhältnis 1:200); nach Inkubation für eine Stunde und dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit PBS-Tween wurde der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus-IgG zugegeben (verdünnt mit PBS-Tween im Verhältnis 1:10.000) und die Membran unter Schwenken eine weitere Stunde mit dieser Lösung inkubiert. Nach weiteren drei Waschvorgängen mit PBS-Tween wurde die Membran mit frisch angesetzter Chemilumineszenz-Lösung (Perkin-Elmer) nach Vorschrift des Herstellers befeuchtet; nach einer einminütigen Inkubation wurde überschüssige Lösung abgetupft und die Membran mit einer transparenten Folie abgedeckt. Biomax® Röntgenfilme

(Kodak) passender Größe wurden durch die direkte Exposition auf dieser Folie zunächst für 30 sec belichtet und sofort entwickelt; je nach Intensität des erhaltenen Signals wurden anschließend längere oder kürzere Belichtungszeiten gewählt. Das Bandenmuster des gefärbten Protein-Markers wurde von der Membran auf den darüber ausgerichteten entwickelten Film übertragen.

5.2.3.5 Radiosequenzierung

Das zur Radiosequenzierung des N-Terminus von NS3 verwendete Plasmid auf Basis des Vektors pCITE-2A kodierte für ein flag-Epitop, NS2 und sieben Aminosäuren von NS3 des BVDV CP7 (AS 1173-1596), gefolgt von der Methionin-reichen Sequenz M-L-T-M-A-M und GST. 3 µg des Plasmids wurden zur Transfektion von 10^6 MVA-T7pol infizierten BHK-Zellen in einer 35 mm Schale verwendet (s.o.); drei Stunden nach der Transfektion und einer einstündigen Vorinkubation in Methionin-freiem Medium wurden diese Zellen mit 500 µCi ^{35}S -Methionin (Amersham Biosciences) für vier Stunden (37 °C; 5 % CO_2 ; 96 % rel. Feuchte) metabolisch markiert und anschließend in 500 µl RIPA-Puffer lysiert. Das C-terminale Spaltprodukt (NS3*-MLTMAM-GST) wurde durch Immunpräzipitation mit einem GST spezifischen monoklonalen Antikörper und Protein-A-Sepharose aufgereinigt (s.o.) und über SDS-PAGE aufgetrennt.

Der Transfer der aufgetrennten radioaktiven Proteine auf die PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran Sequi-Blot™ (BioRad) wurde mit Hilfe der Elektro-Blot Apparatur Trans-Blot®-Cell (BioRad) in einem nassen Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde die Membran zunächst mit Methanol benetzt und anschließend, wie auch das Polyacrylamidgel, für 10 min in Western-Blot-Puffer inkubiert; Gel und Membran wurden zwischen jeweils zwei Filterpapieren und einem Schwammtuch auf beiden Seiten fixiert und ohne Einschluss von Luftblasen zusammengepresst. Dieser Stapel wurde in der mit Western-Blot-Puffer gefüllten Blot-Kammer zwischen den Elektroden

platziert und eine Gleichspannung von 15 V angelegt; die Inkubation erfolgte bei 4 °C auf Eis für 16 Stunden; der Puffer wurde durch einen Magnetrührer dabei ständig durchmischt. Nach Abbau und Trocknen der Membran wurde auf dieser ein Biomax Röntgenfilm (Kodak) für 2 Stunden exponiert und entwickelt. Der Film wurde mit der Membran zur Deckung gebracht und die gesuchte Protein-Bande aus der Membran ausgeschnitten. Dieser Membran-Ausschnitt wurde zur automatischen Radiosequenzierung über Edman-Abbau (Applied Biosystems Inc. Modell 473A) eingesetzt; die Menge der enthaltenen Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen der Abbauschritte wurde durch einen β -Counter bestimmt (Messzeit: 5 Minuten) und in cpm (Zerfälle pro Minute) angegeben.

5.2.3.6 Immunfluoreszenz

Zum Zwecke der indirekten Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung von Zellen wurden diese nach zweimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ (0,49 mM MgCl₂; 0,68 mM CaCl₂ in PBS) zunächst durch Zugabe von 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS⁺⁺ und Inkubation bei 4 °C für 25 min fixiert. Nach dem Waschen mit PBS⁺⁺ erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen durch Zugabe von 1 % (w/v) N-octyl- β -D-Glucopyranosid in PBS⁺⁺ und anschließende Inkubation bei 4 °C für 5 min; die Zellen wurden danach erneut zwei Mal mit PBS⁺⁺ gespült. Code4-Antikörper (α -NS3 mAk) enthaltender Hybridomüberstand diente, 1:100 in PBS⁺⁺ verdünnt, als Primär-Antikörper Lösung; diese wurde für eine Stunde bei 37 °C auf den Zellen belassen, bevor die Zellen drei Mal mit PBS⁺⁺ gewaschen wurden. Das Fluorophor Cy3 war an den Sekundär-Antikörper (Cy3-gekoppelter- α Maus-IgG) gekoppelt, um einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe zu erlauben; dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung in PBS⁺⁺ von 1:500 verwendet und ebenfalls für eine Stunde bei 37 °C auf den Zellen belassen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ konnten die erhaltenen Präparate im Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 35 der

Firma Zeiss (Filtersatz für Cy3: BP 546 / FT 580 / LP 590) betrachtet werden. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mittels der Digitalkamera F-View (Fa. Soft Imaging System, SIS) und der zugehörigen PC-Software analySIS®.

5.2.4 Arbeiten mit RNA

5.2.4.1 In-vitro-Transkription

Die in-vitro-Transkription von DNA zu RNA erfolgte mit Hilfe des Kits MAXIscript™ der Firma Ambion® nach den Vorgaben des Herstellers unter Verwendung der SP6-DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Die doppelsträngigen DNA-Matrizen trugen hierzu einen SP6-Promotor oberhalb der zu transkribierenden Region und wurden unterhalb dieses Bereiches durch einen Verdau mit einem singular schneidenden Restriktionsenzym (i.d.R. Sma I) linearisiert. Der vollständige Ablauf dieses Verdau (3 µg Plasmid-DNA) wurde durch Agarosegel-Elektrophorese eines Aliquots der Reaktion überprüft. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 5 % (v/v) 0,5 M EDTA-Lösung, 10 % (v/v) 3 M Natriumacetat-Lösung und zwei Volumen Ethanol gestoppt; die Fällung der linearen DNA erfolgte bei -20 °C für 15 min, bevor sie bei 16.000 g und 4 °C für weitere 15 min abzentrifugiert wurde. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde die DNA in 4 µl ddH₂O resuspendiert und in die Transkriptions-Reaktion eingesetzt; hierzu wurden 2 µl Transkriptionspuffer, jeweils 1 µl ATP, CTP, GTP und UTP (je 10 mM) und 2 µl SP6-Enzym-Mix zugemischt und mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Zur Herstellung eines radioaktiv markierten Transkripts wurde die Menge an UTP halbiert und stattdessen 5 µl α³²P-markiertes UTP (Amersham) in die Reaktion eingesetzt. Die Transkription fand für eine Stunde bei 37 °C statt. Die Phagen-RNA-Polymerase bindet dabei zuerst an den doppelsträngigen DNA-Promotor, entwindet dann die beiden DNA-Stränge und verwendet den 3' → 5' Strang als Matrize zur Synthese eines komplementären 5' → 3' RNA-Moleküls bis zum Ende der Matrize, welches

durch die Linearisierung mittels Restriktionsenzymverdau erzeugt worden war (run-off transcription); der minimale SP6 Promotor besteht aus 18 Nukleotiden (ATTTAGGTGACACTATAGA**G**AAGNG; unterstrichen: minimale Sequenz; **fett**: erstes transkribiertes Nukleotid). Nach Ablauf der Reaktion wurde die DNA-Matrize durch einen Verdau mit DNase I (1 µl DNase I; 15 min 37 °C) entfernt; diese Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Schließlich wurden die freien Nukleotide durch eine Ammoniumacetat-Ethanol Präzipitation der RNA aus der Reaktion entfernt; hierzu wurden weitere 30 µl ddH₂O zur Reaktion gegeben und das Endvolumen damit auf 50 µl eingestellt. Durch Zugabe von 5 µl einer 5 M Ammoniumacetat-Lösung und 150 µl Ethanol, 30 min Inkubation bei -20 °C und anschließender Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 30 min, wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Die Konzentration der parallel hergestellten RNAs wurde durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt. Die RNAs konnten in Aliquots bei -70 °C gelagert werden. Etwa gleiche Mengen jeder RNA (meist ein Drittel einer Reaktion) wurden zur Elektroporation in MDBK-Zellen verwendet (s.o.).

5.2.4.2 Präparation von RNA und denaturierende Agarosegel-Elektrophorese

RNA-Präparationen aus Zellen wurden mit Hilfe des Systems Nucleospin® RNA II der Firma Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor der Präparation wurden die benötigte RNase-freie DNase-Lösung (1 Aliquot lyophilisiertes Enzym gelöst in 540 µl RNase-freiem ddH₂O) und der Puffer RA3 (Zugabe von 50 ml Ethanol zu 12,5 ml Pufferkonzentrat) angesetzt. Etwa 2×10^6 MDBK-Zellen wurden durch Zugabe von 350 µl RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol in der Zellkulturschale, nach Abnahme des Überstandes und Waschen mit PBS, lysiert. Zur Reduktion der Viskosität und Klärung des Lysates diente die Filtration durch eine Nucleospin® Filtereinheit mittels Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min in

Material und Methoden

einer Tischzentrifuge; um in der homogenisierten Lösung die benötigten RNA-Bindungs-Konditionen einzustellen, erfolgte die Zugabe von 350 µl 70 % (v/v) Ethanol. Eine Nucleospin® RNA II Säule wurde mit dem vermischten Lysat beladen und für 30 sec bei 8.000 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Entsalzung der Silikamembran durch 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) und Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min. Für den Verdau der gebundenen DNA wurden 10 µl der DNase-Lösung (s.o.) mit 90 µl DNase-Reaktionspuffer vermischt und auf die Membran pipettiert; nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Membran durch Zugabe von 200 µl RA2 und Zentrifugation (8.000g für 30 sec) gewaschen; der zweite Waschschrift wurde mit 600 µl RA3 (8.000 g für 30 sec), der dritte mit 250 µl RA3 (11.000 g für 2 min) durchgeführt. Die gereinigte RNA konnte aus der getrockneten Membran durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem ddH₂O und Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g eluiert werden.

Um den RNA-Gehalt der Lösungen zu bestimmen, wurde die UV-Licht-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) gemessen; 4 µl der RNA-Lösung wurden hierzu mit 196 µl ddH₂O verdünnt und die Absorption durch diese Lösung, gegen reines Wasser als Referenz, bestimmt. Einzelsträngige RNA in einer Konzentration von etwa 40 µg/ml ergibt bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Absorptionswert von 1. Ausgehend von diesen Werten und dem Verdünnungsfaktor 50 ergab sich die RNA-Konzentration in µg/µl durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 2.

5 µg jeder RNA wurden unter Zugabe von 3 µl 5x-Phosphat-Puffer, 1,8 µl Glyoxal und ddH₂O auf 15 µl für 45 min bei 56 °C glyoxyliert und über Elektrophorese durch ein einprozentiges Agarosegel unter denaturierenden

Material und Methoden

Bedingungen aufgetrennt (1 % (w/v) Agarose in 1x-Phosphatpuffer; Zugabe von 3,7 % (w/v) Formaldehyd nach dem Kochen). Der benötigte 1x- und 5x-Phosphat-Puffer wurde durch entsprechende Verdünnungen des 50x-Konzentrates mit ddH₂O hergestellt. Nach einem Vorlauf des Gels für 15 min wurden die Proben nach Zugabe von 5 µl Probenpuffer aufgetragen; ein radioaktiv mit ³²P-UTP markiertes Transkript genomischer RNA von BVDV CP7 diente als Größenmarker. Nach 30 min bei einer Spannung von 120 V wurde der Elektrophoresepuffer bis zum Ende des Gel-Laufs für weitere 4 Stunden ständig umgepumpt. Das Gel wurde auf einer Duralon-UV Membran (Stratagene) bei 65 °C unter Vakuum getrocknet und über Autoradiographie und Phosphorimager-Analyse ausgewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Untersuchungen zur Funktion von NS2

Für pestivirales NS2 wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit mehrfach eine Protease-Aktivität postuliert. Hierfür sprach insbesondere, dass es keine geeignetere Erklärung für die NS2-3-Prozessierung bei noncp BDV und CSFV und einigen cp BVDV-Stämmen (CP7, Oregon, NADL u.a.) gab (siehe Einleitung). Ebenso blieb bislang unklar, wie die NS2-3-Spaltung in noncp BVDV-infizierten Zellen durch das zelluläre Protein Jiv oder dessen Fragment, Jiv90, stimuliert werden kann, welche Protease also in diesen Prozessierungsschritt involviert ist. Zudem war bekannt, dass die Spaltung von NS2-3 auch bei den verwandten Hepaciviren (HCV) durch eine virale Autoprotease (NS2-3-Protease) katalysiert wird, deren aktives Zentrum sich innerhalb von NS2 befindet. Tatsächlich gezeigt wurde die vermutete Protease-Aktivität des NS2 der Pestiviren bislang jedoch nicht; der Nachweis einer solchen enzymatischen Aktivität war daher ein zentrales Ziel dieser Arbeit.

6.1.1 NS2 von Pestiviren ist bioinformatischen Analysen zufolge eine Cystein-Autoprotease, die entfernte Verwandtschaft zur NS2-3-Protease von Hepaciviren aufweist

Um einen ersten Einblick in den Mechanismus der NS2-3-Spaltung zu erhalten, wurden Sequenzen des pestiviralen NS2 auf charakteristische Elemente hin untersucht, die bei den beiden anderen Genera der Familie *Flaviviridae* (Genus *Flavivirus*, Genus *Hepacivirus*) und den verwandten, aber bisher keinem Genus zugeordneten GB-Viren (Muerhoff et al., 1995) in die Prozessierung des NS2-3 involviert sind. Die bioinformatische Analyse erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch A. E. Gorbalenya aus dem Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Niederlande. Demnach weist das pestivirale NS2 eine Multidomänen-

Ergebnisse

Organisation auf. Der C-terminale Abschnitt dieses Proteins zeigte eine entfernte Verwandtschaft zum NS2 der Hepaci- und GB-Viren. Die bioinformatische Analyse zeigte im NS2 aber keine Homologie zu den Viren des Genus Flavivirus. Interessanterweise sind ein Histidin (H), eine Glutaminsäure (E) und ein Cystein (C) zwischen Pesti-, Hepaci- und GB-Viren konserviert; diese Aminosäuren liegen in Sequenzblöcken mit signifikanten Homologien (Block H, E und C in Abb. B1). Die drei genannten Aminosäuren sind essentiell für die Autoprozessierung von NS2-3 der Hepaciviren und formen wahrscheinlich das katalytische Zentrum der NS2-3-Protease bei HCV (Gorbalenya and Snijder, 1996; Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). Die drei konservierten Aminosäuren entsprechen den Positionen H₁₄₄₇, E₁₄₆₂ und C₁₅₁₂ von BVDV (Nummerierung nach noncp BVDV-Stamm SD-1, rot auf schwarzem Hintergrund in Abb. B1). Neben diesen drei Aminosäuren sind noch ein Prolin, zwei Glycine und ein Alanin über sämtliche in das Alignment einbezogene Viren hinweg konserviert. Die gleiche lineare Anordnung von H, E und C in der katalytischen Triade wurde früher schon bei Cystein-Proteasen von Picornaviren mit Chymotrypsin-ähnlicher Faltung nachgewiesen (Gorbalenya and Snijder, 1996); diese picornaviralen Proteasen besitzen darüber hinaus keine strukturellen Ähnlichkeiten mit dem NS2 der Pestiviren.

Oberhalb und unterhalb des vorhergesagten katalytischen Cysteins C₁₅₁₂ existieren zwei Sequenzblöcke, die nur bei Pestiviren vorkommen und bei HCV und GB-Viren fehlen. Der N-terminal von C₁₅₁₂ gelegene 30 Aminosäuren große Block enthält ein Histidin und fünf Cysteine (H₁₄₈₃, C₁₄₈₄, C₁₄₈₇, C₁₄₉₀, C₁₅₀₀, C₁₅₀₃), die bei allen bekannten Pestivirus-Stämmen ausnahmslos konserviert sind. Die lineare Abfolge dieser Aminosäuren ist typisch für eine Zink-bindende Proteinstruktur (de Moerlooze et al., 1990). Demnach könnten zwei Aminosäuren-Paare ein Zn²⁺-Ion koordinieren; Kandidaten für das linke Paar sind H₁₄₈₃, C₁₄₈₄, C₁₄₈₇ und C₁₄₉₀ und für das

Ergebnisse

rechte Paar entsprechend C₁₅₀₀ und C₁₅₀₃ (blauer Hintergrund in Abb. B1). Diese hypothetische Zink-bindende Struktur im NS2 der Pestiviren könnte die Funktion der Zink-bindenden Struktur im NS3 der Hepaciviren übernehmen; letztere ist essentiell für die Autoprozessierung von NS2-3 bei HCV (Gorbalenya and Snijder, 1996; Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). Die zweite, C-terminal von C₁₅₁₂ gelegene Insertion ist 41 Aminosäuren lang und besonders hydrophil; Insertionen von Jiv-Sequenzen im NS2 von Pestiviren liegen alle innerhalb dieses Pestivirus-spezifischen Sequenzblocks.

Besonders ausgeprägte Ähnlichkeiten zwischen Pestiviren auf der einen und den Hepaci- und GB-Viren auf der anderen Seite wurden rund um die NS2-3-Spaltstelle und in deren Nachbarschaft innerhalb von NS2 beobachtet (Sequenzblöcke A und B in Abb. B1). Insbesondere die letzten Aminosäuren von NS2 und die beiden ersten Aminosäuren von NS3 sind besonders konserviert; diese Ähnlichkeit an der Spaltstelle lässt einen verwandten Mechanismus der NS2-3-Spaltung vermuten.

Die beobachteten Sequenzhomologien stehen im deutlichen Gegensatz zur sonst auf Aminosäuren-Ebene nur geringen Ähnlichkeit der Polyproteine der untersuchten Viren. Die bioinformatische Analyse ergab zusammenfassend deutliche Hinweise auf eine Verwandtschaft des NS2-3-Spaltungsmechanismus bei Pesti- und Hepaciviren. Es ist davon auszugehen, dass Pestiviren eine verwandte Variante der NS2-3 Autoprozessierung der Hepaciviren zur Generierung von NS2 und NS3 nutzen. Die Katalyse der NS2-3-Spaltung durch eine NS2-assoziierte Cystein-Autoprotease der Pestiviren war damit das Arbeitsmodell für die weiteren Untersuchungen.

Ergebnisse

BVDV-CP7	(1441 - 1594) :	---H--- RNLIIK E KVRNQ T VASWYGE--- ---E--- E E VY G M P K V V T IIRACTLNK N K H CII C T V C E ARKWKGG N C P K C GR H
BDV-X818	(1438 - 1591) :	KNLIIK E KVRNE V AHWFNE--- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
CSFV-E	(1441 - 1594) :	KELIIK E KVRNE V MVHWF G D--- ---E--- E E VY G M P KL V GLVKA A TLS K N K H C II C T V C E DREWR G E T C P K C GR F
HCV-J6	(950 - 1035) :	GTYY D E L TPMS D WA A NG L RD L AVAV E PI I F S P M E K K V IV W G--- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
HCV-J8	(950 - 1035) :	GTYY D E L SPL S T W AA Q GL R D L AI A V E P V F S P M E K K V IV W G--- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
HCV-H	(946 - 1031) :	GT C V Y N E LAP L RD W A H NG L RD L AVAV E P V F S R M E T KL I T W G--- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
GBV-A	(889 - 976) :	G V LL Y E E AG H T S RR G A A R L RE W GF A I E P V S I T K E D CA I VR D S--- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
GBV-CG	(812 - 899) :	G A Y L F D E M GS F SR A V K ER L L E W D AA I E P LS F TR T DC R I I R D A--- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
GBV-B	(864 - 945) :	G V FF Y K E L H GD V L P ND F ASK L P - L Q E P FF F FE G K A R V Y R N E --- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
BVDV-CP7	(1441 - 1594) :	---C--- :GK P I I C G M T L A D F E E R H Y K R I F I R E G N F E G P F R Q E Y N G F V Q Y T A R G Q L F L R N I P I L A T K V K M I M V G N L G E E I G D L E H L G W I L R G P A V C
BDV-X818	(1438 - 1591) :	:G P S L S C G M T L S D F E E R H Y K K I F I R E D Q S D G P F R E E Y K G Y L Q Y K A R G Q L F L R N I P I L A T K V K L L L V G N L G S E V G D L E H L G W I L R G P A V C
CSFV-E	(1441 - 1594) :	:G P P M T C G M T L A D F E E K H Y K R I F F R E D Q S E G P V R E E Y A G Y L Q Y R A R G Q L F L R N I P V L A T K V K M L L V G N L G T E V G D L E H L G W V L R G P A V C
HCV-J6	(950 - 1035) :	:A E T A A C G D --- :I L H G L P V S A R L G R E V L L G P A D G Y T S K --- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
HCV-J8	(950 - 1035) :	:A E T V A C G D --- :I L H G L P V S A R L G R E V L L G P A D G Y T S K --- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
HCV-H	(946 - 1031) :	:A D T A A C G D --- :I I N G L P V S A R R G Q E I L L G P A D G M V S K --- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
GBV-A	(889 - 976) :	:A R V L G C G Q --- :L V H G K P V V A R R G D E V L I G C V N S R F D L P P --- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
GBV-C	(812 - 899) :	:A R T L S C G Q --- :C V M G L P V V A R R G D E V L I G V F Q D V N H L P P --- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F
GBV-B	(864 - 945) :	:G R R L A C G D --- :T V D G L P V V A R L G D L V F A G L A M P P D --- ---E--- E E VY G M P KL V SVKAA T LN R SR H CII C T V C E SRDWK G E T C P K C GR F

NS2 - > < - NS3

Ergebnisse

Abbildung B1: Bioinformatische Analyse zur Identifizierung einer Protease im pestiviralen NS2 (erstellt von A.E. Gorbalenya, Leiden)

Die NS2-Protease-Domäne ist zwischen Hepaci- und Pestiviren konserviert. Teile aus der NS2-3-Region von Polyproteinen (Zahlen in Klammern geben die genauen Abschnitte an) einer repräsentativen Auswahl von Pesti-, Hepaci- und GB-Viren wurden in das „Alignment“ einbezogen. Der Gibbs-Sampler (Lawrence et al., 1993) der MACAW-Workbench (Schuler et al., 1991) wurde genutzt um die Ähnlichkeiten zwischen BVDV NS2 und drei Hepaciviren zu bestimmen, die insgesamt weniger als 30% auf Aminosäuren-Ebene übereinstimmen. Die Blöcke A ($1,4e^{-08}$) und B ($5,1e^{-04}$) erwiesen sich als statistisch signifikant homolog. Die Blöcke H, E und C wurden nach den entsprechenden putativen katalytischen Aminosäuren (rot) benannt. H₁₄₄₇, E₁₄₆₂ und C₁₅₁₂ wurden unter Zuhilfenahme der katalytischen Aminosäuren des HCV NS2 als Ankerpunkte bestimmt. Die Region zwischen Block C und A enthält in vielen cp BVDV-Stämmen Insertionen unterschiedlicher Größe, ein Befund, der dieses Alignment unterstützt. Die Grenze zwischen NS2 und NS3 wird gelb hinterlegt angezeigt. Die blaue Hinterlegung hebt die putativ an der Zinkbindung beteiligten Aminosäuren hervor. Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind durchgehend konserviert, dunkelgraue zu 100% ähnlich oder mindestens zu 80% identisch, hellgraue sind mindestens zu 60% konserviert. Ähnliche Aminosäuren: D,N,Q,E; K,R,H; F,Y,W; A,G; S,T; A,C,L,I,V,M,F,Y.

6.1.2 Die Prozessierung des BVDV CP7 NS2-3 erfolgt an der konservierten 1589Arg/Gly1590-Spaltstelle und erfordert nur sieben Aminosäuren von NS3

Das aufgestellte Arbeitsmodell sollte im Folgenden experimentell verifiziert werden. Hierzu wurde ein Polyprotein-Fragment des cp BVDV-Stammes CP7 verwendet, da bei diesem Virus-Stamm die NS2-3-Prozessierung durch die Aktivität der putativen NS2-Protease katalysiert werden sollte (siehe Einleitung; (Tautz et al., 1996)). Der verwendete Genbereich kodierte für die Proteine E2-p7-NS2-NS3-NS4A (E2-NS4A) des Polyproteins von CP7. Alle Versuche, ein solches Fragment oder auch nur NS2-3 in *E. coli* zu exprimieren, scheiterten, wahrscheinlich auf Grund der toxischen Wirkung durch die starke Hydrophobizität des NS2 (Tautz, persönliche Mitteilung). Deshalb wurde dieses Fragment transient in eukaryontischen Zellen (baby hamster kidney, BHK) im T7-Vacciniavirus-System exprimiert. Hierzu wurden die mit MVA-T7-Vacciniavirus infizierten Zellen mit einer entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, von der aus über die T7-DNA-abhängige RNA-Polymerase die korrespondierende mRNA synthetisiert wird, die dem Proteinsynthese-Apparat der Zelle als Matrize zur IRES-vermittelten Translation der Proteine dient. Das entstehende Polyproteinfragment wurde, analog zum Polyprotein während einer Infektion, durch die zell-(Signalpeptidase) und viruseigenen Proteasen (putative NS2-Protease und NS3-Protease) prozessiert (Rinck et al., 2001). Der Proteinnachweis erfolgte über metabolische Markierung und Radioimmunpräzipitation (RIP).

Um zunächst den kleinsten zur NS2-3-Prozessierung benötigten Teil von NS2-3 zu bestimmen, wurden eine Reihe von N- oder C-terminal verkürzten NS2-3-Konstrukten mit N-terminalem flag-Epitop und C-terminaler GST-Fusion auf NS2-3-Spaltungskompetenz untersucht (Abb. B2 und B3). Als Ausgangskonstrukt diente ein Plasmid, welches für ein flag-Epitop, das gesamte NS2 des BVDV-Stammes CP7 und ein verkürztes NS3 bis zur

Ergebnisse

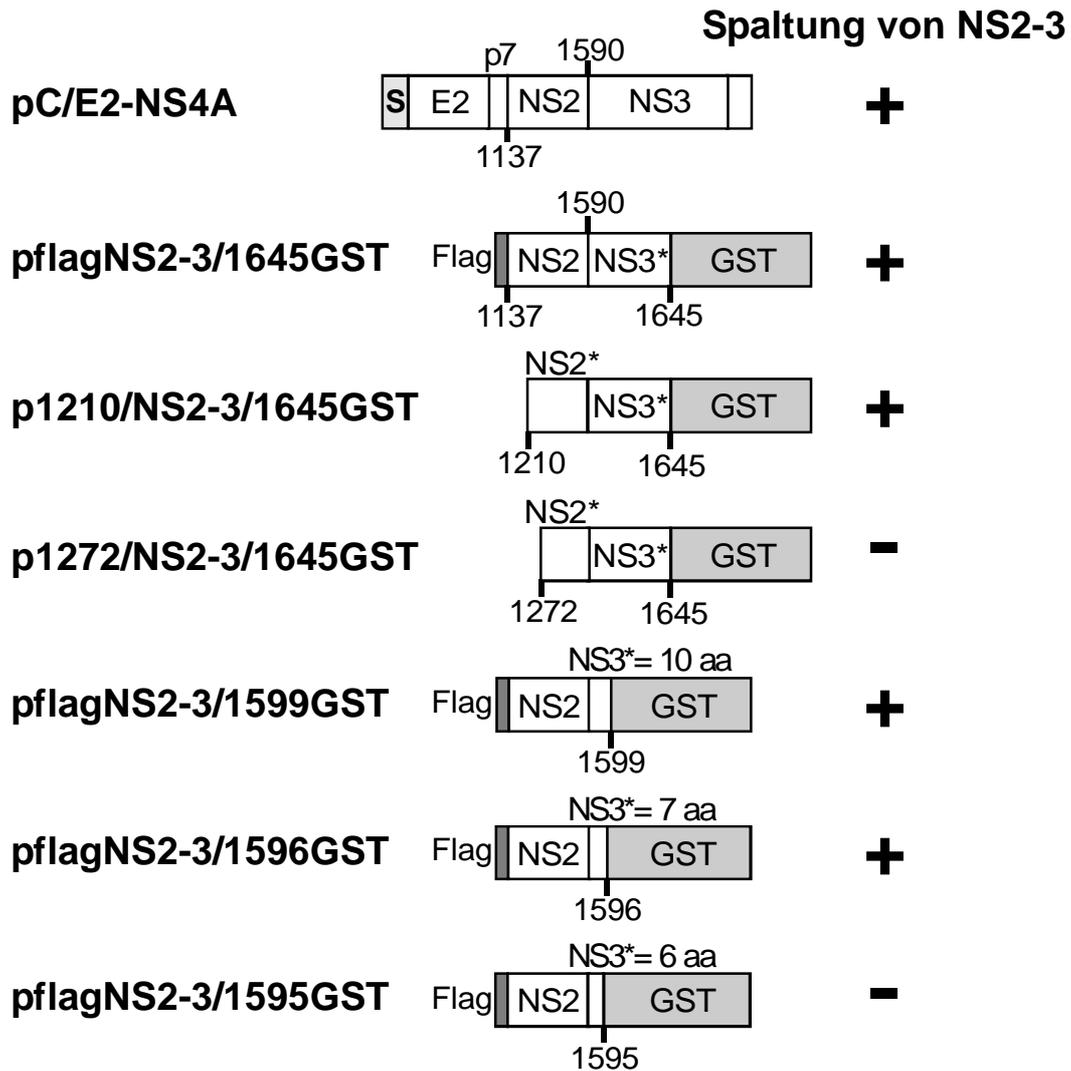


Abbildung B2: Schema der Expressionskonstrukte zur Bestimmung des minimalen zur Prozessierung befähigten NS2-3 Fragments

Die Kästen symbolisieren die einzelnen Proteinabschnitte. S = Signal-Peptid; Flag = flag-Epitop; die Zahlen unter den Kästen geben die Positionen bezogen auf das BVDV SD-1 Polyprotein an. 1137: N-Terminus von NS2; 1590: N-Terminus von NS3. * symbolisiert verkürzte Proteine.

Aminosäure 1645, gefolgt von GST, kodierte (pflagNS2-3/1645GST, siehe Abb. B2). Davon ausgehend wurden zwei N-terminale Verkürzungen durch Deletion der ersten 73 Aminosäuren (p1210/NS2-3/1645GST) oder der ersten 135 Aminosäuren des NS2 (p1272/NS2-3/1645GST) hergestellt. Um den minimal benötigten Anteil von NS3 zu bestimmen, wurden Konstrukte generiert, die nur noch zehn (pflagNS2-3/1599GST), sieben (pflagNS2-3/1596GST) oder sechs (pflagNS2-3/1595GST) Aminosäuren des NS3,

Ergebnisse

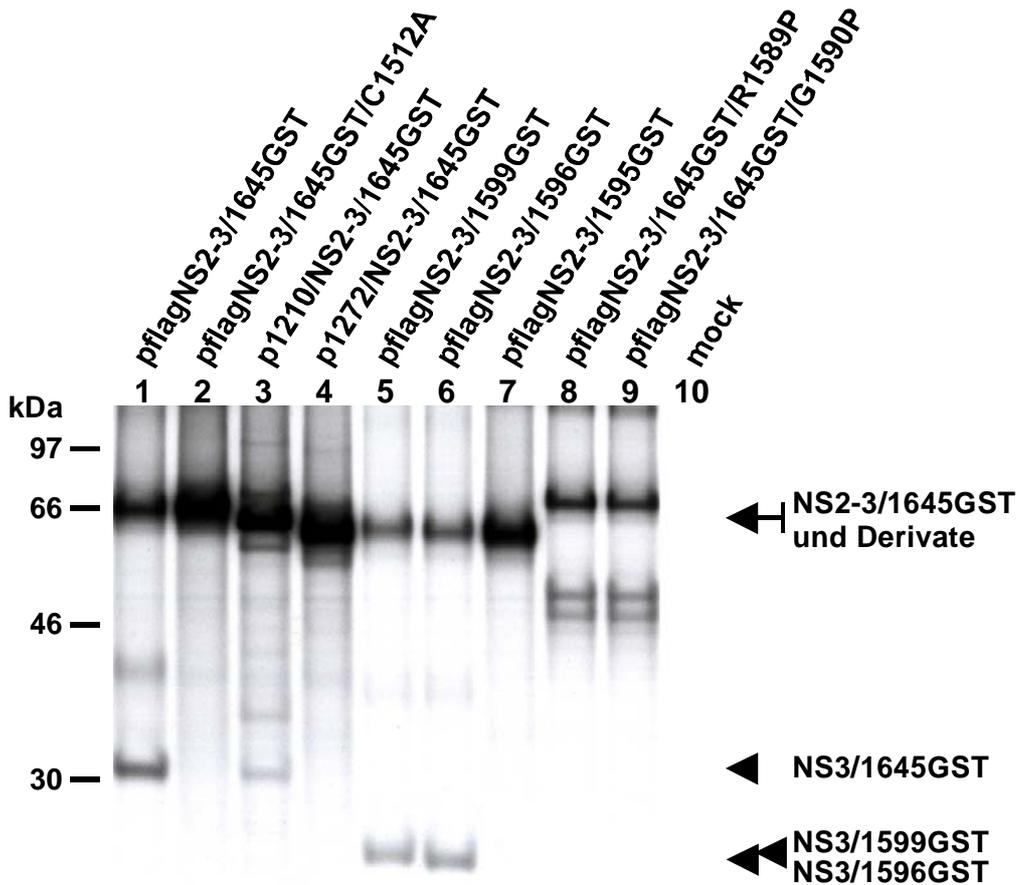


Abbildung B3: Bestimmung des minimalen zur Prozessierung befähigten NS2-3 Fragments mittels Radioimmunpräzipitation (RIP)

Die in BHK Zellen transfizierten Plasmide sind über den Spuren angegeben. Zur Radioimmunpräzipitation wurde ein für GST spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Pfeile rechts kennzeichnen die Positionen der ungespaltenen Vorläuferproteine und der zugehörigen Spaltprodukte.

gefolgt von GST, enthielten. Um einen ersten Eindruck zu erlangen, ob in diesem Testsystem die Spaltung an der authentischen Position zwischen Aminosäure 1589 und 1590 erfolgt, wurden diese beiden Aminosäuren an der Spaltstelle jeweils einzeln durch Prolin ersetzt (Abb. B3).

Das Auftreten von NS3/1645GST als Spaltprodukt zeigte eine erwartungsgemäße Prozessierung des Ausgangskonstrukts pflagNS2-3/1645GST an (Spur 1 in Abb. B3). Die Punktmutation der putativ katalytischen Aminosäure C₁₅₁₂ zu Alanin erlaubt keine NS2-3-Spaltung und

Ergebnisse

dient hier als Negativkontrolle (Spur 2). Die N-terminale Verkürzung des NS2 um 73 Aminosäuren ließ eine NS2-3-Spaltung noch zu (Spur 3), allerdings bei geringerer Effizienz im Vergleich zum vollständigen NS2 (Spur 1). Eine weitere N-terminale Verkürzung des NS2 um insgesamt 135 Aminosäuren führte zum Erliegen der Prozessierung (Spur 4). Sofern C-terminal zehn oder sieben Aminosäuren des NS3 zur Verfügung standen, erfolgte die Spaltung auf normalem Niveau (Spuren 5 und 6). Es konnte jedoch kein Spaltprodukt mehr detektiert werden, wenn nur sechs Aminosäuren des NS3 im Protein enthalten waren (Spur 7). Die beiden Mutationen an der NS2-3-Spaltstelle (R1589P bzw. G1590P) erlaubten wie erwartet keine Prozessierung von NS2-3 (Spuren 8 und 9). Diese Ergebnisse bestätigen und verfeinern die Resultate, die für den BVDV-Stamm Oregon erhalten worden waren (Kümmerer et al., 1998). Folglich wird zur Spaltung des NS2-3 im CP7-Kontext nur ein minimaler Teil von NS3 direkt hinter der Spaltstelle benötigt; dagegen ist praktisch das gesamte NS2, einschließlich des N-terminalen hydrophoben Abschnittes, für diese Prozessierung von Bedeutung. Diese Beobachtungen stehen in voller Übereinstimmung mit dem Modell der Protease aus dem bioinformatischen Alignment.

Für den cp BVDV-Stamm Oregon (siehe Einleitung) war die genaue Lage der Spaltstelle zwischen NS2 und NS3 durch N-terminale Sequenzierung von NS3 bereits bekannt (Kümmerer et al., 1998): Sie liegt zwischen den konservierten Aminosäuren Arg₁₅₈₉ und Gly₁₅₉₀. Exakt oberhalb von Gly₁₅₉₀ befinden sich in cp BVDV-Stämmen auch alle Insertionen von Ubiquitin. Es wurde auch bereits gezeigt, dass NS3 mit der Aminosäure Gly₁₅₉₀ beginnen muss, um die virale Replikation zu erlauben (Tautz and Thiel, 2003). Damit deuteten mehrere unabhängige Ergebnisse darauf hin, dass Gly₁₅₉₀ den konservierten N-Terminus von NS3 bildet. Der starke Effekt von Mutationen der Aminosäuren vor und nach der putativen NS2-3-Spaltstelle (Spuren 8 und 9 in Abb. B3) deutete bereits darauf hin, dass diese Stelle auch zur Spaltung

Ergebnisse

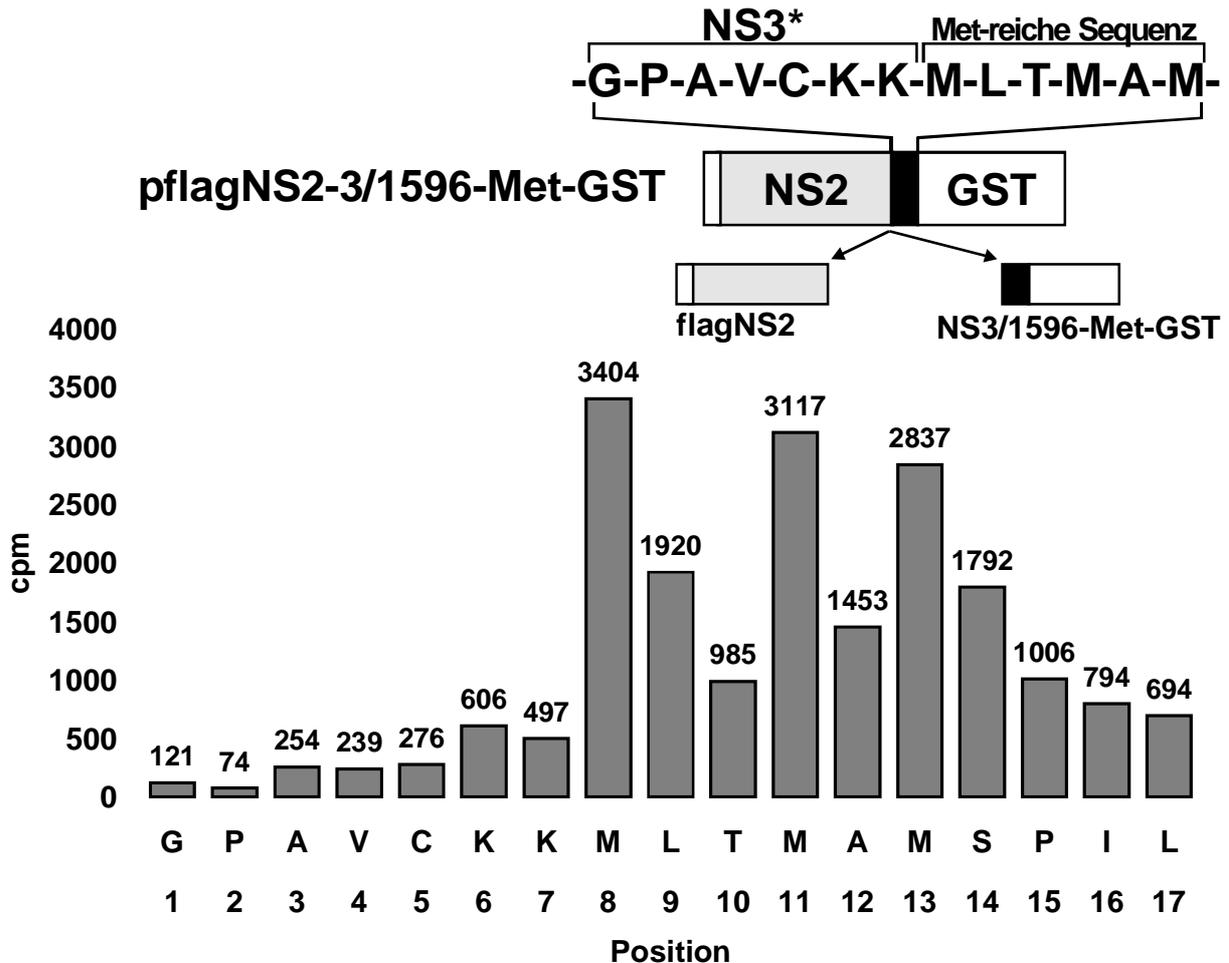


Abbildung B4: Radiosequenzierung des N-Terminus von NS3 des BVDV-Stammes CP7

Das für die Protein-Expression in BHK Zellen verwendete Konstrukt ist in der Abbildung oben schematisch dargestellt. Es besteht aus NS2 und den ersten sieben Aminosäuren NS3, gefolgt von einer Methionin-reichen Sequenz und GST. Das Protein wurde mit ^{35}S -Methionin metabolisch markiert und sein C-terminales Spaltprodukt (NS3/1596-Met-GST) mittels RIP aufgereinigt. Das Diagramm zeigt die Menge an Radioaktivität (cpm = Zerfälle pro Minute) an, die durch die einzelnen Zyklen des Edman-Abbaus (Zahlen an der X-Achse) aus dem isolierten NS3/1596-Met-GST freigesetzt wurden. Die stärksten Signale wurden in den Abbau-Zyklen 8, 11 und 13 beobachtet; an diesen Positionen befinden sich die Methionine, wenn die Spaltung von NS2-3 zwischen AS 1589 und 1590 stattfindet.

von NS2-3 im CP7-Kontext genutzt wird. Um dies experimentell zu beweisen, wurde der N-Terminus von CP7 NS3 durch Radiosequenzierung bestimmt. Hierzu erfolgte, basierend auf dem Konstrukt pflagNS2-3/1596GST, zwischen den verbliebenen sieben Aminosäuren NS3 und GST die Insertion einer Methionin-reichen Sequenz (pflagNS2-3/1596-Met-GST). Sollte es sich bei Gly₁₅₉₀ wirklich um den N-Terminus von NS3 halten, lägen die Methionine von

Ergebnisse

dieser Stelle aus gesehen an den Positionen 8, 11 und 13; durch Markierung des Proteins mittels radioaktivem ^{35}S -Methionin müssten daher im Verlauf des Edman-Abbaus des gereinigten Spaltproduktes in den Abbauzyklen 8, 11 und 13 besonders starke radioaktive Signale auftreten. Die experimentelle Analyse erbrachte das zu erwartende Ergebnis (Abb. B4); Gly₁₅₉₀ wurde damit als N-Terminus von NS3 auch beim Stamm CP7 bestätigt.

6.1.3 Zwei der vorhergesagten katalytischen Aminosäuren der NS2-Protease sind essentiell für die NS2-3-Autoprozessierung

Um das Modell der NS2-Protease weiter zu bestätigen, wurden die Effekte von Punktmutationen im NS2 auf die Prozessierungseffizienz von NS2-3 untersucht. Insgesamt wurden die Aminosäuren an den drei putativ katalytischen, den fünf putativ Zink-bindenden und an zwölf anderen Kontroll-Positionen meist durch verschiedene andere Aminosäuren, zumindest aber durch Alanin ersetzt. Insgesamt wurden so 64 Punktmutanten auf der Basis einer für E2-NS4A kodierenden cDNA untersucht (Abb. B5, B6 und B7). An elf Positionen war der Einfluss der Mutation zu Alanin auf die Effizienz der NS2-3-Spaltung gering oder vernachlässigbar (über 75% der Wildtyp (wt)-Aktivität, Farbcode: grün). An drei Positionen, bei einer Glutaminsäure und zwei Cysteinen, war der Einfluss dieses Austausches moderat (mehr als 10%

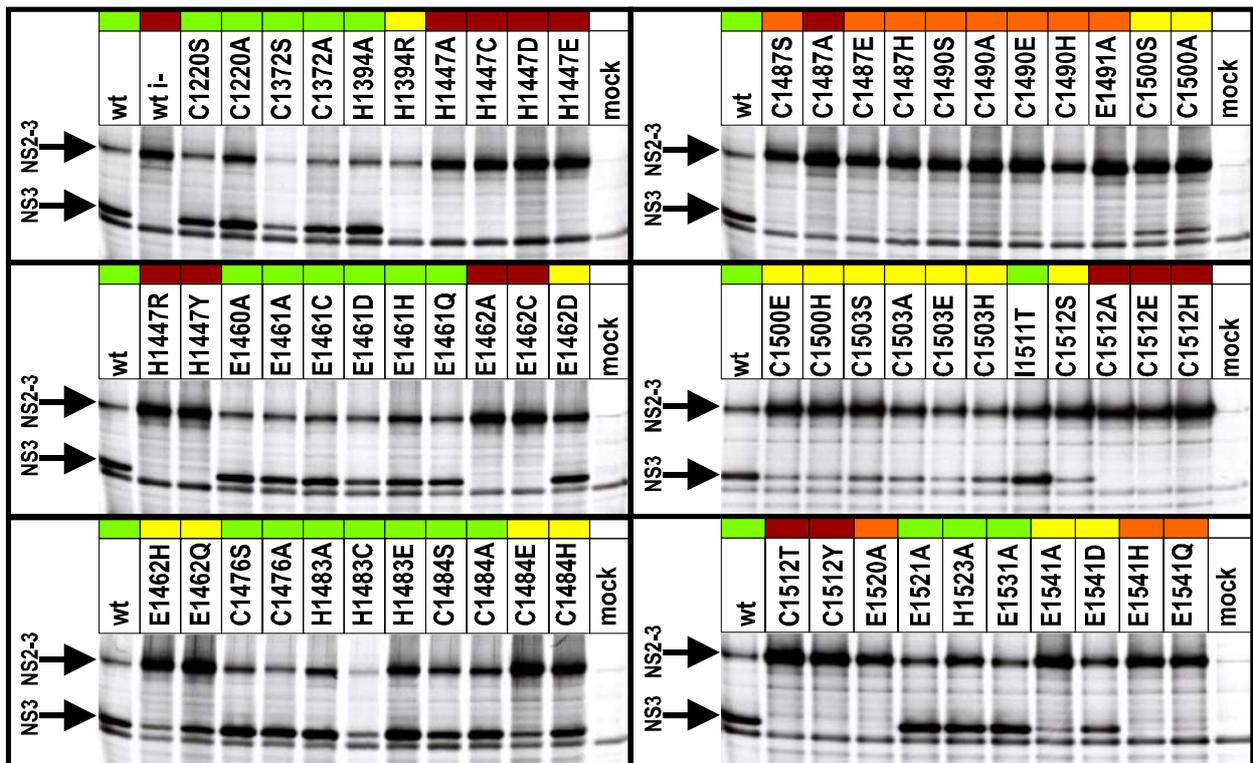


Abbildung B5: Effekte von Punktmutationen im NS2 auf die NS2-3-Spaltung (RIP)

Die Nummern über den Spuren entsprechen der Aminosäurenposition (nach BVDV SD-1). Metabolisch radioaktiv markiertes NS2-3 und NS3 wurde über RIP mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3 aus den Zell-Lysaten aufgereinigt. Die Quantifizierung erfolgte am Phosphorimager. Der Farbcode symbolisiert die Effizienz der NS2-3 Spaltung (% vom wt): grün = über 75%, gelb = über 10%, orange = unter 10%, rot = kein freies NS3 sichtbar.

Ergebnisse

der wt-Aktivität, Farbcode: gelb) und an sieben Positionen (drei Cysteine, ein Histidin und drei Glutaminsäuren) am ausgeprägtesten (weniger als 10% der wt Aktivität oder keine nachweisbare Aktivität, Farbcode: orange bzw. rot). Die Effekte auf die Prozessierungseffizienz wurden über Phosphorimager-Analyse für alle Mutanten quantifiziert (Tab. B1). Bei insgesamt 19 Mutanten an elf Positionen erfolgte dies in drei unabhängigen Experimenten (Abb. B6); hierfür wurden die Mutanten der putativ katalytischen Aminosäuren H₁₄₄₇ und C₁₅₁₂, zweier Glutaminsäuren und des putativen Zinkfingers ausgewählt.

Nach den Ergebnissen der Bioinformatik sollte es sich bei H₁₄₄₇, E₁₄₆₂ und C₁₅₁₂ um die Aminosäuren handeln, die das katalytische Zentrum der NS2-Protease formieren. Alle sechs Austausche an der Position des putativ katalytischen Histidins H₁₄₄₇ verhinderten die Prozessierung von NS2-3, was

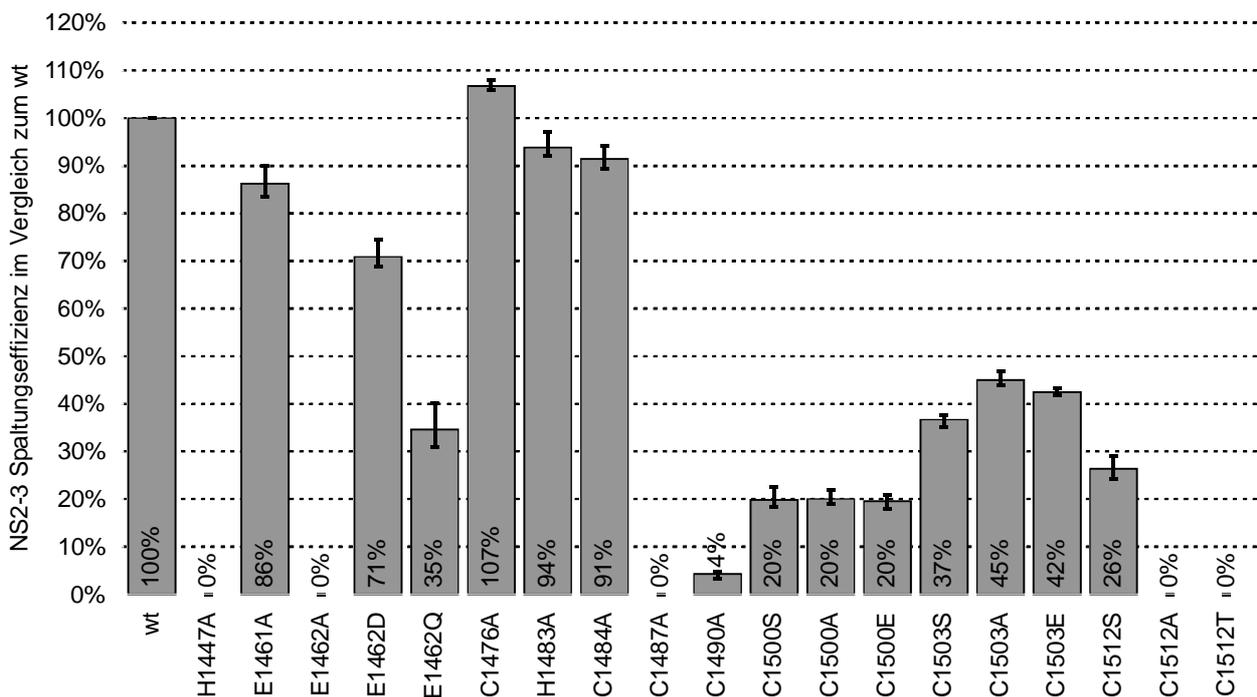


Abbildung B6: Effekte von Punktmutationen im NS2 auf die NS2-3-Spaltung (Werte aus drei unabhängigen Experimenten)

Die NS2-3-Spaltungseffizienz wurde aus den Werten dreier unabhängiger Messungen ermittelt (Phosphorimager Analyse). Die Fehlerbalken geben den höchsten und den niedrigsten dieser drei Messwerte an, die Säulen den Mittelwert. Die Effekte von H1483A und C1484A sind sehr gering; daher kann man davon ausgehen, dass diese beiden Aminosäuren an der Formation der zinkbindenden Struktur im NS2 nicht beteiligt sind. Der Austausch des katalytischen Cysteins zu Serin (C1512S) erlaubt 26% der NS2-3 Spaltungseffizienz des Wildtyps.

Ergebnisse

dessen Rolle als katalytische Aminosäure unterstreicht und das bioinformatische Modell unterstützt. Das putativ katalytische Cystein C₁₅₁₂ tolerierte fünf von sechs Substitutionen nicht; nur der Austausch zu Serin wurde teilweise toleriert (26 % Spaltungseffizienz bezogen auf den wt, Abb. B6). Dieser Befund stellte eine besonders wichtige Beobachtung der Mutationsstudie dar, da diese teilweise Toleranz eines Serins anstelle eines Cysteins dem typischen Profil eines nukleophilen Cysteins bewiesener Proteasen entspricht (Hellen and Wimmer, 1992; Lawson and Semler, 1991). Insgesamt bestätigen die erhaltenen Ergebnisse für H₁₄₄₇ und C₁₅₁₂ deren vorhergesagte Rolle als katalytische Aminosäuren. Die für die dritte putative katalytische Aminosäure, E₁₄₆₂, erhaltenen Daten ergaben jedoch kein klares Bild in dieser Mutagenese-Studie; an dieser Position führten nur zwei von fünf Substitutionen zum Erliegen der Protease-Aktivität. Im Gegensatz zu den direkt benachbarten Glutaminsäuren E₁₄₆₀ und E₁₄₆₁ spielt E₁₄₆₂ zwar eine wichtige Rolle bei der Prozessierung, zeigt aber nicht das Profil, das man für eine katalytische Aminosäure erwarten würde. Daher ist bei der pestiviralen NS2-Protease von einer katalytischen Diade, gebildet von H₁₄₄₇ und C₁₅₁₂ (rote Schrift in Abb. B7), anstelle einer Triade auszugehen.

Die bioinformatische Analyse sagte zudem eine Zink-bindende Struktur voraus: demnach sollten vier der sechs bei Pestiviren konservierten His/Cys-Positionen (H₁₄₈₃, C₁₄₈₄, C₁₄₈₇, C₁₄₉₀, C₁₅₀₀, C₁₅₀₃; blau hinterlegt in Abb. B1) an der Koordination eines Zink-Ions beteiligt sein. Für alle Mutationen an den Positionen C₁₄₈₇ und C₁₄₉₀ konnte nur eine sehr ineffiziente Prozessierung von NS2-3 beobachtet werden. Eine deutliche Reduktion der Spaltungseffizienz trat auch bei den Austauschen von C₁₅₀₀ und C₁₅₀₃ auf, während Veränderungen an H₁₄₈₃ und C₁₄₈₄ keinen oder nur einen geringen Effekt hatten. Demnach sind C₁₄₈₇, C₁₄₉₀, C₁₅₀₀ und C₁₅₀₃ wahrscheinlich die Zink-koordinierenden Aminosäuren (blau hinterlegt in Abb. B7).

Ergebnisse

Die Mutagenese-Studie unterstreicht die Verwandtschaft zwischen hepaci- und pestiviralem NS2. Sie bestätigt und verfeinert das aus den bioinformatischen Analysen erhaltene Modell. Aus Bioinformatik und Mutagenese-Studie kann man zusammenfassend schlussfolgern: Die entscheidenden, wahrscheinlich katalytischen Aminosäuren der NS2-Protease von Pestiviren sind His₁₄₄₇ und Cys₁₅₁₂; die Cysteine an den Positionen 1487, 1490, 1500 und 1503 koordinieren vermutlich ein Zink-Ion in der putativen Zink-bindenden Struktur, während H₁₄₈₃ und C₁₄₈₄ daran nicht beteiligt sind.

Ergebnisse

Tabelle B1: NS2-3-Spaltungseffizienz bei allen untersuchten Punktmutanten im NS2

Die Ermittlung der Werte der Spaltungseffizienz (NS3 / (NS3 + NS2-3)) erfolgte nach transienter Expression des Polyproteinfragmentes E2-NS4A von BVDV CP7 und dessen Punktmutanten in BHK-Zellen, metabolischer Markierung, Radioimmunpräzipitation, SDS-PAGE und Quantifizierung mittels Phosphorimager; die Daten stammen aus einem oder drei unabhängigen Experimenten (siehe auch Abb. B6). Der Wert für BVDV CP7 wt wurde als 100 % definiert und die anderen Ergebnisse entsprechend normiert.

Mutation	Spaltungs-Effizienz	Mutation	Spaltungs-Effizienz	Mutation	Spaltungs-Effizienz
Wt i+	100 %	E1462D	71 %	C1500A	20 %
C1220S	96 %	E1462H	26 %	C1500E	20 %
C1220A	94 %	E1462Q	35 %	C1500H	24 %
C1372S	99 %	C1476S	105 %	C1503S	37 %
C1372A	98 %	C1476A	107 %	C1503A	45 %
H1394A	102 %	H1483A	94 %	C1503E	42 %
H1394R	22 %	H1483C	95 %	C1503H	65 %
H1447A	0 %	H1483E	95 %	I1511T	91 %
H1447C	0 %	C1484S	84 %	C1512S	26 %
H1447D	0 %	C1484A	91 %	C1512A	0 %
H1447E	0 %	C1484E	21 %	C1512E	0 %
H1447R	0 %	C1484H	64 %	C1512H	0 %
H1447Y	0 %	C1487S	6 %	C1512T	0 %
E1460A	99 %	C1487A	0 %	C1512Y	0 %
E1461A	86 %	C1487E	2 %	E1520A	2 %
E1461C	93 %	C1487H	5 %	E1521A	97 %
E1461D	77 %	C1490S	6 %	H1523A	75 %
E1461H	77 %	C1490A	4 %	E1531A	94 %
E1461Q	85 %	C1490E	7 %	E1541A	14 %
E1462A	0 %	C1490H	10 %	E1541D	66 %
E1462C	0 %	E1491A	5 %	E1541H	1 %
		C1500S	20 %	E1541Q	5 %

Ergebnisse

```

EPGAQGYLEQ VDLSTMITI IVIGLVIARR DPTVVPLVTI VAALKITGLG
                                     C1220
FGPGVDAAMA VLTLTLLMTS YVTDYFRYKR WIQCILSLVA GVFLIRTLKH
                                     S
                                     A

LGELKTPELT IPNWRPLTFI LLYLTSATVV TRWKIDIAGI FLQGAPILLM
IATLWADFLT LVLILPTYEL AKLYYLKNVK TDVEKSWGVP YPDPQTLGGL
                                     C1372
DYRTIDSVYD VDES GEGVYL FPSRQKKKNK ISILLPLIRA TLISCISSKW
                                     S
                                     A

                                     H1394
QMVY MAYLTL DFMYYMHRKV IEEISGSTNV MSRVIAALIE LNWSMEEEEES
                                     A
                                     R
                                     E1462
                                     E1461
                                     E1460
KGLKKFFILS GRLRNLI IKH KVRNQTVASW YGEEEVYGMPT KVVTTIRACT
                                     H1447
                                     A
                                     C
                                     D
                                     E
                                     R
                                     Y
                                     AA
                                     A
                                     CC
                                     DD
                                     HH
                                     QQ
                                     C1476
                                     S
                                     A

                                     C1487
                                     C1491
C1484 E1491
H1483 C1490
LNKNKHCIIC TVCEARKWKG GNCPKCGRHG KPIICGMTLA DFEEERHYKRI
                                     S
                                     S
                                     S
                                     A
                                     A
                                     A
                                     H
                                     H
                                     H
                                     S
                                     S
                                     S
                                     A
                                     A
                                     A
                                     H
                                     H
                                     H
                                     TS
                                     A
                                     E
                                     H
                                     T
                                     Y
                                     H1523
                                     E1521
                                     E1520
                                     AA
                                     A

E1531 E1541
FIREGNFEGP FRQEYNGFVQ YTARGQLFLR NLPILATKVK MIMVGNLGEE
A
A
D
H
Q

IGDLEHLGWI LRGPAVCKK

```

Abbildung B7: Übersicht der Effekte von Punktmutationen im NS2 auf die NS2-3-Spaltung

Die Abbildung zeigt die gesamte NS2-Sequenz und die ersten sieben Aminosäuren von NS3 (unterstrichen). Der Einfluß von Punktmutationen im NS2 auf die Effizienz der NS2-3-Spaltung wird durch den Farbcode angezeigt (siehe Abb. B5). Die BVDV CP7-spezifische Insertion von neun Aminosäuren im NS2 ist fett-kursiv dargestellt. Die nach den Ergebnissen der Mutagenese-Studie wahrscheinlichen Funktionen von Aminosäuren werden ebenfalls durch die Farbgebung symbolisiert: Rote Schrift auf schwarzem Grund = katalytisch; weisse Schrift auf blauem Grund = zinkbindend.

6.1.4 Die NS2-Protease ist in cis aktiv

Die NS2-Protease des BVDV-Stammes CP7 katalysiert den bisherigen Ergebnissen zufolge die Abspaltung von NS3 innerhalb eines NS2-3-Vorläuferproteins, sie ist folglich eine Autoprotease und in cis (Protease und Substrat befinden sich innerhalb des gleichen Moleküls) aktiv. Um abzuklären, ob auch eine Spaltung in trans (Protease und Substrat in

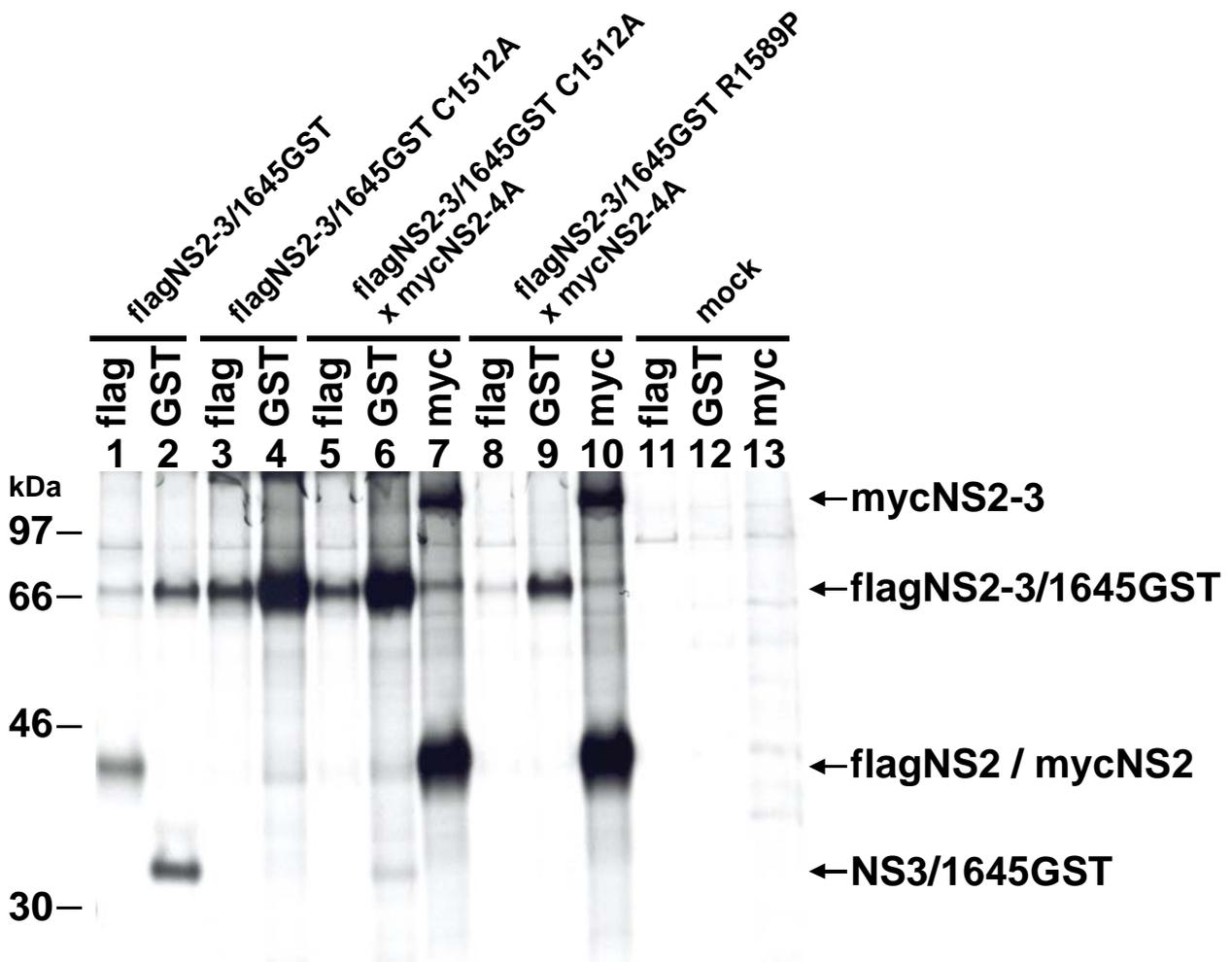


Abbildung B8: Untersuchung zur trans-Aktivität der NS2-Protease (RIP)

Die Radioimmunpräzipitation wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. In BHK-Zellen transient exprimiertes flagNS2-3/1645GST wird in flagNS2 (Spur 1) und NS3/1645GST (Spur 2) gespalten. Durch die Substitution des katalytischen C1512 zu Alanin wird dies verhindert (Spuren 3 und 4); dieses Konstrukt diente im Folgenden als Substrat zum Nachweis oder Ausschluss einer Spaltbarkeit in trans. NS2 setzte sich hierzu in kotransfizierten Zellen selbständig aus dem Protein mycNS2-4A frei (Spur 7). Trotz Anwesenheit grosser Mengen von mycNS2 konnte praktisch keine Spaltung von flagNS2-3/1645GST C1512A beobachtet werden, denn es konnte kein flagNS2 (Spur 5) und nur sehr geringe Mengen eines mit NS3/1645GST komigrierenden Proteins (Spur 6) beobachtet werden. Die Spaltstellenmutante R1589P diente als Negativkontrolle (Spuren 8 bis 10).

Ergebnisse

verschiedenen Molekülen) erfolgen kann, sollte untersucht werden, ob die NS2-Protease ein separat vorliegendes NS2-3-Substrat spalten kann.

Hierzu wurde als Substrat ein NS2-3-Protein in BHK-Zellen exprimiert, welches in cis von der NS2-Protease aufgrund der Substitution des katalytischen Cysteins (C₁₅₁₂) nicht gespalten werden kann; dieses Substrat-Protein erlaubte die Detektion eventuell auftretender Spaltprodukte durch ein N-terminales flag-Epitop und C-terminales GST (flagNS2-3/1645GST C1512A; Spuren 3 und 4 in Abb. B8). Als Protease diente ein NS2-Protein mit N-terminalem myc-Epitop; um sicherzustellen, dass diese Protease prinzipiell aktiv ist, wurde zur Expression in den BHK-Zellen ein Vorläuferprotein (mycNS2-4A) verwendet, das die viralen Nichtstrukturproteine NS2 bis NS4A enthielt. Die NS2-Protease befreite sich aus diesem Protein selbständig, was eine Aktivität des Enzyms in cis belegte (Spuren 7 und 10 in Abb. B8). Die freie Protease sollte nun, sofern sie in trans aktiv ist, auch die Spaltung des angebotenen Substrates bewerkstelligen.

Die Proteine wurden in BHK-Zellen transient exprimiert, metabolisch markiert und nach Denaturierung durch Aufkochen in 2% (w/v) SDS mit flag-, GST- und myc-spezifischen monoklonalen Antikörpern immunpräzipitiert (Abb. B8). Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Positivkontrolle zeigte die zu erwartenden Spaltprodukte flagNS2 (Spur 1) und NS3/1645GST (Spur 2). Erwartungsgemäß unterblieb bei Vorliegen der C1512A Substitution die Prozessierung in cis (Spuren 3 und 4). Bei Koexpression von flagNS2-3/1645GST C1512A (Substrat) und mycNS2-4A (Protease) konnte eine effektive Prozessierung von mycNS2-3 in cis beobachtet werden; trotz der großen Mengen an freier Protease (mycNS2, Spur 7) konnten allerdings keine sicheren Anzeichen einer Spaltung des flagNS2-3GST C1512A in trans festgestellt werden: flagNS2 war nicht nachweisbar (Spur 5) und ein Protein mit einem Molekulargewicht ähnlich

Ergebnisse

dem von NS3/1645GST war nur in sehr kleinen Mengen zu detektieren (Spur 6). Als Negativkontrolle diente die Spaltstellen-Mutante R1589P des Substrates, die weder in cis noch trans prozessiert werden kann; auch hier konnte erwartungsgemäß kein freies flagNS2 gefunden werden (Spur 8); allerdings existierte in diesem Fall ein geringes Signal auf der Höhe des NS3/1645GST (Spur 9). Es ist diesen Ergebnissen zufolge nicht völlig ausgeschlossen, dass eine äußerst geringe Aktivität der NS2-Protease in trans vorliegt, allerdings bleibt festzuhalten, dass diese Aktivität, sofern sie überhaupt vorliegt, wahrscheinlich keine Rolle spielt. Die eigentliche Aufgabe der NS2-Protease ist somit die Spaltung des NS2-3 in cis.

In CP7-infizierten Zellen wird den bisherigen Ergebnissen zufolge NS2-3 durch die NS2-Autoprotease in cis in NS2 und NS3 zerlegt. Welche Bedeutung diese Prozessierung für das Virus in vivo hat, sollte im Folgenden untersucht werden.

6.1.5 Die NS2-Protease ist essentiell für die RNA-Replikation von BVDV CP7

Um die Bedeutung der NS2-Protease für die pestivirale Replikation *in vivo* zu untersuchen, wurden drei Mutationen der katalytischen Aminosäuren H₁₄₄₇ und C₁₅₁₂, eine Mutation des E₁₄₆₂, eine des am putativen Zinkfinger beteiligten Cysteins (C₁₅₀₃), eine Kontroll-Mutation eines Cysteins in der Nähe des Zinkfingers (C₁₄₈₄), sowie eine Mutation an der NS2-3-Spaltstelle (R₁₅₈₉) in das vollständige Genom von BVDV CP7 integriert. Die cDNA des Gesamtklons und seiner Mutanten wurde durch Restriktionsenzym-Verdau am 3'-Ende linearisiert und *in vitro* transkribiert. Die erhaltene infektiöse RNA konnte durch Elektroporation in MDBK-Zellen eingeschleust werden. 24 und 48 Stunden nach der Elektroporation (p.e.) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels Markierung mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3 / NS2-3 mit anschließender Immunfluoreszenz auf NS3 / NS2-3 Expression untersucht. Aus früheren Studien war bekannt, dass die Detektion von NS3 bzw. NS2-3 in der Immunfluoreszenz ein sicheres Anzeichen für virale RNA-Replikation ist (Behrens et al., 1996; Mendez et al., 1998; Meyers et al., 1996). Zeitgleich wurde auch auf das Auftreten eines zytopathischen Effekts (CPE) geachtet, sowie die Infektiositätstiter im Zellkultur-Überstand zu den oben angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

Das CP7 wt Transkript diente als Positiv-Kontrolle. Bereits 24 h p.e. waren fast alle Zellen in der Immunfluoreszenz deutlich positiv, was auf eine Replikation der viralen RNA und virale Proteinsynthese schließen lässt (Abb. B9). 48 Stunden p.e. wurde außerdem ein deutlicher CPE sichtbar, und der Titer erreichte im Kulturüberstand $1,1 \times 10^6$ TCID₅₀/ml.

Im Gegensatz dazu gab es 24 und 48 Stunden nach Elektroporation von Transkripten mit den Mutationen C1512A oder H1447A an den beiden katalytischen Aminosäuren der NS2-Protease (keine nachweisbare NS2-3-Prozessierung im T7-Vacciniavirus-System) keine Anzeichen von Virus-

Ergebnisse

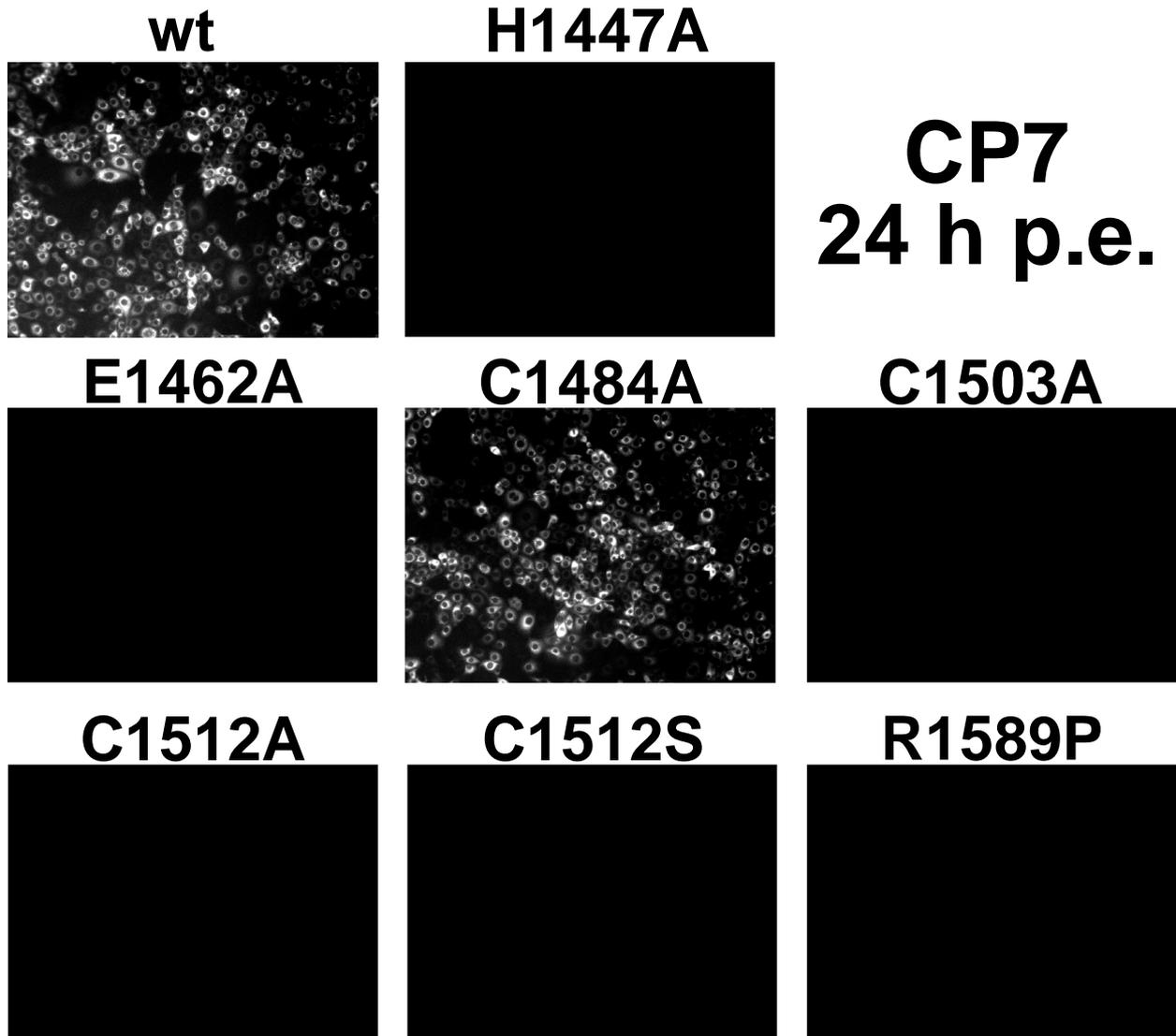


Abbildung B9: Effekte von Punktmutationen im NS2 von BVDV CP7 in vivo 24 h p.e.
Analyse von MDBK Zellen 24 Stunden nach Elektroporation mit einer genomischen viralen RNA mittels Immunfluoreszenz auf Vorhandensein von NS3 / NS2-3 mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3. Die eingeführten Mutationen sind über den einzelnen Bildern angegeben. Die Fotos zeigen einen repräsentativen Ausschnitt aus der jeweiligen Zellkulturschale. Für die Mutanten E1462A, C1503A und R1589P wurden einzelne positive Zellen gefunden (nicht gezeigt).

Replikation. Gleiches gilt für die Mutante C1512S (26% NS2-3-Prozessierungs-Effizienz im T7-Vacciniavirus-System; Abb. B9 und B10).

Die vier untersuchten Mutanten, bei denen die Austausch an nicht-katalytischen Positionen vorgenommen wurden (E1462A, C1484A, C1503A, R1589P), waren zumindest in geringer Weise replikationskompetent; generell korrelierten die negativen Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die

Ergebnisse

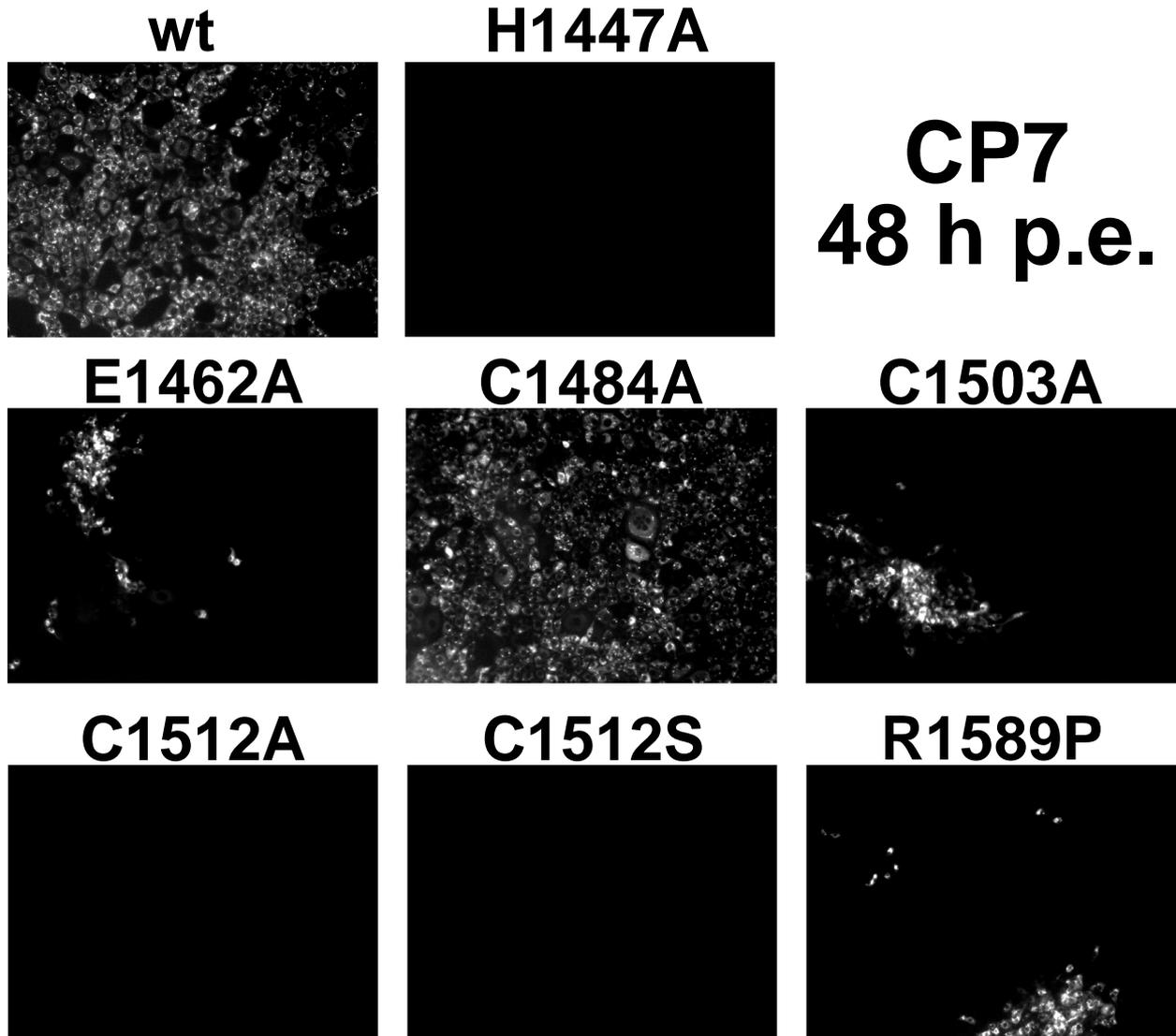


Abbildung B10: Effekte von Punktmutationen im NS2 von BVDV CP7 in vivo 48 h p.e. Analyse von MDBK Zellen 48 Stunden nach Elektroporation mit einer genomischen viralen RNA mittels Immunfluoreszenz auf Vorhandensein von NS3 / NS2-3 mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3. Die eingeführten Mutationen sind über den einzelnen Bildern angegeben. Die Fotos zeigen einen repräsentativen Ausschnitt aus der jeweiligen Zellkulturschale. Die Mutationen an den Positionen E1462, C1503 und R1589 erlaubten die Entstehung von Revertanten. Für die Substitutionen H1447A, C1512A und C1512S konnte keine virale RNA-Replikation nachgewiesen werden.

virale RNA-Replikation mit der zuvor gemessenen Reduktion der NS2-3-Spaltungseffizienz im T7-Vacciniavirus-System.

Praktisch alle Zellen, die mit dem C1484A Transkript elektroporiert worden waren, erschienen in der Immunfluoreszenz 24 Stunden p.e. deutlich positiv für NS2-3/NS3 (91% Spaltungseffizienz im T7-Vacciniavirus-System). Der

Ergebnisse

Virustiter erreichte 48 Stunden p.e. im Zellkulturüberstand $2,5 \times 10^6$ TCID₅₀/ml.

Bei einem von drei unabhängigen Experimenten mit den C1503A Transkripten (putativ an der Formation des Zinkfingers beteiligt; 45 % Spaltungseffizienz im T7-Vacciniavirus-System) wurden 24 Stunden p.e. einige wenige Antigen-positive Zellen beobachtet (nicht gezeigt); 48 Stunden p.e. fanden sich einzelne positiv reagierende Inseln von Zellen in der Zellkulturschale (Abb. B10). Sogar die zur einer nachweisbaren NS2-3-Spaltung nicht befähigten Mutanten R1589P (Austausch an der NS2-3-Spaltstelle) und E1462A (Austausch einer konservierten Glutaminsäure, putativ katalytisch nach den bioinformatischen Ergebnissen) stellten sich als quasi-infektiös heraus, da NS2-3 / NS3 in etwa 20-40 einzelnen Zellen innerhalb einer mit einem dichten Monolayer bewachsenen 3 cm-Schale mittels Immunfluoreszenz 24 Stunden p.e. nachgewiesen werden konnte. Auch hier bildeten sich 48 Stunden p.e. vereinzelt positive Inseln (Abb. B10); das dort replizierende Virus wurde weiter vermehrt und der mutierte Bereich der NS2-kodierenden Region mittels RT-PCR und anschließender DNA-Sequenzierung analysiert. In drei unabhängig hergestellten cDNA-Klonen wurde eine Reversion an der Stelle des mutagenisierten Kodons festgestellt. Eine Kontamination mit CP7 wt RNA ließ sich bei diesen Untersuchungen ausschließen, da nur das entsprechende Codon revertierte, ein stiller genetischer Marker (Schnittstelle eines Restriktionsenzym) in dessen Nähe aber weiterhin vorhanden war. Die RNAs mit den Mutationen C1503A, R1589P und E1462A waren folglich zumindest insoweit replikationskompetent, um eine Reversion zum wt in einigen wenigen Zellen zu erlauben. Nur wenn die Mutationen zu Austauschen an den katalytischen Aminosäuren der NS2-Protease (C₁₅₁₂, H₁₄₄₇) führten, konnten absolut keine Antigen-positiven Zellen beobachtet werden. Dies ist ein Befund, der das bioinformatische Modell und die Ergebnisse der Mutagenese-Studie bestätigt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser in-vivo-Untersuchung zeigten, dass die NS2-3-Prozessierung und damit auch die vorhergesagte NS2-Protease essentiell für die virale RNA-Replikation von cp BVDV CP7 sind; folglich benötigt dieses Virus eine aktive NS2-Protease zwingend zur eigenen Vermehrung. Die katalytische Rolle der Aminosäuren H₁₄₄₇ und C₁₅₁₂ wurde durch die Ergebnisse der Experimente ebenfalls erneut nahe gelegt. Es ergaben sich, wie auch schon in der Mutagenese-Studie, keine Hinweise auf eine katalytische Rolle der Glutaminsäure an Position 1462.

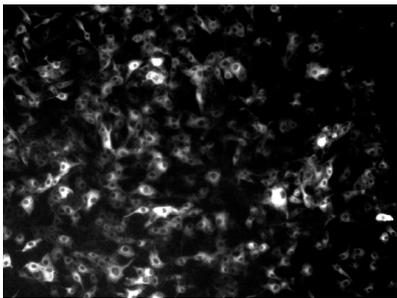
Zumindest für CP7 kann aus diesen Versuchen also geschlussfolgert werden, dass ungespaltenes NS2-3 seine Spaltprodukte funktionell nicht ersetzen kann, denn sonst hätte auch ohne NS2-3-Spaltung eine virale RNA-Replikation erfolgen müssen. Naheliegend war nun die Frage, ob dieser Befund nur für cp BVD-Viren wie CP7 Gültigkeit besitzt, oder ob die NS2-Protease auch für noncp BVDV essentiell ist.

6.1.6 Es gibt Hinweise auf eine essentielle Bedeutung der NS2-Protease auch für noncp BVDV

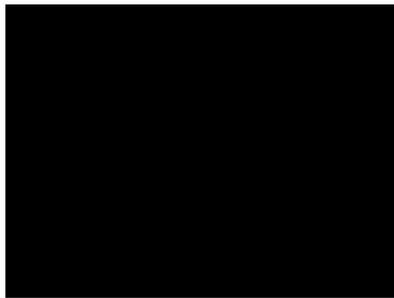
Den bisherigen Ergebnissen zufolge wird NS2-3 in CP7-infizierten Zellen durch eine Autoprotease im NS2 gespalten. Nach den bioinformatischen Analysen ist diese Protease prinzipiell auch im NS2 von noncp BVDV existent, jedoch abgeschaltet, denn in noncp BVDV-infizierten Zellen wurde bisher kein freies NS3 und damit noch nie eine Spaltung von NS2-3 beobachtet. Erst durch die Insertion von neun Aminosäuren im NS2 von CP7 wird die Protease gemäß dem beschriebenen Modell aktiviert (siehe Einleitung). Die essentielle Rolle der NS2-Protease für die RNA-Replikation

NCP7 24 h p.e.

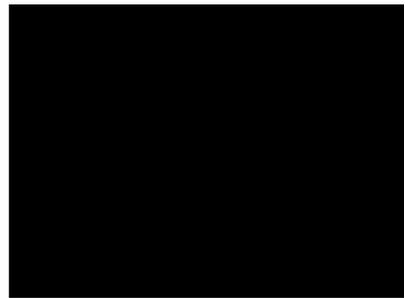
wt



H1447A

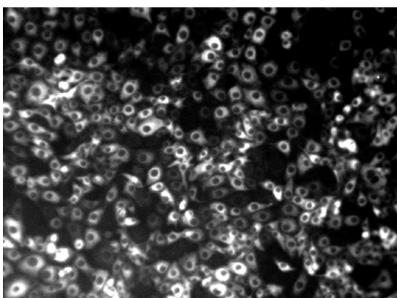


C1512A

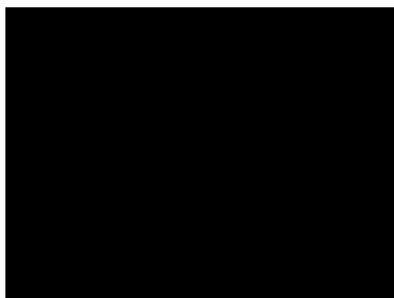


NCP7 48 h p.e.

wt



H1447A



C1512A

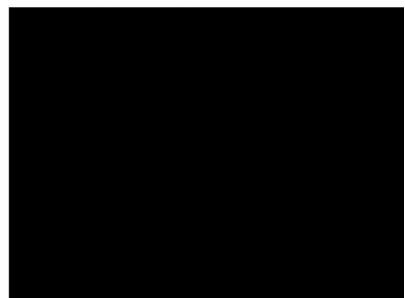


Abbildung B11: Effekte von Punktmutationen im NS2 von BVDV NCP7 in vivo

Analyse von MDBK Zellen 24 und 48 Stunden nach Elektroporation einer genomischen viralen RNA mittels Immunfluoreszenz auf Vorhandensein von NS3 / NS2-3 mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3. Die eingeführten Mutationen sind über den einzelnen Bildern angegeben. Die Fotos zeigen einen repräsentativen Ausschnitt aus der jeweiligen Zellkulturschale. RNAs des noncp BVDV NCP7 sind unfähig zur RNA-Replikation, wenn sie Austausch in den Codons für die putativ katalytischen Aminosäuren der NS2 Protease tragen. Dies impliziert eine essentielle Rolle der NS2 Protease auch für noncp BVDV.

Ergebnisse

von BVDV CP7 gab Anlass zu Spekulationen über die Aktivität dieser Protease auch bei noncp BVDV, denn es war schwer nachzuvollziehen, wieso ein zytopathogener BVDV-Stamm abhängig und ein nichtzytopathogener unabhängig von der NS2-Protease sein sollte.

Um die Anwesenheit einer aktiven NS2-Protease in noncp BVDV-infizierten Zellen zu überprüfen, wurden die Austausche an den Positionen der katalytischen Aminosäuren H₁₄₄₇ und C₁₅₁₂ zu Alanin in die cDNA des noncp BVDV NCP7 eingeführt. Die transkribierten RNAs dieser Mutanten und die des NCP7 Wildtyps wurden anschließend über Elektroporation in MDBK-Zellen transfiziert.

Bereits 24 Stunden nach der Elektroporation der NCP7 wt RNA ließ der Nachweis von NS2-3 bzw. NS3 in der Immunfluoreszenz wie erwartet eine deutliche Virus-RNA-Replikation erkennen. Der Titer infektiöser Virionen im Überstand der Zellkultur erreichte 48 Stunden p.e. $1,6 \times 10^6$ TCID₅₀/ml.

In Zellen, die infektiöse RNA mit einer C1512A oder H1447A Mutation erhalten hatten, konnte dagegen zu allen untersuchten Zeitpunkten mittels Immunfluoreszenz kein NS2-3 / NS3 nach Elektroporation nachgewiesen werden. Im Zellkulturüberstand wurden im gesamten Beobachtungszeitraum keine infektiösen Virionen gefunden. Diese Befunde legten eine essentielle Rolle der NS2-Protease auch für noncp BVDV nahe, denn durch Mutationen der katalytischen Aminosäuren der NS2-Protease (C₁₅₁₂ bzw. H₁₄₄₇) konnte die RNA-Replikation von noncp BVDV unterbunden werden.

6.1.7 Die Effizienz der NS2-3-Autoprozessierung wird in BVDV-infizierten Zellen Biotyp-spezifisch herunterreguliert

Die bisher beschriebenen Ergebnisse deuteten auf eine essentielle Bedeutung der NS2-3-Spaltung für die Replikation von cp und noncp BVDV hin und forderten damit ein altes Dogma heraus, wonach bei den noncp BVDViren keine NS2-3-Spaltung und damit keine Expression von NS3 erfolgt (Meyers and Thiel, 1996; Pocock et al., 1987). Nach den in dieser Arbeit bisher beschriebenen Daten wäre aber zu erwarten, dass freies NS3 auch in noncp BVDV-infizierten Zellen gefunden werden kann; warum sonst sollten diese Viren von einer intakten NS2-Protease abhängig sein?

Diese offensichtliche Diskrepanz führte zu einer erneuten Suche nach freiem NS3 in noncp BVDV-infizierten Zellen. Wenn NS3 benötigt wird, wieso hat man es bislang nicht gefunden? Es ist denkbar, dass nur äußerst geringe Mengen von NS3 gebildet werden, die unter der Nachweisgrenze der gängigen Detektionsmethoden liegen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass NS3 nur in bestimmten Zeiträumen nach der Infektion in größeren Mengen gebildet wird und man demnach zum falschen Zeitpunkt untersucht hatte. Um diese Frage zu beantworten wurden MDBK-Zellen mit einer MOI von 10 mit BVDV CP7 oder NCP7 infiziert und nicht nur wie üblich 24 und 48 Stunden nach der Infektion (p.i.), sondern auch zu früheren Zeitpunkten (6, 8, 12 h p.i.) lysiert. Die Zell-Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot Analyse zur Detektion von NS2-3 bzw. NS3 unterzogen.

In CP7-infizierten Zellen konnte 6 Stunden nach der Infektion nur freies NS3 und kein ungespaltenes NS2-3 gefunden werden (Abb. B12 oben); 2 Stunden später konnten neben NS3 auch geringe Mengen NS2-3 detektiert werden; die Proteinmengen nahmen aufgrund der Akkumulation im Zell-Lysat mit dem zeitlichen Abstand zur Infektion kontinuierlich zu. Das Verhältnis von NS3 zur Gesamtmenge an nachgewiesenem Protein verschob sich im Infektionsverlauf gleichzeitig zusehends in Richtung des ungespaltenen NS2-

Ergebnisse

3, sodass 48 Stunden nach der Infektion der Zellen das Signal von NS2-3 das von NS3 übertraf (Abb. B12 oben), während 12 Stunden p.i. das Verhältnis noch umgekehrt war.

Erstaunlicherweise ähnelte das Prozessierungsmuster von NCP7-infizierten Zellen zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion dem der CP7-

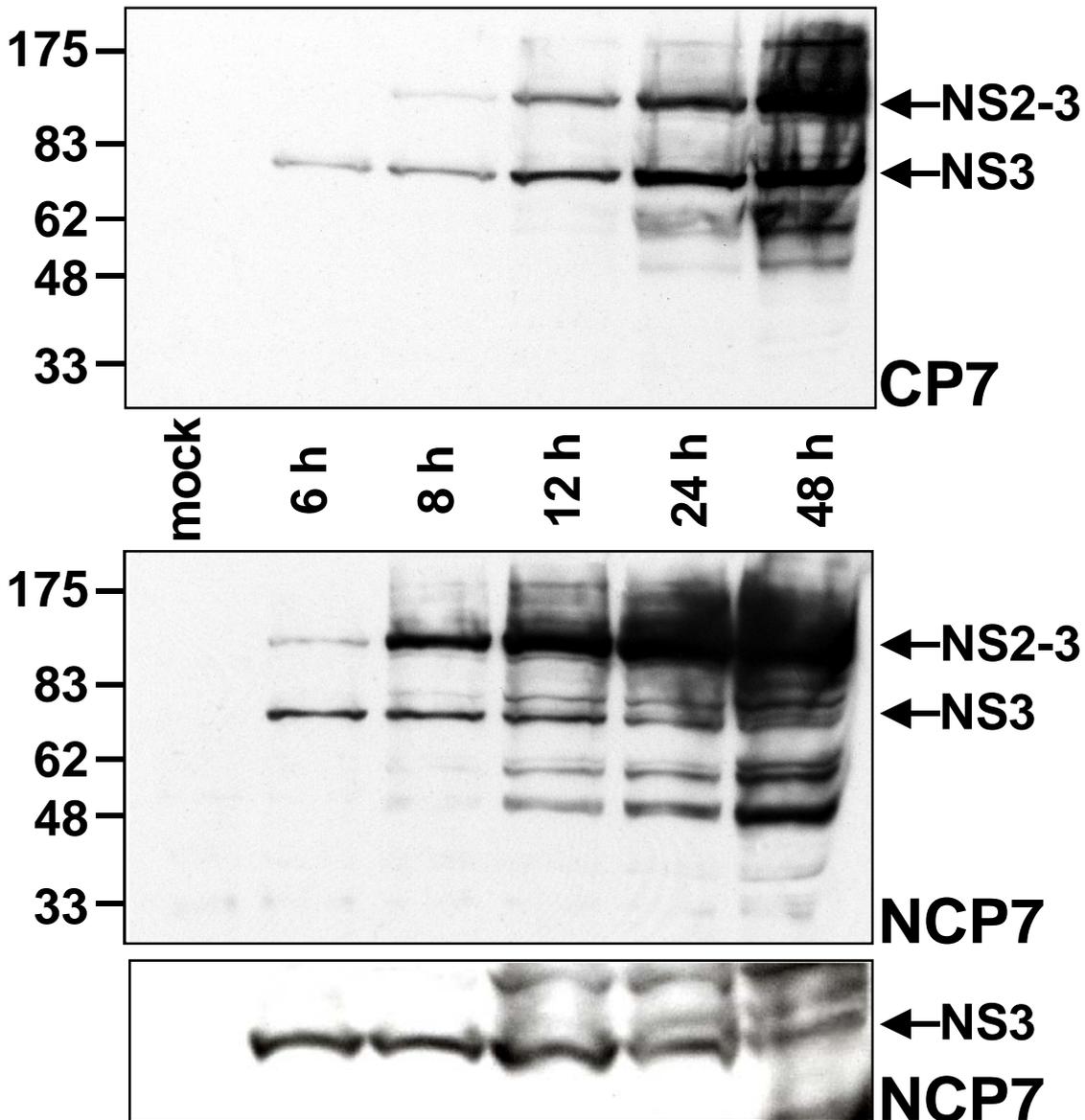


Abbildung B12: Western Blot von MDBK-Zellen nach Infektion mit BVDV CP7 (oben) oder NCP7 (Mitte und unten)

Die Zellen wurden zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (MOI=10) lysiert. Eine 5×10^4 (oben, Mitte) bzw. 5×10^5 (unten) Zellen entsprechende Menge des Lysates wurde über SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot erfolgte die Detektion von NS2-3 und NS3 aus den infizierten Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3. Man beachte die verschiedenen NS2-3 Prozessierungsmuster in den NCP7 und CP7 infizierten Zellen.

Ergebnisse

infizierten Zellen. 6 Stunden p.i. konnten in den NCP7-infizierten Zellen überwiegend freies NS3 und nur geringe Mengen an ungespaltenem NS2-3 gefunden werden (Abb. B12 Mitte). Wurden die Zellen nur zwei Stunden später geerntet, so hatte sich dieses Verhältnis schon gewendet, und NS2-3 dominierte bereits deutlich über das freie NS3 (Abb. B12 Mitte). 12 Stunden nach der Infektion war das Signal von NS3 deutlich geringer als das für NS2-3. Zu den beiden späteren Zeitpunkten war ein eindeutiger Nachweis von NS3 praktisch kaum noch möglich, auch weil sich dann immunoreaktive Degradationsprodukte im Zell-Lysat anhäuften (untere Banden in Abb. B12 Mitte). Um zu überprüfen, ob freies NS3 in den Zellen auch noch 24 oder 48 Stunden p.i. nachzuweisen ist, wurde die etwa zehnfache Menge Zell-Lysat über ein längeres SDS-Gel aufgetrennt und unter den gleichen Konditionen wie zuvor einer Western Blot Analyse unterzogen (Abb. B12 unten). Auf diese Weise war es möglich, im Zell-Lysat geringe Mengen an NS3 auch zu den späten Zeitpunkten p.i. nachzuweisen.

Um die Spaltungskinetik der NS2-Protease zu untersuchen, ist die Analyse über einen Western Blot ungeeignet, da immer nur Aussagen über die Akkumulation von Proteinen bis zum Zeitpunkt der Zell-Lyse möglich sind. Um genauer abzuklären, zu welchen Zeitpunkten nach Infektion eine Spaltung von NS2-3 tatsächlich erfolgt, wurden die Zellen in einem weiteren Experiment zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion jeweils für die Dauer einer Stunde mit ^{35}S -markierten Aminosäuren (Met und Cys) markiert. Auf diese Weise war es möglich, Zeitfenster mit einer „Auflösung“ von einer Stunde direkt auf die NS2-3-Prozessierung hin zu untersuchen. Im direkten Anschluss an die Markierungsperiode wurden die Zellen lysiert und NS2-3 / NS3 über einen NS3-spezifischen monoklonalen Antikörper in einer Immunpräzipitation aus den Zell-Lysaten aufgereinigt. Die präzipitierten Proteine wurden nach Denaturierung auf einem SDS Gel getrennt und über Autoradiographie detektiert. Mittels eines Phosphorimagers konnten die

Ergebnisse

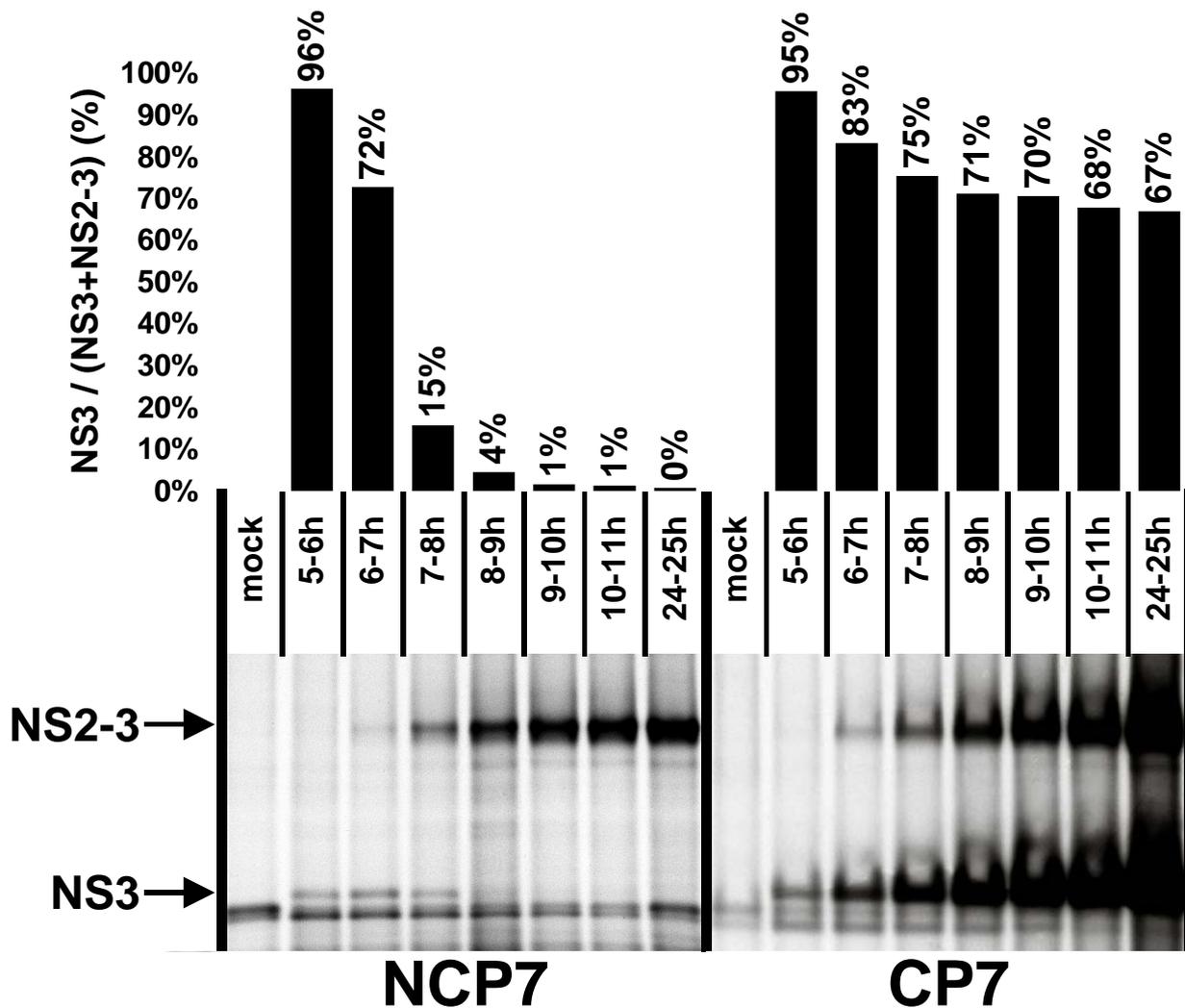


Abbildung B13: RIP-Analyse von MDBK-Zellen nach Infektion mit BVDV NCP7 (links) oder CP7 (rechts).

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (MOI = 10) jeweils für die Dauer einer Stunde metabolisch mit ^{35}S -Methionin und Cystein markiert, die Lysate mit einem NS3-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Quantifizierung der NS2-3 Spaltungseffizienz, dargestellt im Diagramm oben, erfolgte über Phosphorimager-Analyse.

Mengen an NS2-3 und NS3 quantifiziert und der Quotient $\text{NS3} / (\text{NS2-3} + \text{NS3})$ für jede Stunde nach der Infektion getrennt ermittelt werden (Abb. B13).

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung war die NS2-3-Spaltung in NCP7-infizierten Zellen zu den frühesten Messpunkten nach der Infektion am effizientesten. Im Zeitraum zwischen 5 und 6 Stunden p.i. wurde NS2-3 praktisch komplett in NS2 und NS3 gespalten (96% Spaltungseffizienz; Abb. B13). Eine Stunde später wurde ungespaltenes NS2-3 zum ersten Mal

Ergebnisse

sichtbar und die Effizienz der Spaltung sank auf 72%; nach einer weiteren Stunde übertraf die NS2-3-Menge bereits deutlich die von NS3, das nur noch 15% vom gereinigten Gesamtprotein ausmachte. Zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion mit NCP7 war freies NS3 optisch nicht mehr auszumachen und die Werte der Quantifizierung näherten sich dementsprechend Null (Abb. B13, linke Hälfte).

In den CP7-infizierten Zellen (Abb. B13, rechte Hälfte) wurde die höchste Spaltungseffizienz ebenfalls zum frühesten untersuchten Zeitpunkt nach der Infektion beobachtet (95% Spaltungseffizienz). Im weiteren Verlauf sank dieser Anteil auf Werte um 67% ab. 24 Stunden nach der Infektion mit CP7 wird also immer noch 67% des neu entstehenden NS2-3 in NS2 und NS3 gespalten. Bei NCP7 stoppte dieser Prozessierungsschritt bereits ungefähr in der neunten Stunde nach Infektion. Somit war nach Infektion von Zellen mit Viren beider Biotypen (NCP7 und CP7) eine Herunterregulierung der Spaltungseffizienz, ausgehend von anfangs praktisch vollständiger Prozessierung, zu beobachten: bei NCP7 in Richtung 0%, bei CP7 in Richtung 67%. Dies bestätigte und verfeinerte die bereits beschriebenen, über Western Blot Analyse erhaltenen Daten. Die Biotyp-spezifische Regulierung der Aktivität der NS2-Protease und damit der Synthese von NS3 erfolgt insbesondere in einem Zeitfenster zwischen sechs und neun Stunden nach Infektion der Zellen.

In CP7-infizierten Zellen fiel auch die ständige Zunahme der viralen Proteinsynthese mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Infektion auf. Diese Zunahme fiel bei den NCP7-infizierten Zellen deutlich schwächer aus.

Um auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten NS2-3-Prozessierung in noncp BVDV-infizierten Zellen um eine BVDV-stammspezifische oder zelltyp-spezifische Eigenschaft handelt, wurden die Versuche auch mit einem anderen noncp BVDV-Stamm (NCP1) und mit

Ergebnisse

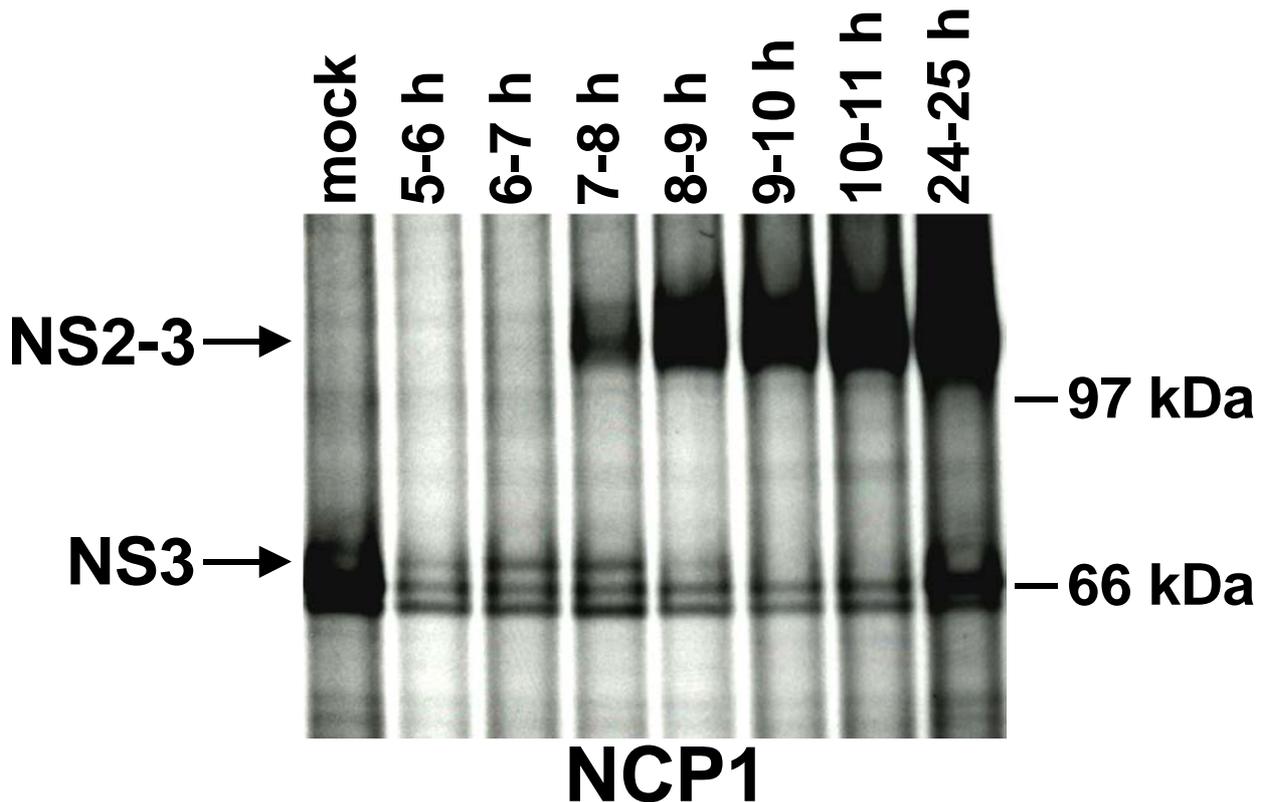


Abbildung B14: RIP-Analyse von MDBK-Zellen nach der Infektion mit BVDV NCP1

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (MOI = 10) jeweils für die Dauer einer Stunde metabolisch mit ^{35}S -Methionin und Cystein markiert, die Lysate mit einem NS3-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Auch in NCP1 infizierten Zellen entsteht zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion NS3, was eine stammspezifische Regulierung der NS2-Protease Aktivität nur bei NCP7 ausschliesst.

anderen Wirtszellen (PT-Zellen, Daten nicht gezeigt) wiederholt. Hierbei ergaben sich die gleichen Beobachtungen, was eine generelle Gültigkeit der Ergebnisse unterstützt. Abbildung B14 zeigt die Verhältnisse in BVDV NCP1 - infizierten MDBK-Zellen. Auch hier wird zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion (5-7 h p.i.) nur freies NS3 gebildet. Die Aktivität der NS2-Protease geht dann im Zeitraum zwischen 6 und 9 Stunden p.i. dramatisch zurück, sodass nach der neunten Stunde p.i. nur noch ungespaltenes NS2-3 nachweisbar ist.

6.1.8 In BVDV-infizierten Zellen korreliert die Effizienz der viralen RNA-Synthese mit der Menge an NS3

Welche Bedeutung haben die unterschiedlichen, Biotyp-spezifischen NS2-3-Prozessierungsmuster? Bekannt war, dass die virale RNA-Synthese abhängig von NS3, jedoch unabhängig von NS2 und NS2-3 ist (Behrens et al., 1998). Den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit zufolge kann ungespaltenes NS2-3 hierbei freies NS3 im viralen RNA-Replikationskomplex nicht ersetzen; die virale RNA-Replikation ist also zwingend abhängig von der Generierung des NS3. Während nach Ergebnissen dieser Arbeit in CP7-infizierten Zellen NS3 zu allen untersuchten Zeitpunkten p.i. gebildet wird, exprimieren NCP7-infizierte Zellen nachweisbare Mengen dieses Proteins nur zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion. Somit könnte es in noncp BVDV-infizierten Zellen zu späten Zeitpunkten nach Infektion zu einer Abnahme der viralen RNA-Synthese kommen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Menge der synthetisierten viralen RNA in infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion quantitativ bestimmt. Hierzu wurden MDBK-Zellen mit NCP7 oder CP7 infiziert (MOI=10) und in verschiedenen Perioden nach der Infektion mit ³²P-Orthophosphat jeweils für die Dauer von vier Stunden metabolisch markiert. Die Synthese zellulärer RNA wurde 30 Minuten vor und während dieser Markierung durch Zugabe von Dactinomycin inhibiert, sodass in den untersuchten Zeiträumen praktisch nur noch virale RNA synthetisiert werden konnte. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zell-Lysaten isoliert und auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Ein radioaktives in-vitro-Transkript diente als Größenmarker für das virale Genom. Das Gel wurde auf Nitrocellulose-Membran getrocknet und über Autoradiographie ausgewertet (Abb. B15). Die Mengen der gebildeten viralen RNA wurden über eine Phosphorimager-Analyse quantifiziert (Abb. B16).

Im Zeitraum zwischen 7 und 11 Stunden nach der BVDV Infektion wurden

Ergebnisse

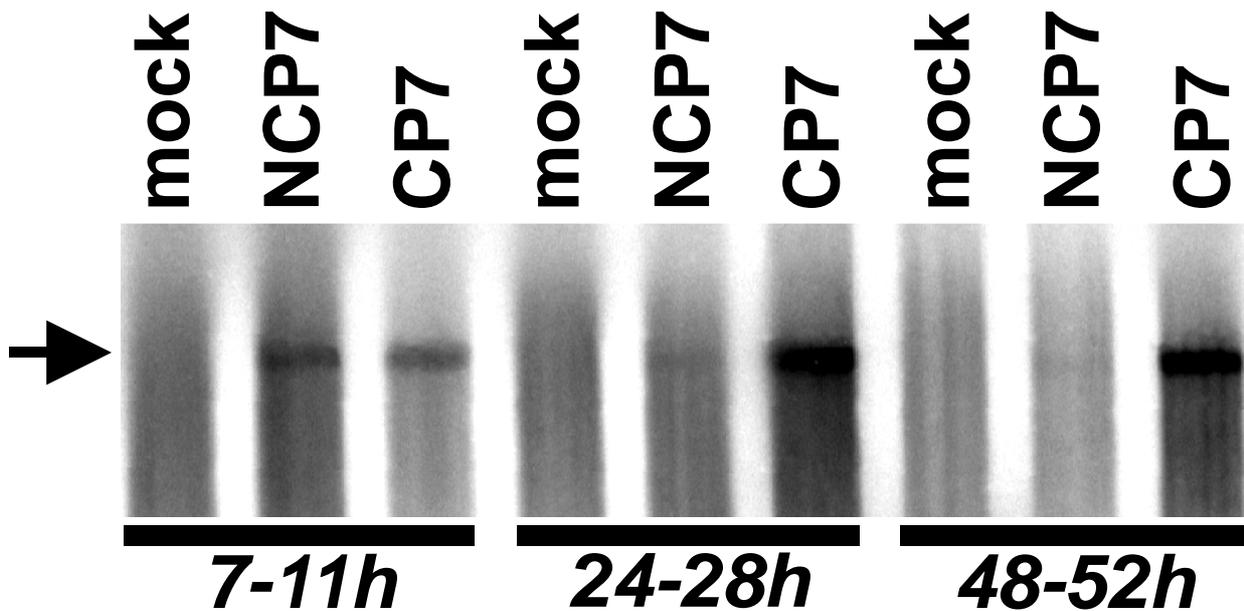


Abbildung B15: Synthese viraler RNA zu verschiedenen Zeiten nach Infektion von MDBK-Zellen

Die synthetisierte virale RNA in den unter der Abbildung angegebenen Zeiträumen nach der Infektion wurde durch metabolische Markierung mit ^{32}P -Orthophosphat sichtbar gemacht. Zelluläre RNA-Synthese wurde durch Dactinomycin inhibiert. Für jeden Zeitraum wurden nicht infizierte (mock), sowie NCP7 oder CP7 infizierte MDBK-Zellen untersucht. Der Pfeil markiert die Position eines viralen Genoms, ermittelt über den parallelen Auftrag eines radioaktiven genomischen Transskriptes auf dem denaturierenden RNA-Gel.

für NCP7 und CP7 ähnliche RNA-Syntheseraten beobachtet. Dieser Zustand änderte sich dramatisch zu den späteren Zeitpunkten p.i.; zwischen 24 und 28 Stunden nach der Infektion konnte in NCP7-infizierten Zellen nur noch sehr wenig und zwischen 48 und 52 Stunden p.i. fast keine neu gebildete virale RNA mehr nachgewiesen werden. Dagegen war bei den CP7-infizierten Zellen eine starke Zunahme der Neusynthese zu beobachten; sofern man in die Betrachtung eine infolge des CPE eingetretene Reduktion der Zellzahl auf weniger als die Hälfte beim spätesten untersuchten Zeitpunkt einbezieht, fällt die Zunahme der Synthese in CP7-infizierten Zellen noch dramatischer aus, als es aus den Abbildungen B15 und B16 ersichtlich ist. Ausgehend von etwa gleichen RNA-Synthese-Mengen kurz nach der Infektion der Zellen reduzieren noncp BVD-Viren die RNA-Replikation zu späten Zeitpunkten enorm, während die cp BVD-Viren die Syntheseraten immer weiter steigern.

Ergebnisse

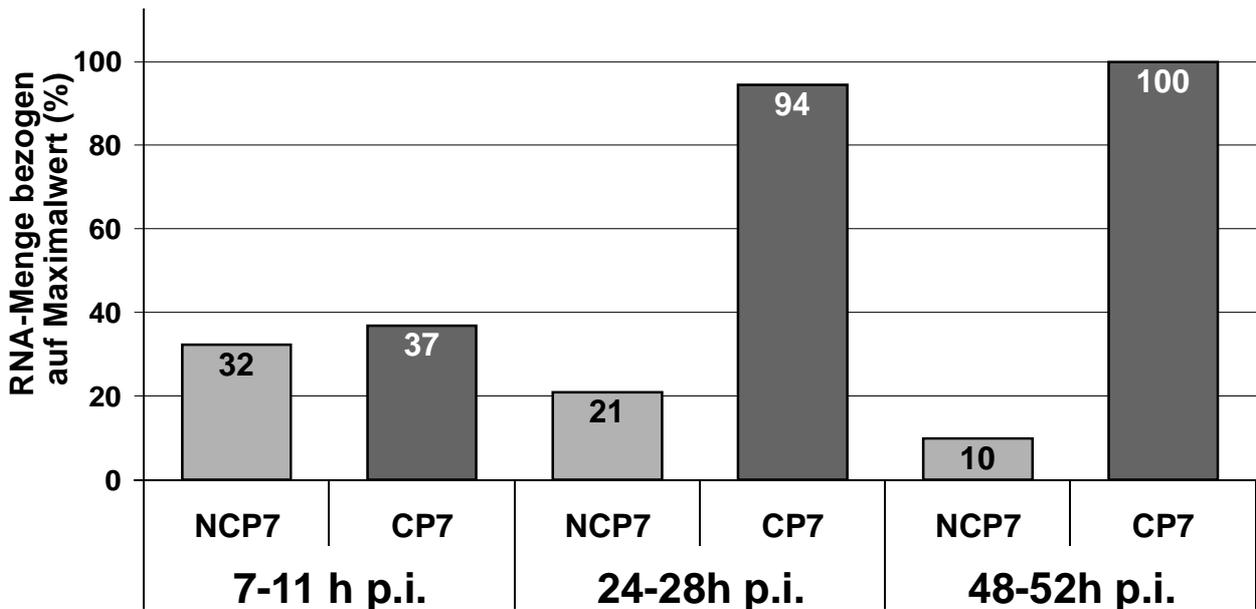


Abbildung B16: Synthese viraler RNA zu verschiedenen Zeiten nach Infektion von MDBK-Zellen

Die Menge der synthetisierten viralen RNA wurde durch Messung des radioaktiven Signals der metabolisch markierten RNA aus Abbildung B17 quantifiziert (Phosphorimager). Zu frühen Zeitpunkten nach Infektion (7-11 h p.i.) entstehen vergleichbare Mengen an viraler RNA in NCP7 und CP7 infizierten Zellen. 24-28 h p.i. hat sich die Synthese-Rate in CP7 infizierten Zellen fast verdreifacht, fällt in NCP7 infizierten Zellen dagegen deutlich ab. Man beachte, dass durch den fortgeschrittenen CPE 48 h p.i. in CP7 infizierten Zellen mehr als die Hälfte der Zellen abgestorben sind; die RNA Synthese-Rate pro Zelle hat sich in den verbleibenden Zellen daher nochmals deutlich erhöht.

Diese Biotyp-spezifischen Veränderungen in den RNA-Syntheseraten korrelieren damit hervorragend mit der Biotyp-spezifischen Dynamik der NS3-Akkumulation (vergleiche Abb. B15 mit Abb. B12). Damit war die vermutete Beziehung zwischen Protease-Aktivität und NS3 Synthese auf der einen und Syntheseeffizienz der viralen RNA auf der anderen Seite gezeigt. Diese Beobachtungen passen auch zu dem bereits bekannten Phänomen, dass zytopathogene BVD-Viren, die alle große Mengen freies NS3 in der Zelle exprimieren, auch stets durch deutlich erhöhte intrazelluläre virale RNA Mengen aufgefallen sind (Becher et al., 2001; Mendez et al., 1998; Vassilev and Donis, 2000). Diese Korrelation konnte auch für das Viruspaar NCP7 / CP7 mittels Northern Blot Analyse bestätigt werden (A. Müller, Institut für Virologie, JLU Gießen, persönliche Mitteilung).

6.2 Untersuchungen zur Funktionsweise von Jiv

Nachdem gezeigt war, dass NS2 die Funktion einer essentiellen viralen Protease hat, die auch von noncp BVDV-Stämmen zur Replikation benötigt wird, war das nächste Ziel, die Rolle des zellulären Proteins Jiv bei der Prozessierung von NS2-3 aufzuklären. Es wurde in der Einleitung bereits darauf eingegangen, dass authentisches zelluläres Jiv und die Jiv90 Domäne, das kleinste Jiv-Fragment das in cp BVDV-Stämmen mit Jiv-Insertionen bislang gefunden wurde, in der Lage sind, stabil mit NS2 zu interagieren, die Spaltung von NS2-3 auch in trans zu induzieren und darüber letztendlich auch den Biotyp von BVDV zu verändern (Rinck et al., 2001). Aus den bereits genannten Gründen (geringe Größe von Jiv90, keine Protease-typischen Sequenzmotive, stabile Interaktion mit NS2) wird davon ausgegangen, dass Jiv nicht selbst die Funktion einer Protease übernimmt, sondern die in dieser Arbeit erstmals identifizierte NS2-Protease zur NS2-3-Spaltung aktiviert.

6.2.1 Zur Induktion der NS2-3-Spaltung werden stöchiometrische Mengen von Jiv benötigt

Sofern es sich bei Jiv tatsächlich um einen Kofaktor der NS2-Protease und nicht um ein Enzym handelt, ist zu erwarten, dass stöchiometrische (i. A. hohe) und nicht enzymatische (i. A. geringe) Mengen des Proteins zur effizienten NS2-3-Spaltung notwendig sind.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden unterschiedliche Mengen von Jiv90 als GST-Fusionsprotein (GST-Jiv90) zusammen mit einem Teil des Polyproteins (NS2-NS4A) eines noncp BVDV in BHK-Zellen transient exprimiert. Als Basis diente hierbei der Stamm BVDV CP7 i-, der sich vom Stamm CP7 ableitet, bei dem die CP7-spezifische Insertion von 9 Aminosäuren im NS2 aber deletiert worden war; diese Deletion führt zum Verlust der autonomen NS2-3-Prozessierung im T7-Vacciniavirus-Expressionssystem. Durch Koexpression von Jiv90 kann die NS2-3-Spaltung

Ergebnisse

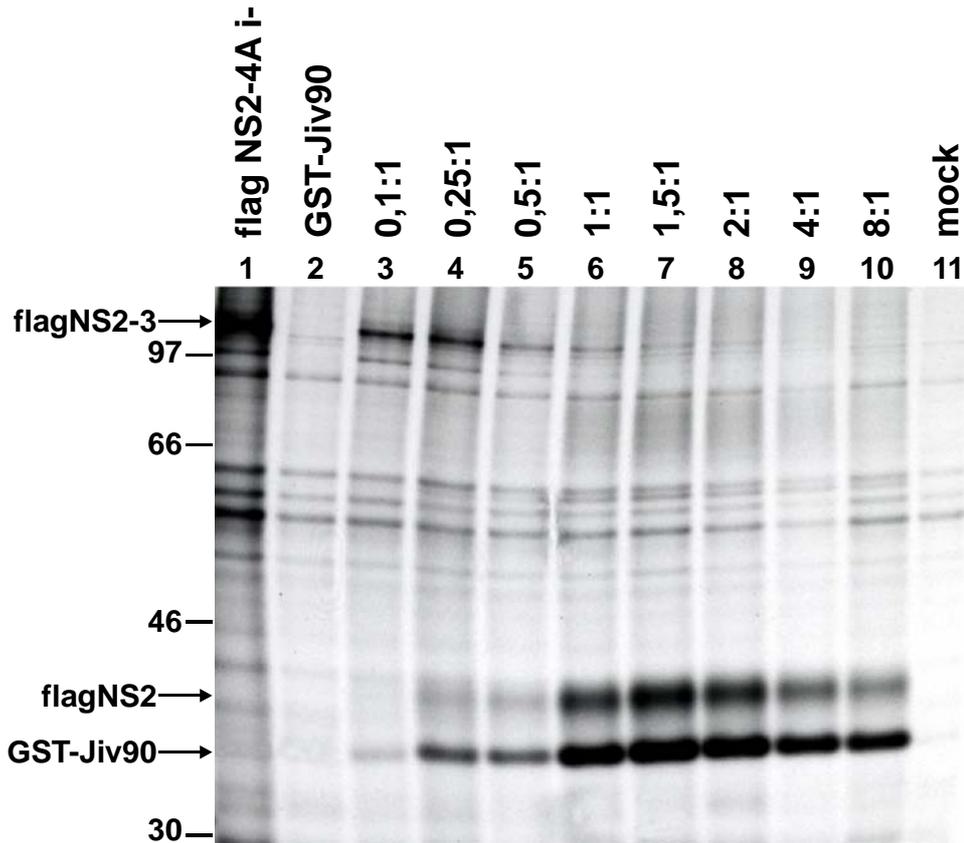


Abbildung B17: Einfluss der molaren Verhältnisse von NS2-3 und Jiv90 auf die Effizienz der NS2-3 Spaltung (RIP)

flagNS2-4A i- wurde alleine (Spur 1) oder zusammen mit GST-Jiv90 in unterschiedlichen Verhältnissen (Spuren 3 bis 10) in BHK Zellen exprimiert, metabolisch markiert und mit einem Antikörper gegen das flag-Epitop immunpräzipitiert. Die Auswertung erfolgte über SDS-PAGE und Autoradiographie. Die molaren Verhältnisse der Plasmide pGST-Jiv90 : pflagNS2-4A i- im Transfektionsansatz sind über den Spuren 3 bis 10 angegeben. Insgesamt wurden je Transfektion stets 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

jedoch wieder induziert werden (Rinck et al., 2001). Um die Immunpräzipitation von NS2 bzw. NS2-3 zu ermöglichen, trug das Polyproteinfragment am N-Terminus ein flag-Epitop (flagNS2-4A i-). Unter Berücksichtigung des jeweiligen Molekulargewichtes der beiden Plasmide wurden die molaren Konzentrationen der eingesetzten Plasmidlösungen berechnet. Die Plasmide konnten im Rahmen einer Doppeltransfektion daraufhin in unterschiedlichen molaren Verhältnissen eingesetzt werden; dabei blieb die Gesamtmenge transfizierter Plasmide je Ansatz konstant bei 3 µg. Nach Transfektion und metabolischer Proteinmarkierung wurden die Zell-Lysate mit einem monoklonalen Antikörper gegen das flag-Epitop

Ergebnisse

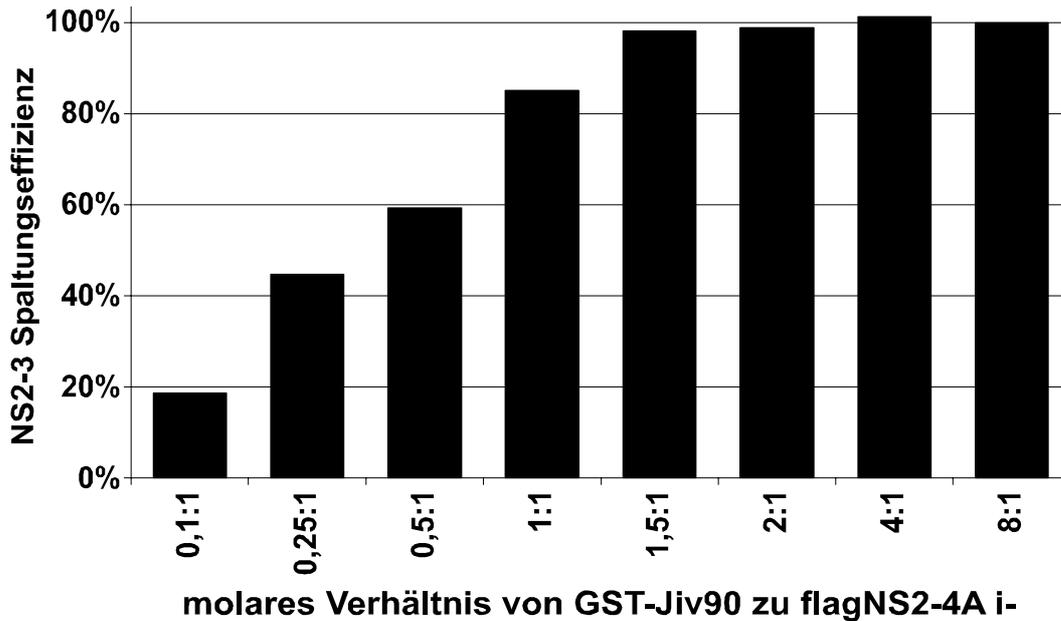


Abbildung B18: Einfluss der molaren Verhältnisse von NS2-3 und Jiv90 auf die Effizienz der NS2-3 Spaltung (Phosphorimager Analyse)

Die NS2-3 Spaltungseffizienz wurde durch die quantitative Analyse des Gels aus Abbildung B17 am Phosphorimager bestimmt; hierzu wurde der Quotient $NS2/(NS2 + NS2-3)$ errechnet. Der erhaltene Wert bei größtem Jiv-Überschuss (8:1) wurde als 100% definiert. Geringe Mengen Jiv führten nur zu einer unvollständigen Spaltung von NS2-3. Bei einem molaren Verhältnis von Jiv und NS2 von 1:1 erreichte die Spaltungseffizienz über 80%, eine Sättigung trat ab einem Verhältnis von 1,5:1 ein.

immunpräzipitiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert (Abb. B17). flagNS2 zeigte die durch GST-Jiv90 induzierte Spaltung von flagNS2-3 an. Die Signale von flagNS2-3 und flagNS2 wurden mittels Phosphorimager analysiert und die Spaltungseffizienz ($flagNS2 / (flagNS2 + flagNS2-3)$) berechnet (Abb. B18).

Durch geringe Mengen GST-Jiv90 konnte nur eine geringe Prozessierungseffizienz von flagNS2-3 erreicht werden (Spur 3 in Abb. B17); mit steigenden GST-Jiv90 Mengen nahmen die Mengen an flagNS2-3 ab und die des Spaltprodukts flagNS2 kontinuierlich zu (Spuren 4 bis 7 in Abb. B17), folglich stieg die Effizienz der NS2-3-Prozessierung an (siehe auch quantitative Auswertung in Abb. B18). Ab einem 1,5fachen molaren Überschuss von GST-Jiv90 wurde eine Sättigung der Spaltungseffizienz beobachtet (Spuren 8 bis 10 in Abb. B17 und Abb. B18).

6.2.2 75 Aminosäuren des Jiv-Proteins sind ausreichend zur Induktion der NS2-3-Spaltung und 20 Aminosäuren genügen zur Interaktion mit pestiviralem NS2

Um genauere Einsichten in den molekularen Mechanismus der Wirkungsweise von Jiv90 zu erhalten, sollte im Weiteren untersucht werden, welcher Teil von Jiv zur Induktion der NS2-3-Prozessierung und zur Interaktion mit NS2 tatsächlich benötigt wird. Hierzu wurden verschiedene N- und C-terminale Verkürzungsstufen von Jiv90 als Fusion an GST hergestellt. Der N-terminale Teil des Jiv90 enthält zudem ein Aminosäuresequenz-Motiv aus vier Cysteinen, typisch für eine Zinkfinger-Struktur, dessen Bedeutung für Interaktion und Spaltungsinduktion unbekannt war; daher wurden in die Analyse auch Mutanten dieser putativ Zink-bindenden Struktur mit einbezogen (GST-Jiv90 C2A, C2S, C24A, C24S). Eine Übersicht der verwendeten Konstrukte gibt Abbildung B19.

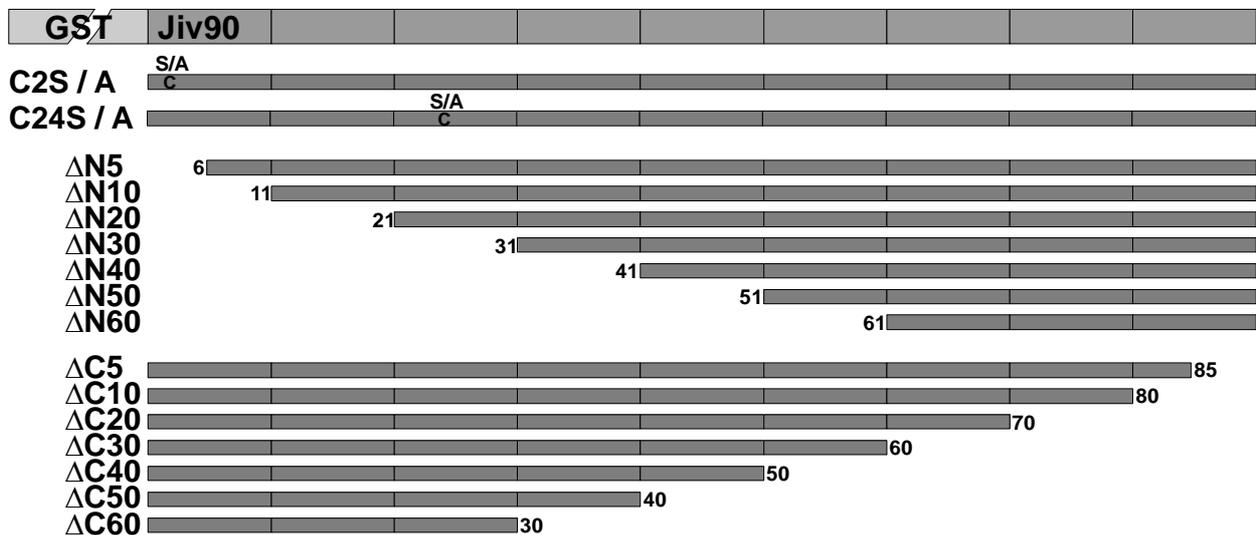


Abbildung B19: Schema der Expressions-Konstrukte zur Bestimmung des für die NS2-3 Spaltungsinduktion und NS2/NS2-3 Bindung minimalen Jiv-Fragmentes

Zur Eingrenzung der zur NS2(-3) Bindung und Spaltungsinduktion benötigten Jiv90-Sequenzen wurden Mutanten und Verkürzungen von Jiv90 als Fusionen an GST hergestellt. Die eingesetzten Konstrukte sind in der Abbildung schematisch dargestellt. Es wurden Mutationen der Cysteine an Position 2 und 24 eingeführt, um die Rolle der putativ Zink-bindenden Struktur bei Spaltungsinduktion und Bindung zu untersuchen (C2S, C2A, C24S und C24A). Das Jiv90-Protein wurde außerdem N- und C-terminal jeweils um 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Aminosäuren verkürzt.

Ergebnisse

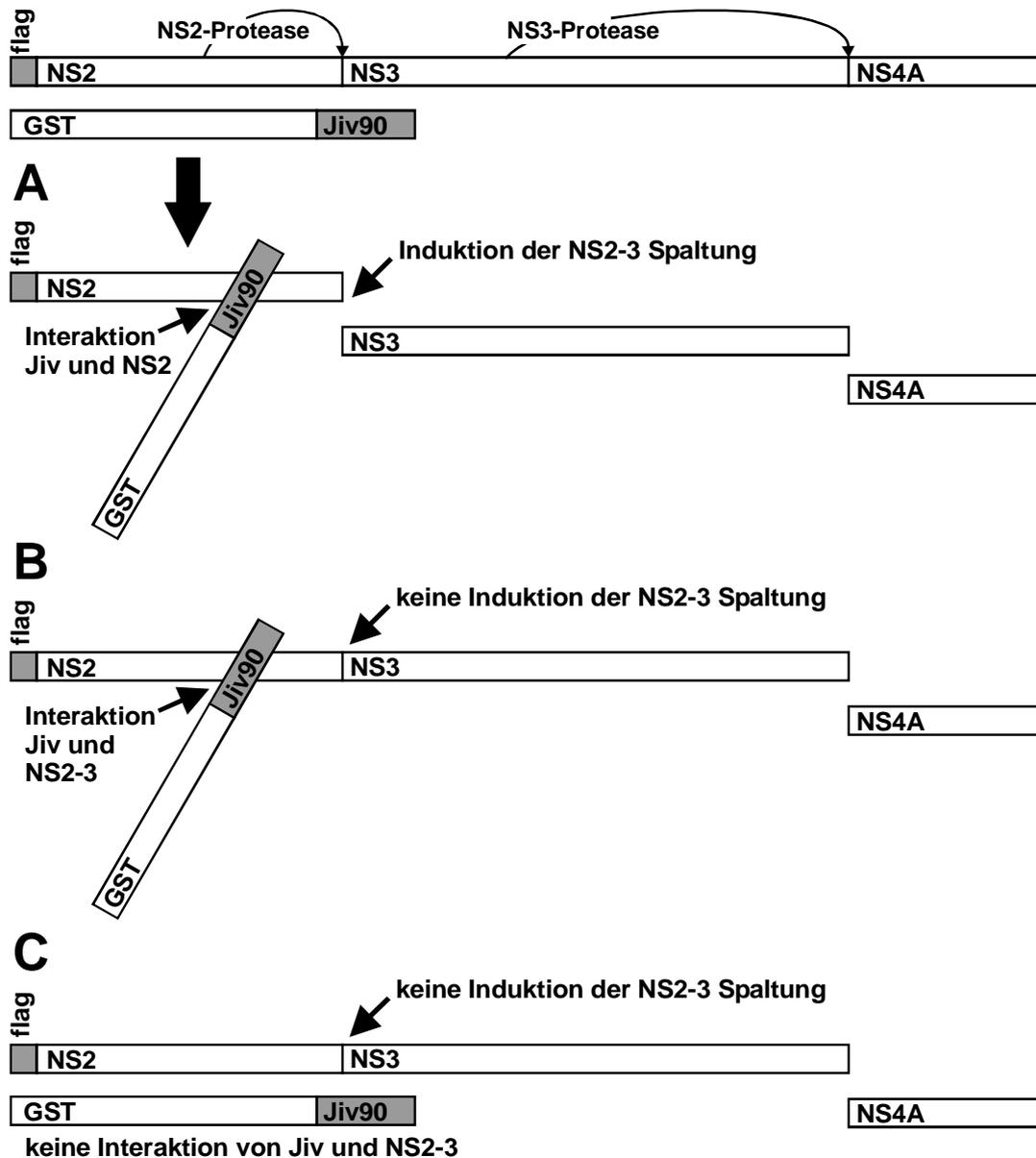


Abbildung B20: Schema des Versuchsaufbaus zur Bestimmung des für die NS2-3 Spaltungsinduktion und NS2(-3)-Bindung minimalen Jiv-Fragmentes

GST-Jiv90 bzw. seine Derivate werden mit flagNS2-4A in BHK-Zellen koexprimiert. Durch Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen das flag-Epitop kann flagNS2 nachgewiesen werden, sofern NS2-3 Spaltung auftritt. Außerdem kopräzipitiert GST-Jiv90, sofern es mit NS2 bzw. NS2-3 interagieren kann. Auf diese Weise können die Mutationen und Verkürzungsstufen von Jiv90 auf ihre Fähigkeit zur Interaktion und Spaltungsinduktion untersucht werden. Die Abbildung zeigt die drei Möglichkeiten des Versuchsausgangs: (A) Jiv interagiert mit NS2-3 und induziert dessen Spaltung. (B) Jiv interagiert mit NS2-3, kann aber die Spaltung nicht induzieren. (C) Jiv kann nicht mit NS2-3 interagieren.

Ergebnisse

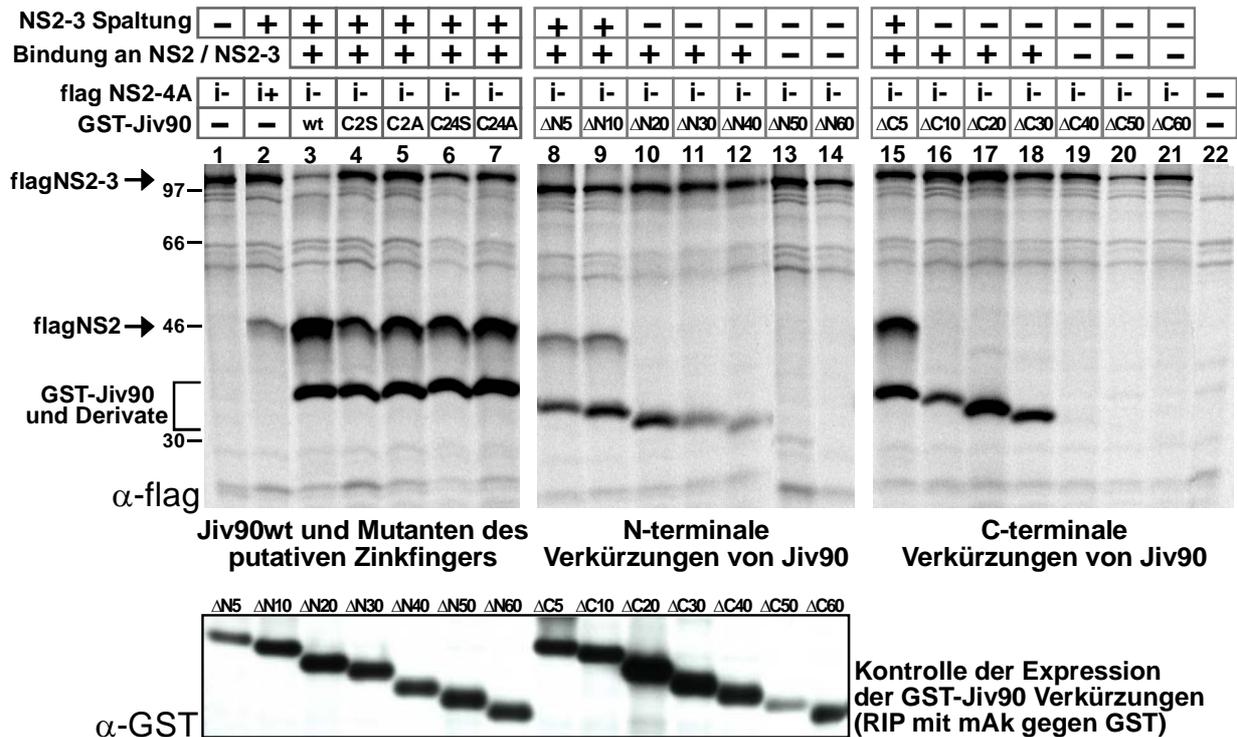


Abbildung B21: Bestimmung des für NS2-3 Spaltungsinduktion und NS2(-3)-Bindung minimalen Jiv-Fragmentes (RIP)

Der Bereich von NS2 bis NS4A des Polyproteins von noncp BVDV (flagNS2-4A i-) wurde in BHK Zellen mit GSTJiv90, dessen Mutanten und Verkürzungen koexprimiert, metabolisch markiert und unter nativen Bedingungen immunpräzipitiert; hierzu wurde ein vor dem N-Terminus von NS2 angebrachtes flag-Epitop zur Präzipitation der Prozessierungsprodukte flagNS2-3 und flagNS2 (Pfeile links) mittels eines monoklonalen Antikörpers verwendet (oben). In einem Kontrollexperiment wurden die gleichen Zelllysate mit einem Antikörper gegen GST präzipitiert, um die Expression der GST-Jiv90 Verkürzungsstufen sicherzustellen (unten).

Das Auftreten von flagNS2 zeigt NS2-3 Spaltung an, das Auftreten der GST-Jiv Proteine ist Folge von Kopräzipitation dieser Proteine mit NS2. Folglich gilt: (1) Wenn flagNS2 zu beobachten ist, induziert das verwendete Jiv-Konstrukt eine Spaltung von NS2-3; (2) wenn GST-Jiv auftritt, ist es in der Lage mit NS2 bzw. NS2-3 zu interagieren.

Jiv90, dessen Zinkfinger-Mutanten und Verkürzungsstufen um jeweils 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Aminosäuren wurden als GST-Fusion in BHK-Zellen transient zusammen mit einem NS2 bis NS4A umfassenden Polyproteinfragment eines noncp BVDV exprimiert; hierzu wurde erneut ein Fragment aus BVDV CP7 i- verwendet. Zur Immunpräzipitation trug dieses Polyproteinfragment am N-Terminus ein flag-Epitop (flagNS2-4A i-). Durch Radioimmunpräzipitation unter nativen Bedingungen konnten in einem Versuchsansatz sowohl die Einflüsse der Jiv-Verkürzungen und Mutationen auf die NS2-3-Spaltungsinduktion als auch auf die Interaktion mit NS2 bzw.

Ergebnisse

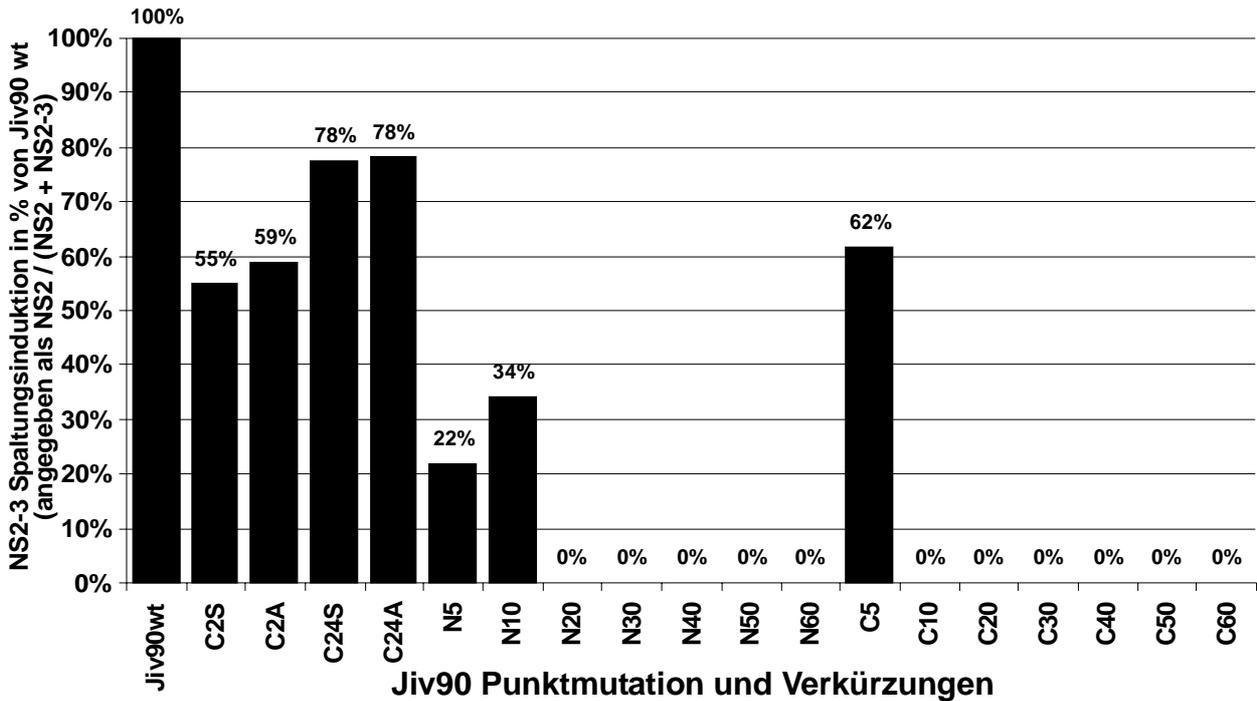


Abbildung B22: Quantitative Auswertung der NS2-3 Spaltungsinduktion durch Jiv90-Punktmutanten und -Verkürzungen

Die Signale für flagNS2 und flagNS2-3 wurden am Phosphorimager quantifiziert und die Quotienten $NS2 / (NS2 + NS2-3)$ berechnet. Der Wert für Jiv90 wt wurde als 100 % definiert. Man beachte, dass alle Veränderungen an Jiv90 zur Verringerung der Spaltungseffizienz führen.

C2S und C2A: Mutation des Cysteins an Position 2 (beteiligt am putativen Zinkfinger) von Jiv90 zu Serin bzw. Alanin

C24S und C24A: Mutation des Cysteins an Position 24 (beteiligt am putativen Zinkfinger) von Jiv90 zu Serin bzw. Alanin

N5 bis N60: Verkürzungsstufen des Jiv90 von N-terminal um 5 bis zu 60 Aminosäuren

C5 bis C60: Verkürzungsstufen des Jiv90 von C-terminal um 5 bis zu 60 Aminosäuren

NS2-3 beurteilt werden: Das Auftreten von freiem flagNS2 diene hierbei als Indikator für die Induktion der NS2-3-Prozessierung und die Kopräzipitation von GST-Jiv-Fusionsproteinen zeigte deren Interaktion mit flagNS2 bzw. flagNS2-3 an (Abb. B20 und B21). Die Effizienz der Spaltungsinduktion wurde über die Phosphorimager-Analyse quantifiziert (Abb. B22).

Alle Mutationen im putativen Zinkfinger des Jiv90 erlaubten sowohl die Induktion der NS2-3-Spaltung als auch die Interaktion mit NS2 (Abb. B21, Spuren 4 bis 7). Allerdings hatten diese Austausche der Cysteine einen negativen Einfluss auf die Spaltungs-Effizienz, was sich anhand der deutlich größeren Mengen an ungespaltenem flagNS2-3 im Vergleich zum GST-Jiv90

Ergebnisse

wt zeigte (Spur 3).

N-terminale Verkürzungen von Jiv90 um fünf (Spur 8) oder zehn (Spur 9) Aminosäuren führten zu einer deutlich reduzierten Induktion der NS2-3-Spaltung. Hingegen konnte ein um 20 Aminosäuren verkürztes Protein (Spur 10) diese Prozessierung nicht mehr induzieren, obwohl noch eine Interaktion mit flagNS2-3 beobachtet werden konnte. Selbst bei weiterer Verkürzung um insgesamt N-terminal 30 oder 40 Aminosäuren (Spuren 11 und 12) blieb diese Interaktion bestehen, bei Verkürzung um 50 Aminosäuren (Spur 13) war sie nur noch extrem schwach, nach Deletion der N-terminalen 60 Aminosäuren (Spur 14) konnte sie nicht mehr nachgewiesen werden.

C-terminal konnten fünf (Spur 15), aber keine zehn Aminosäuren (Spur 16) deletiert werden, um noch eine Spaltungsinduktion zu erreichen. Die Interaktionen mit flagNS2-3 erfolgte aber auch noch bei C-terminalen Verkürzungen um 20 bzw. 30 Aminosäuren (Spuren 17 und 18). Das Entfernen von 40 oder mehr Aminosäuren vom C-Terminus des Jiv90 führte hingegen zum Ausbleiben der Wechselwirkung mit flagNS2-3 (Spuren 19 bis 21).

Zusammenfassend gilt, dass jede der vorgenommenen Veränderungen an Jiv90 negative Auswirkungen auf die Effizienz der NS2-3-Spaltungsinduktion hat. Eine Prozessierung kann aber auch noch durch ein N-terminal um zehn oder C-terminal um fünf Aminosäuren verkürztes Jiv90 induziert werden (entspricht den Aminosäuren 11 bis 90 bzw. 1 bis 85 von Jiv90). Für die Interaktion mit NS2 bzw. NS2-3 sind dagegen nur 20, etwa zentral in Jiv90 gelegene Aminosäuren essentiell (entspricht den Aminosäuren 41 bis 60 von Jiv90). In späteren Analysen dieser Arbeit wird gezeigt werden, dass auch diese 20 Aminosäuren alleine in der Lage sind, an pestivirales NS2 zu binden (Abb. B28).

6.2.3 Jiv hat zwei Bindungsstellen im BVDV NS2

Nachdem nun bekannt war, dass 20 Aminosäuren des Jiv90 genügen, um eine Interaktion mit BVDV NS2 einzugehen, war zu klären, mit welchem Teil dieses Proteins sie interagieren. Um festzustellen, wo im pestiviralen NS2 die Bindungsstelle für Jiv90 bzw. das 20 Aminosäuren lange Peptid aus Jiv90 liegt, wurde BVDV NS2 in 5 Fragmente, im weiteren als A, B, C, D und E bezeichnet, unterteilt. Die Grenze zwischen den Fragmenten D und E wurde zwischen den Aminosäuren 1531 und 1532 gezogen, da in diesem Bereich häufig Jiv-Insertionen in cp BVD-Viren gefunden wurden. Der restliche Teil des Proteins wurde in vier etwa gleich große Abschnitte unterteilt, die jeweils etwa 100 Aminosäuren des NS2 umfassen. Die einzelnen NS2 Fragmente wurden als GST-Fusionen exprimiert und auf eine Interaktion mit Jiv90 untersucht (Abb. B23 und B24). Hierzu wurde der C-terminale Teil des zellulären Jiv-Proteins, beginnend mit der Jiv90-Domäne und endend mit dem authentischen C-Terminus von Jiv, gefolgt von einem flag-Epitop, verwendet (Jiv90-C-flag). Dieses Protein wurde zusammen mit den NS2 Fragmenten in transfizierten Zellen über das T7-Vacciniavirus-System

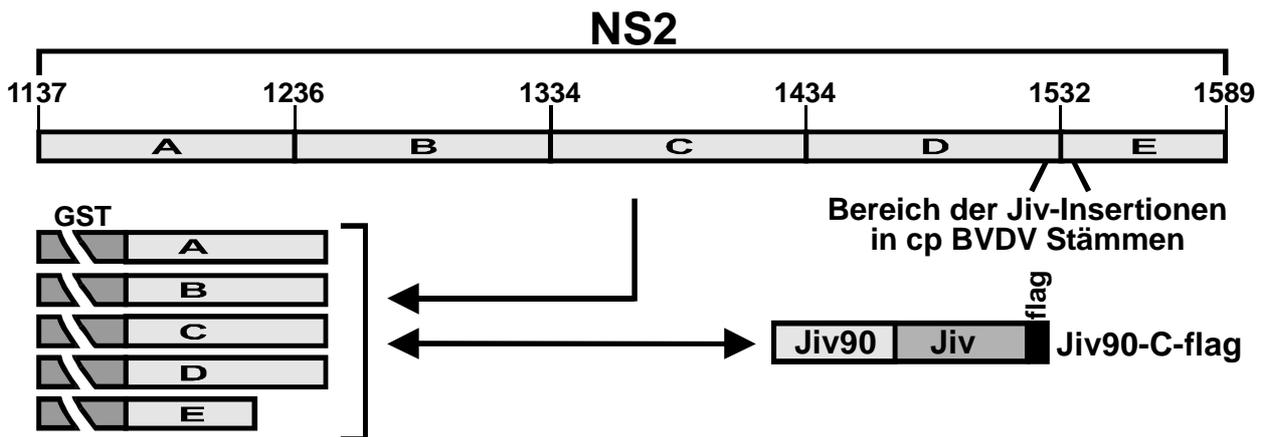


Abbildung B23: Expressionskonstrukte zur Bestimmung der Bindungsstelle(n) für Jiv in BVDV NS2

NS2 wurde in die fünf Fragmente A, B, C, D und E unterteilt (die Zahlen geben die Nummer der ersten Aminosäure jedes Fragmentes an), die separat als GST-Fusionen zusammen mit Jiv90-C-flag (rechts) in BHK Zellen exprimiert wurden. Sofern Jiv90-C-flag mit einem der Fragmente interagiert, kann diese Wechselwirkung über Radiokoimmunpräzipitation (RIP) nachgewiesen werden.

Ergebnisse

exprimiert, metabolisch markiert und anschließend unter nativen Bedingungen entweder mit einem monoklonalen Antikörper gegen GST oder gegen das flag-Epitop immunpräzipitiert. Von einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen ist immer dann auszugehen, wenn mit dem GST-spezifischem Antikörper auch Jiv-C-flag und mit einem flag-spezifischem Antikörper auch das entsprechende GST-NS2-Fragment präzipitiert werden kann.

Jiv-C-flag erwies sich als unfähig zur Interaktion mit den NS2 Fragmenten A, B und C (Spuren 3 bis 8 in Abb. B24). Interessanterweise konnte jedoch sowohl das Fragment D als auch das Fragment E mit Jiv90-C-flag

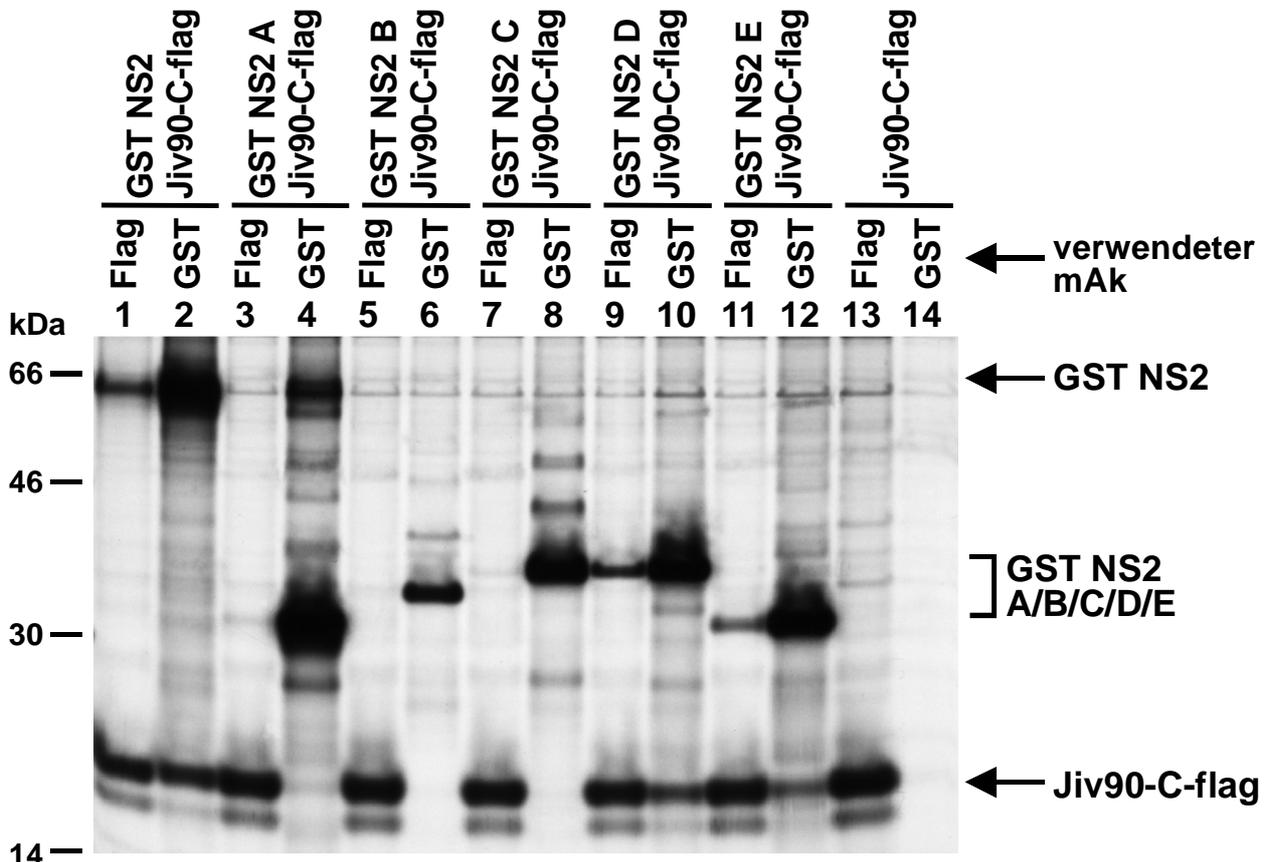


Abbildung B24: Bestimmung der Bindungsstelle(n) für Jiv in BVDV NS2 (RIP)

GST-NS2 und dessen Fragmente A bis E wurden jeweils zusammen mit Jiv90-C-flag in BHK Zellen exprimiert, metabolisch markiert und nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen das flag-Epitop oder gegen GST über SDS-PAGE und Autoradiographie auf Interaktion untersucht. GST-NS2 kann Jiv90-C-flag kopräzipitieren und umgekehrt (Spuren 1 und 2). Dazu nicht in der Lage sind die NS2 Fragmente A, B und C (Spuren 3 bis 8). Die NS2-Fragmente D und E können hingegen unabhängig voneinander eine Interaktion mit Jiv90-C-flag eingehen (Spuren 9 bis 12). Dies wird dadurch deutlich, dass sowohl GST-NS2 D als auch GST-NS2 E mit dem Jiv-Fragment kopräzipitiert und umgekehrt.

Ergebnisse

kopräzipitiert werden (Spuren 9 bis 12 in Abb. B24). Jiv besitzt also nicht nur eine, sondern zwei Bindungsstellen im C-terminalen Drittel von NS2.

Durch weitere Verkürzungen der NS2 Fragmente D und E konnten die beiden Bindungsstellen im NS2 über den gleichen Versuchsaufbau weiter eingegrenzt werden. Zunächst wurde hierbei die Bindungsstelle für Jiv innerhalb des Fragments D von BVDV NS2 bestimmt. Ein NS2-Fragment, das die Aminosäuren 1470 bis 1515 umfasste, war als GST-Fusion noch in der Lage, stabil mit Jiv90-C-flag zu interagieren (Spuren 9 und 10 in Abb. B25). Bei weiterer Verkürzung dieses Peptides von N-terminal (1490-1515) oder C-terminal (1470-1495) ging die Bindung an Jiv90-C-flag verloren (Spuren 11 und 12 bzw. 15 und 16 in Abb. B25). Somit konnte die erste

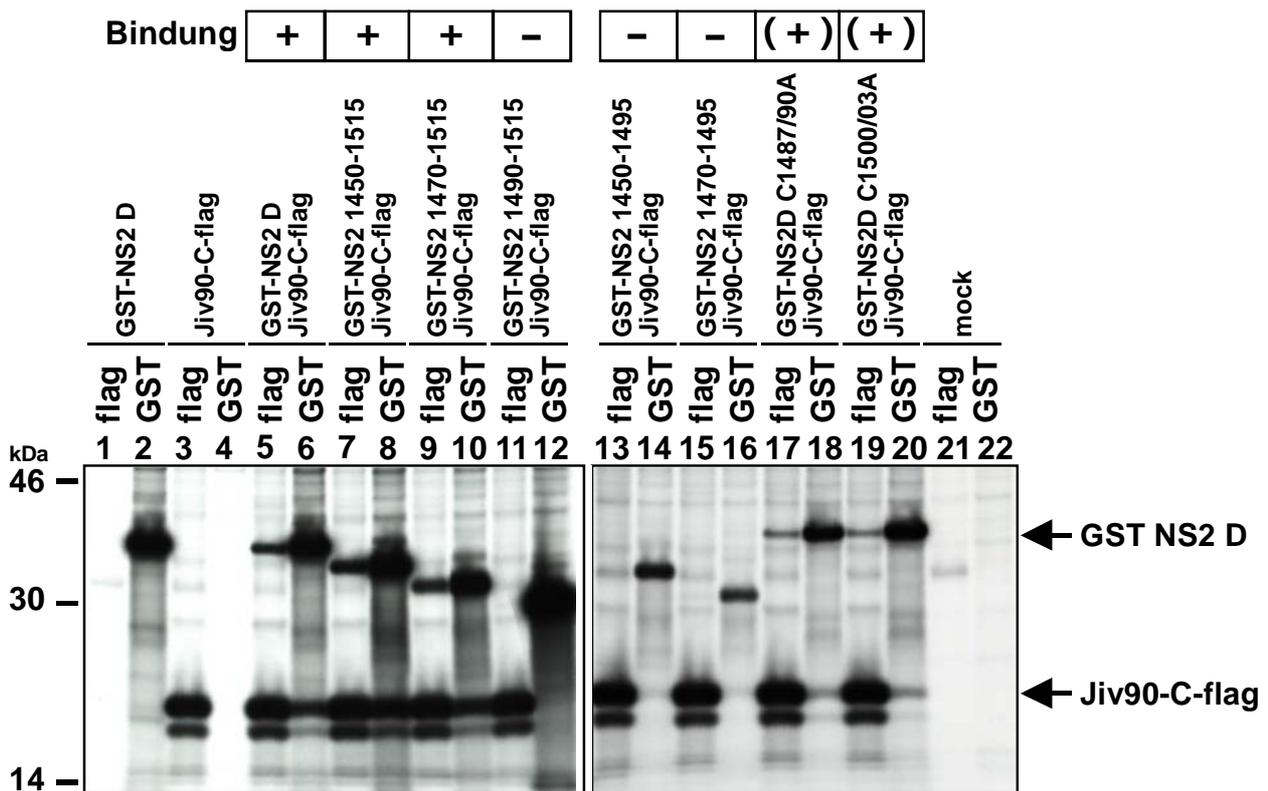


Abbildung B25: Bestimmung des minimalen Peptids aus NS2-Fragment D, das an Jiv binden kann (RIP)

GST-Fusionsproteine von NS2-Fragment D und dessen Verkürzungen wurden auf Bindung von Jiv90 C-flag getestet. Ein Peptid, das die Aminosäuren 1470 bis 1515 des NS2 enthält, kann mit Jiv noch stabil interagieren (Spuren 9 und 10); dies ist nicht mehr der Fall, wenn die NS2-kodierende Sequenz mit AS 1490 beginnt (Spuren 11 und 12) oder mit 1495 endet (Spuren 15 und 16). Doppelmutanten der am putativen Zinkfinger beteiligten Cysteine in NS2 D schwächen die Wechselwirkung mit Jiv ab, unterbinden sie jedoch nicht (Spuren 17 bis 20).

Ergebnisse

Bindungsstelle für Jiv im NS2 auf die Aminosäuren 1470-1515 eingegrenzt werden. Erstaunlicherweise ist der putative Zinkfinger (s.o.) des NS2 Teil dieser Sequenz. Er wird von den Aminosäuren C₁₄₈₇, C₁₄₉₀, C₁₅₀₀ und C₁₅₀₃ gebildet. Um zu untersuchen, ob das Zink-bindende Motiv einen Einfluss auf die Jiv-Bindung besitzt, wurden jeweils zwei Cysteine paarweise durch Alanin ersetzt (C1487/90A und C1500/03A). Im Kontext von GST-NS2 D reduzierten diese Substitutionen die Bindung an Jiv deutlich; doch die Interaktion blieb erhalten (Spuren 17 bis 20 in Abb. B25). Daher ist anzunehmen, dass die putativ Zink-bindende Struktur an der Jiv-Bindung beteiligt, aber hierfür nicht essentiell ist.

Zur Eingrenzung der Jiv-Bindungsstelle im NS2-Fragment E wurden ebenfalls Verkürzungen dieses Abschnittes von N- und C-terminal als GST-

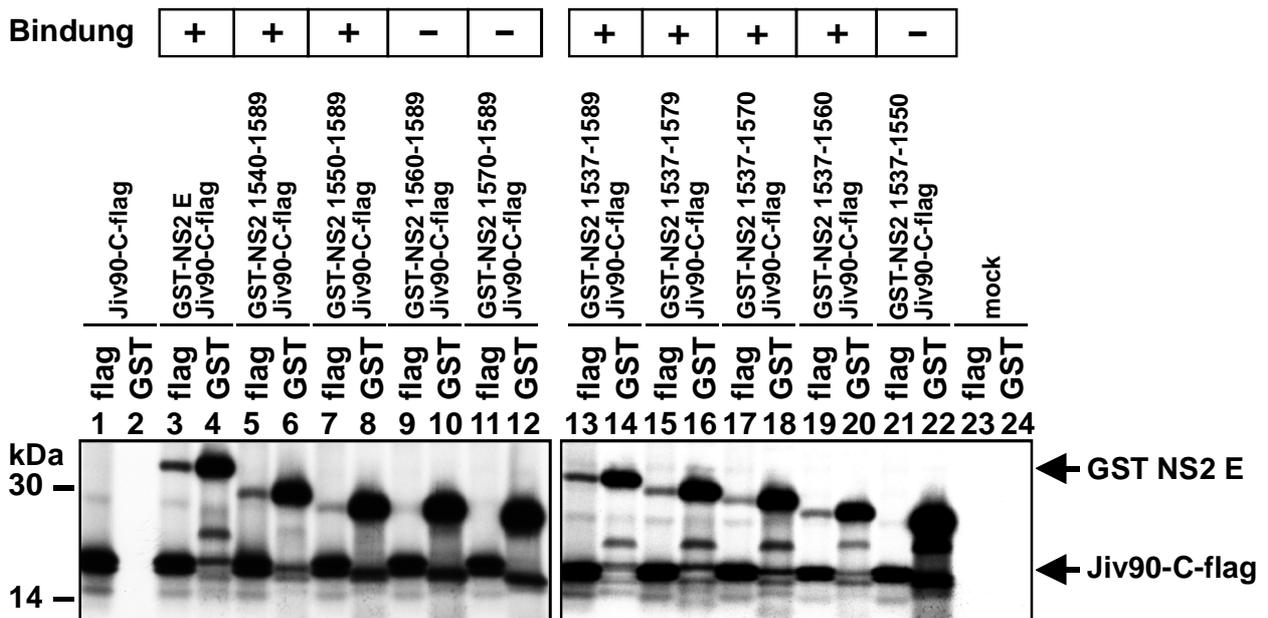


Abbildung B26: Bestimmung des minimalen Peptides aus NS2-Fragment E, das an Jiv binden kann (RIP)

GST-Fusionsproteine vom NS2-Fragment E (Spuren 3 und 4) und dessen Verkürzungen wurden auf Bindung von Jiv90-C-flag getestet. Man achte auf die Kopräzipitationen der GST-NS2 Fusionsproteine mit Jiv-C-flag unter Verwendung eines mAk gegen das flag-Epitop. Ein Protein, das die Aminosäuren 1540 bis 1589 des NS2 enthält, kann mit Jiv-C-flag stabil interagieren (Spuren 5 und 6). Gleiches gilt für ein Peptid mit den Aminosäuren 1537 bis 1560 (Spuren 19 und 20). Die Interaktion ist abgeschwächt, wenn die NS2-Sequenz mit Aminosäure 1550 beginnt (Spuren 7 und 8). Eine Bindung ist nicht mehr möglich, wenn die NS2-kodierende Sequenz mit AS 1560 startet (Spuren 9 und 10) oder wenn sie bereits mit AS 1550 endet (Spuren 21 und 22). Daraus ergibt sich der für die Jiv-Bindung entscheidende Bereich im NS2 Fragment E: Er liegt zwischen den Aminosäuren 1540 und 1560.

Ergebnisse

Fusion auf Interaktion mit Jiv-C-flag untersucht. Es zeigte sich, dass ein Protein, welches die Aminosäuren 1540-1589 oder 1537-1560 von NS2 enthält, noch mit Jiv-C-flag wechselwirken kann (Spuren 5, 6 bzw. 19 und 20 in Abb. B26). Die Bindung von Jiv-C-flag geht verloren oder ist deutlich abgeschwächt, wenn nur noch die Aminosäuren 1560-1589 (Spuren 9 und 10 in Abb. B26) oder 1537-1550 (Spuren 21 und 22 in Abb. E26) Teile des Proteins sind. Beginnt die NS2-Sequenz mit Aminosäure 1550 (Spuren 7 und 8 in Abb. B26), ist die Bindung an Jiv-C-flag bereits abgeschwächt. Damit ergibt sich der Bereich zwischen den Aminosäuren 1540 und 1560 als das für die Interaktion mit Jiv-C-flag entscheidende Peptid innerhalb des E-Fragmentes von NS2.

Diesen Ergebnissen zufolge liegt die erste Bindungsstelle für Jiv90 in BVDV NS2 zwischen den Aminosäuren 1470 und 1515, die zweite zwischen den Aminosäuren 1540 und 1560.

Da hiermit zwei unterschiedliche Interaktionsstellen für Jiv im NS2 vorlagen, war erneut zu untersuchen, welcher Teil von Jiv individuell an jede der beiden Bindungsstellen binden kann; bisher war dieses Experiment nur unter Verwendung des gesamten NS2 vollzogen worden (siehe Abb. B19).

6.2.4 Die identischen 20 Aminosäuren des Jiv90 interagieren mit beiden Bindungsstellen im BVDV NS2

Um das minimale Jiv-Fragment zu bestimmen, welches mit den einzelnen Bindungsstellen im NS2 interagieren kann, wurden die bereits beschriebenen Jiv90-Punktmutanten und -Verkürzungen verwendet. Diese wurden auf Kopräzipitation mit NS2 Fragmenten untersucht, die jeweils eine der beiden ermittelten Bindungsstellen enthielten. Für die mehr N-terminal im NS2 gelegene Bindungsstelle diente als Kopräzipitations-Partner ein Protein aus den NS2 Fragmenten C und D mit N-terminalem flag-Epitop (flag NS2 CD); für die C-terminale Bindungsstelle wurde eine MBP-Fusion des NS2-E Fragmentes verwendet, die N-terminal ein myc-Epitop trug (mycMBP NS2 E).

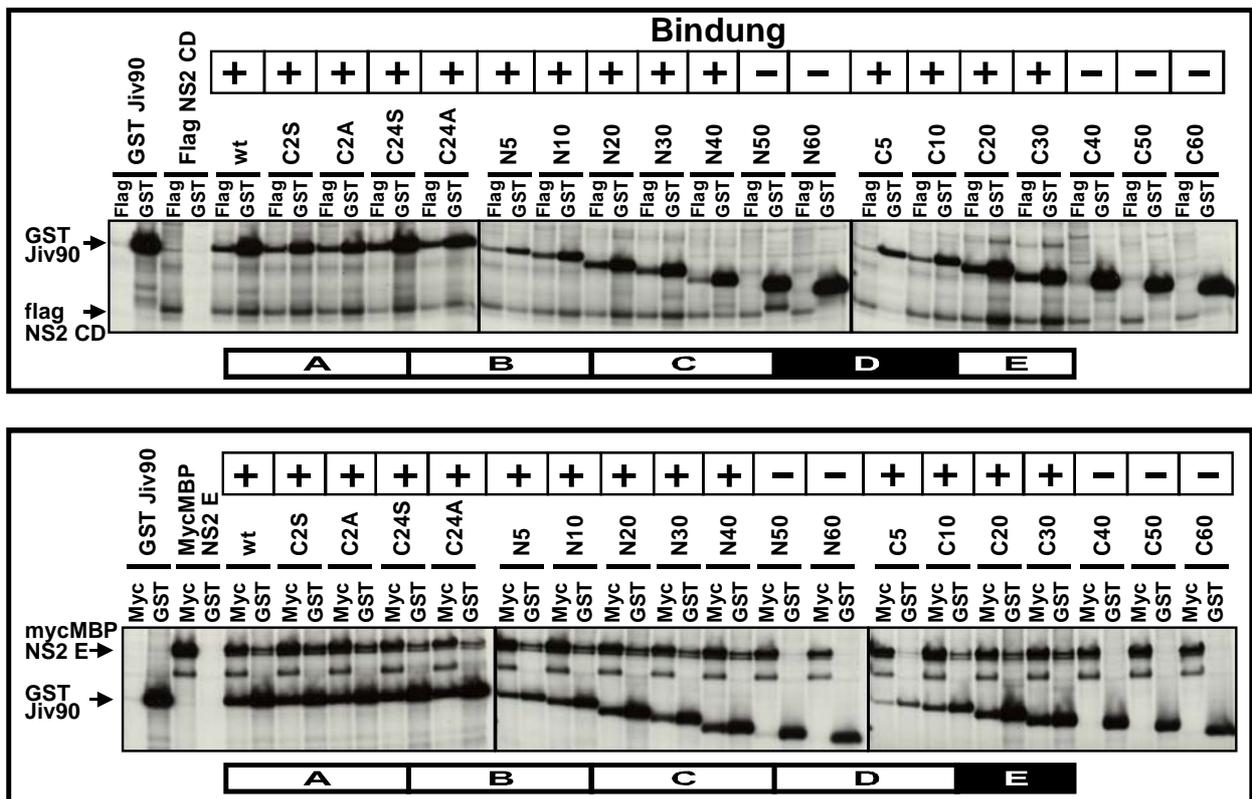


Abbildung B27: Bestimmung des minimalen interaktionsfähigen Jiv-Fragmentes für beide Bindungsstellen im NS2 (RIP)

Jiv-Punktmutationen und -Verkürzungen von beiden Seiten des Proteins wurden als GST-Fusionen auf Bindung an NS2-Fragmente getestet, die entweder die N-terminale (oben) oder die C-terminale (unten) Bindungsstelle für Jiv90 beinhalten. Für die Bindungsstelle im NS2-Fragment D wurde ein Konstrukt eingesetzt, das die Fragmente C und D mit einem flag-Epitop enthielt; für das Fragment E wurde dessen Fusion an MBP mit einem myc-Epitop verwendet. In beiden Fällen können 40 Aminosäuren vom N- und 30 Aminosäuren vom C-Terminus des Jiv90 ohne Einfluß auf die Interaktion mit den NS2-Fragmenten deletiert werden.

Ergebnisse

Diese Konstrukte wurden verwendet, da sie zum einen ausreichend groß waren um gut detektierbar zu sein und zum anderen ein Molekulargewicht aufwiesen, das sich deutlich von dem des Interaktionspartners GST-Jiv90 und dessen Verkürzungen unterschied.

Es zeigte sich, dass N-terminal 40 Aminosäuren des Jiv90 deletiert werden können, ohne die Interaktion mit beiden Bindungsstellen zu verlieren (Abb. B27). Vom C-Terminus des Jiv90 ausgehend war eine Deletion von 30 Aminosäuren möglich, trotzdem blieben beide Bindungen erhalten. Damit war klar, dass ein 20 Aminosäuren langer Bereich innerhalb von Jiv90 (Aminosäuren 41 bis 60) entscheidend für beide Interaktionen mit NS2 ist. Dabei handelt es sich um den gleichen Bereich von Jiv90, der sich auch

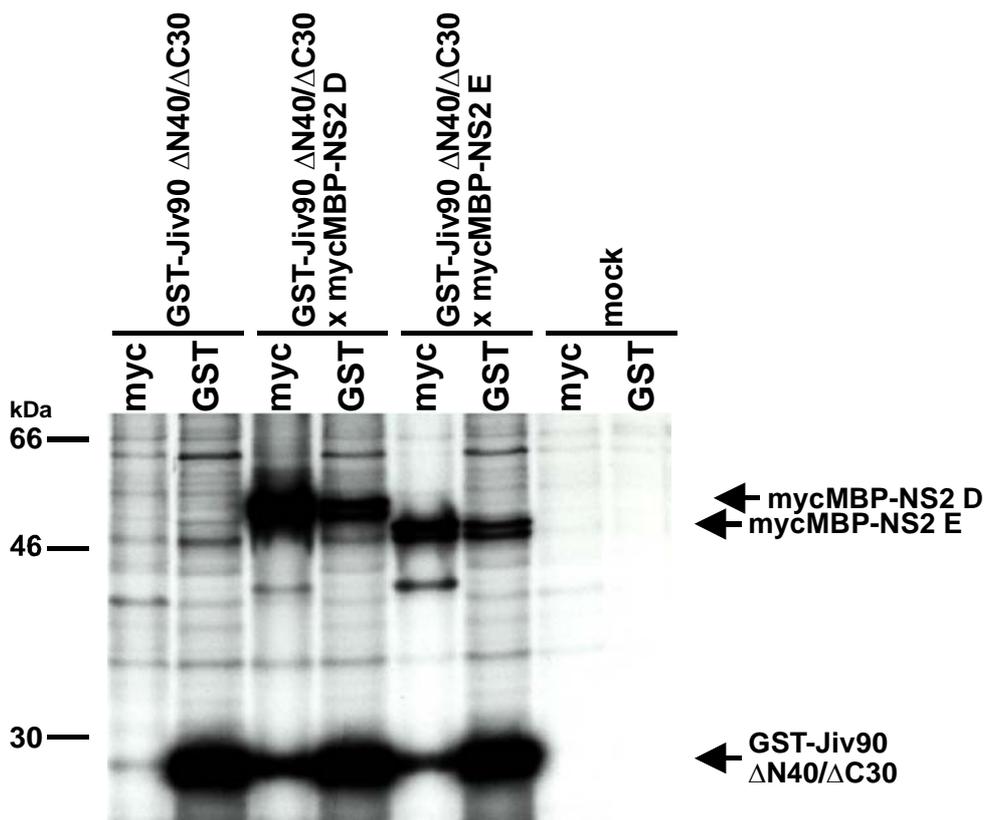


Abbildung B28: Das 20 Aminosäuren lange Peptid aus Jiv90 bindet an beide Bindungsstellen im NS2 von BVDV (RIP)

Die GST-Fusion eines N-terminal um 40 und C-terminal um 30 Aminosäuren verkürzten Jiv90-Proteins wurde auf Bindung an mycMBP-NS2 D bzw. E hin untersucht. Das verwendete Konstrukt mit 20 Aminosäuren des Jiv90 konnte sowohl mycMBP-NS2 D als auch myc MBP-NS2 E kopräzipitieren. Umgekehrt waren auch die beiden NS2 Fragmente in der Lage, das Jiv-Peptid zu präzipitieren. Demnach sind die 20 zentralen Aminosäuren aus Jiv90 alleine ausreichend, um mit beiden Bindungsstellen im NS2 zu interagieren.

Ergebnisse

schon als essentiell für die Bindung an authentisches NS2 erwiesen hatte (Abb. B21).

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob das Peptid aus diesen zentralen 20 Aminosäuren von Jiv90 auch ohne weitere N- oder C-terminale Jiv-Sequenzen in der Lage ist, mit den beiden Bindungsstellen im NS2 zu interagieren. Hierzu wurde ein N-terminal um 40 und C-terminal um 30 Aminosäuren verkürztes Jiv90-Protein als GST-Fusion verwendet (GST-Jiv90 Δ N40/ Δ C30; entspricht den Aminosäuren 41 bis 60 von Jiv90); dieses wurde zusammen mit dem NS2-Fragment D bzw. E (beide als Fusion an MBP mit N-terminalem myc-Epitop: mycMBP NS2 D, mycMBP NS2 E) in BHK-Zellen exprimiert, metabolisch markiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen das myc-Epitop bzw. GST immunpräzipitiert (Abb. B28). Sowohl mycMBP NS2 D, als auch mycMBP NS2 E waren in der Lage die GST-Fusion des 20-Aminosäuren langen Peptids von Jiv zu präzipitieren; umgekehrt konnten die beiden Fusionsproteine auch durch das Jiv-Peptid präzipitiert werden (Abb. B26). Somit bindet das gleiche 20 Aminosäuren lange und zentral in Jiv90 gelegene Peptid auch ohne zusätzliche Jiv-Anteile

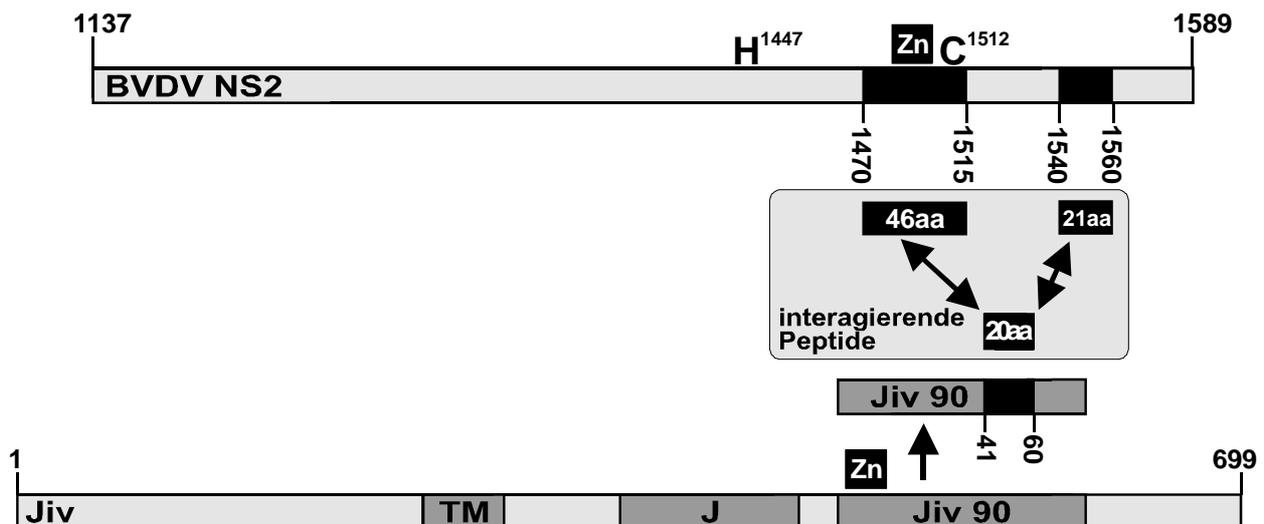


Abbildung B29: Übersicht über die Ergebnisse der Interaktionsstudien zwischen Jiv und NS2

Ein 20 Aminosäuren langes Peptid von Jiv ist in der Lage, mit zwei Peptiden des pestiviralen NS2 zu interagieren. Die Bindungsstellen im NS2 umfassen die Aminosäuren 1470 bis 1515, sowie 1540 bis 1560.

Ergebnisse

an die beiden unabhängigen Bindungsstellen im pestiviralen NS2. Mutationen am putativen Zinkfinger-Motiv am N-Terminus des Jiv90 hatten keine inhibierende Wirkung auf die Interaktion mit den Bindungsstellen im NS2 (Abb. B27).

Eine Übersicht über die eingegrenzten Interaktionspartner gibt Abb. B29.

6.2.5 Keine der 20 NS2-bindenden Aminosäuren des Jiv90 ist essentiell für die Interaktion mit NS2 oder die Induktion der NS2-3-Prozessierung

Im Folgenden wurden Aminosäuresubstitutionen im Kontext von GST-Jiv90 vorgenommen, um abzuklären, ob und welche der 20 zentral gelegenen Aminosäuren des Jiv90 für die Interaktion mit NS2 und damit auch für die Induktion der NS2-3-Spaltung von Bedeutung sind. Hierzu wurden jeweils zwei benachbarte Aminosäuren, beginnend bei AS 41 des Jiv90, durch Alanin ersetzt (Abb. B30); dies ist eine zur Identifikation essentieller Aminosäuren oft genutzte Technik, die auch als „Alanin-Scan“ bezeichnet wird. Sollte es eine für die Interaktion entscheidende Aminosäure in diesem 20er Peptid geben, käme es zum Verlust der Interaktion mit NS2 bzw. NS2-3

GST-Jiv90

GST MCSRCQCKHRRFEMDREPKSARYCAECNRLHPAEGDFWAESSMLGLKITYFALMDGKVDITWAGCQRVGI SPDTHRVPYHISFGSRM

BINDEPEPTID VON JIV90

41 **ESSMLGLKITYFALMDGKVY** 60

AA SMLGLKITYFALMDGKVY	aa41/42
ES AA LGLKITYFALMDGKVY	aa43/44
ESSM AA LKITYFALMDGKVY	aa45/46
ESSMLG AA ITYFALMDGKVY	aa47/48
ESSMLGLK AA YFALMDGKVY	aa49/50
ESSMLGLKIT AA ALMDGKVY	aa51/52
ESSMLGLKITYF AA MDGKVY	aa53/54
ESSMLGLKITYFAL AA GKVY	aa55/56
ESSMLGLKITYFALMD AA VY	aa57/58
ESSMLGLKITYFALMDGK AA	aa59/60

Abbildung B30: Alanin-Scan im Peptid von Jiv90, das für die Bindung an NS2 verantwortlich ist (Schema der Expressionskonstrukte)

Zehn Doppelmutanten der für die Interaktion mit NS2 essentiellen Aminosäuren von Jiv wurden auf der Basis des Klons pGST-Jiv90 hergestellt und als GST-Fusion in BHK-Zellen mit dem BVDV-Polyproteinfragment flagNS2-4A i- koexprimiert. Es wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Aminosäuren paarweise durch Alanin ersetzt. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob und welche Aminosäuren des Bindepeptids für die Interaktion mit NS2 und die Induktion der NS2-3 Spaltung von Bedeutung sind.

Ergebnisse

und der NS2-3-Spaltungsinduktion. Die entsprechenden zehn Mutanten (Abb. B30) wurden nach Koexpression mit flagNS2-4A i- auf NS2 / NS2-3 Bindung und NS2-3-Spaltungsinduktion in der Radioimmunpräzipitation untersucht.

Alle 10 Mutanten waren in der Lage, mit flagNS2 bzw. flagNS2-3 zu interagieren (ersichtlich an der Kopräzipitation der GST-Jiv90 Mutanten in

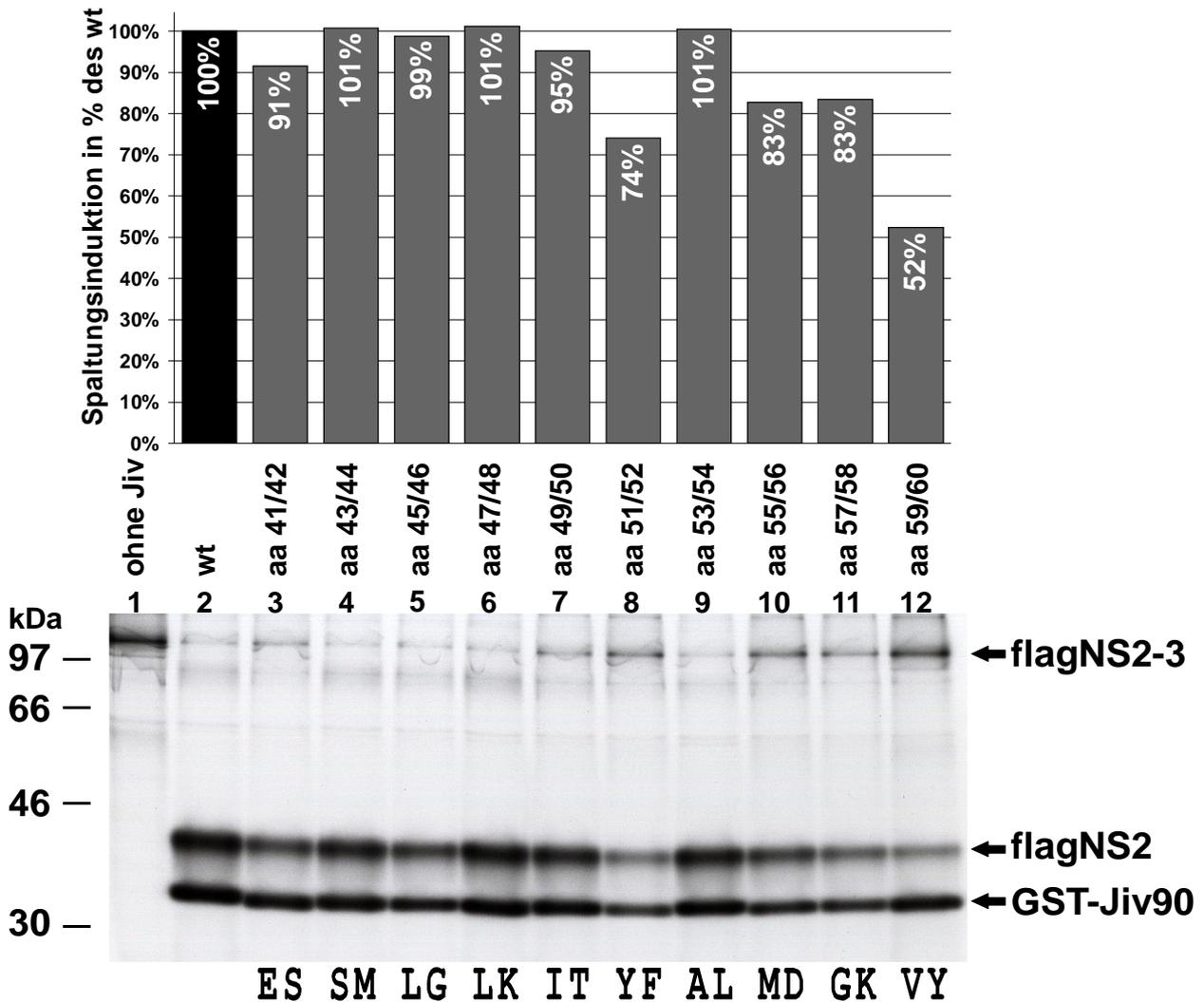


Abbildung B31: Alanin-Scan im Bindepeptid von Jiv90 (RIP)

Nach Koexpression von GST-Jiv90 oder dessen Doppelmutanten mit flagNS2-4A i- wurde eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen das flag-Epitop durchgeführt. Die Zahlen über den jeweiligen Spuren der Gele geben die Positionen der Substitutionen zu Alanin innerhalb des Jiv90 an, die Buchstaben unter den Spuren die Art der ausgetauschten Aminosäuren. Das Auftreten von GST-Jiv90 im Gel beruht auf Kopräzipitation und ist daher Zeichen der Interaktion mit flagNS2 bzw. flagNS2-3. Bei alleiniger Expression von NS2-4A i- tritt keine NS2-3 Spaltung auf (Spur 1). Bei Koexpression von GST-Jiv90 kommt es zur Interaktion mit Jiv und Spaltung des NS2-3 (Spur 2). Jede der verwendeten Doppelmutanten ist in der Lage, die NS2-3 Spaltung zu induzieren und mit NS2(-3) zu interagieren (Spuren 3-12). Die Spaltungseffizienz wurde durch Phosphorimager-Analyse bestimmt (NS2 / (NS2+NS2-3)) und auf den durch wt Jiv90 erreichten Wert bezogen (100%); die quantifizierten Werte sind im Diagramm oben in der Abbildung dargestellt.

Ergebnisse

Abb. B31) und die Spaltung von NS2-3 auszulösen (ersichtlich am Auftreten des Spaltproduktes flagNS2 in Abb. B31). Daher ist die Identität von keiner der 20 Aminosäuren im minimalen Bindepeptid von Jiv90 für dessen Interaktion mit NS2 absolut essentiell. Dieses Ergebnis spricht für eine eher „großflächige“ Interaktion von NS2 mit Jiv, bei der mehrere der 20 Aminosäuren zusammenwirken und die nicht durch den paarweisen Austausch von nur zwei Aminosäuren zu verhindern ist.

Das Maß der Spaltungsinduktion ($\text{flagNS2} / (\text{flagNS2} + \text{flagNS2-3})$) wurde über Phosphorimager-Analyse quantifiziert; dabei zeigten vor allem die Mutanten aa51/52 und aa59/60 geringere Effizienzen der NS2-3-Spaltungsinduktion als der Wildtyp und alle anderen Jiv-Mutanten (Abb. B31). Interessanterweise waren bei diesen beiden Doppelmutanten jeweils ein oder sogar zwei aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin) durch Alanin substituiert worden (siehe Abb. B30), so dass zu vermuten war, dass die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren im Zentrum von Jiv90 eine besondere Rolle für die Wechselwirkung mit NS2 spielen. Um zu überprüfen, ob eine Substitution aller drei im zentralen Bindepeptid enthaltenen aromatischen Aminosäuren einen kumulativ negativen Effekt auf die Interaktion mit NS2(-3) und die NS2-3-Spaltungsinduktion hat, wurde eine dreifache Mutante hergestellt (GST-Jiv90 Y51A/F52A/Y60A) und auf Interaktion mit NS2 bzw. NS2-3 und NS2-3-Spaltungsinduktion getestet (Abb. B32). Tatsächlich zeigte diese dreifache Mutante nur noch eine sehr reduzierte Fähigkeit zur Spaltungsinduktion (14% bezogen auf den Jiv90 wt) und Interaktion mit NS2 bzw. NS2-3. Die aromatischen Aminosäuren in der Bindungsdomäne des Jiv90 sind diesen Ergebnissen zufolge für die Induktion der NS2-3-Spaltung von Bedeutung, allerdings ist eine minimale Prozessierung auch noch möglich, wenn alle drei Aromaten substituiert werden.

Ergebnisse

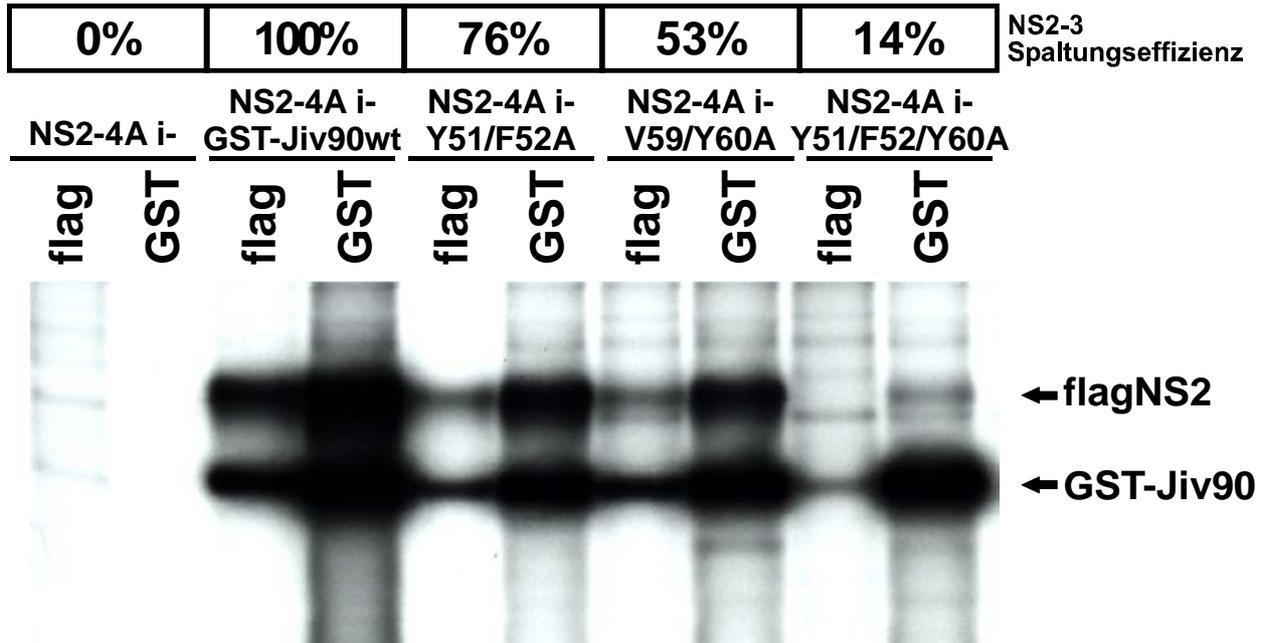


Abbildung B32: Substitution der aromatischen Aminosäuren im Bindepeptid des Jiv90 GST-Jiv90 und dessen Mutanten wurden in BHK Zellen mit flagNS2-4A i- koexprimiert und über Antikörper gegen das flag-Epitop bzw. gegen GST immunpräzipitiert. Bei Koexpression von GST-Jiv90 wt mit flagNS2-3 trat die effizienteste Spaltung auf (als 100% definiert); Substitutionen von Y51 und F52 zu Alanin führten, ebenso wie die Substitutionen von V59 und Y60, zur Reduktion der Spaltungs-Aktivität auf 76% bzw. 53%. Die Mutante Y51A/F52A/Y60A, bei der alle drei aromatischen Aminosäuren im Bindepeptid von Jiv90 durch Alanin ersetzt wurden, kann kaum noch NS2-3 Spaltung induzieren (14%).

6.2.6 Nur eine Aminosäure des Jiv90 ist essentiell für die Induktion der NS2-3-Prozessierung

Der innerhalb des 20 Aminosäuren großen Bindepeptids von Jiv90 durchgeführte Alanin-Scan zeigte, dass keine dieser NS2-bindenden Aminosäuren essentiell für die Interaktion mit NS2 oder die Induktion der NS2-3-Prozessierung ist. Um diese Studie zu vervollständigen und abzuklären, ob es in den anderen Bereichen von Jiv90 zur Auslösung der NS2-3-Spaltung unverzichtbare Aminosäuren gibt, wurde im nächsten Schritt der Alanin-Scan auf die restlichen Bereiche von Jiv90 ausgedehnt. Hierzu wurden wieder auf Basis des Klonen pGST-Jiv90 zunächst 24 Mutanten hergestellt, bei denen paarweise jeweils zwei Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden. Ausgespart hiervon blieben nur die ersten zehn und letzten fünf Aminosäuren von Jiv90, da diese, wie bereits beschrieben, ohne Verlust der Fähigkeit zur Spaltungsinduktion deletiert werden können. Die Aminosäuren an den Positionen 81 bis 85 von Jiv90 wurden einzeln durch Alanin substituiert, da hier ein zur Spaltungsinduktion entscheidender Bereich von Jiv90 erwartet worden war. Eine Übersicht über Art und Lage der

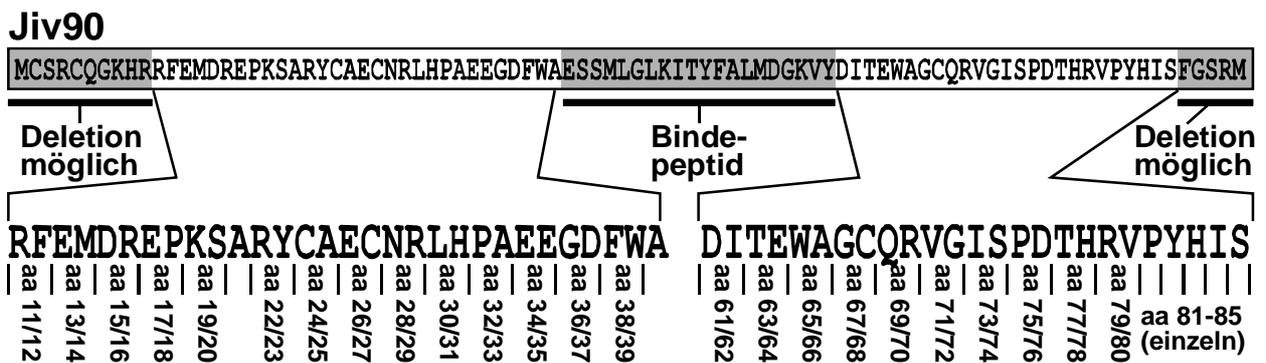


Abbildung B33: Alanin-Scan der restlichen Bereiche von Jiv90 (Übersicht der Mutanten)

N-terminal können zehn, C-terminal fünf Aminosäuren von Jiv90 unter Erhalt der Fähigkeit zur NS2-3 Spaltungsinduktion deletiert werden (siehe auch Abbildung B21). Die Bedeutung der zentralen 20 Aminosäuren, die für die Interaktion mit NS2 ausreichen, wurde schon im Rahmen eines Alanin-Scans untersucht (siehe Abbildung B31). In einer weiteren Studie sollte der Einfluss der verbleibenden Aminosäuren des Jiv90 auf die NS2-3 Spaltungsinduktion mittels Alanin-Scan untersucht werden. Hierzu wurden paarweise Substitutionen zu Alanin durchgeführt; die Positionen der Austausch sind in der Abbildung jeweils angegeben. Die Aminosäuren 81 bis 85 des Jiv90 wurden einzeln durch Alanin substituiert.

Ergebnisse

hergestellten Mutanten gibt die Abbildung B33.

Die mutierten GST-Jiv90 Fusionsproteine wurden zusammen mit flagNS2-4A i- in BHK-Zellen transient exprimiert und metabolisch markiert; die erhaltenen Zell-Lysate wurden mit einem flag-spezifischen monoklonalen

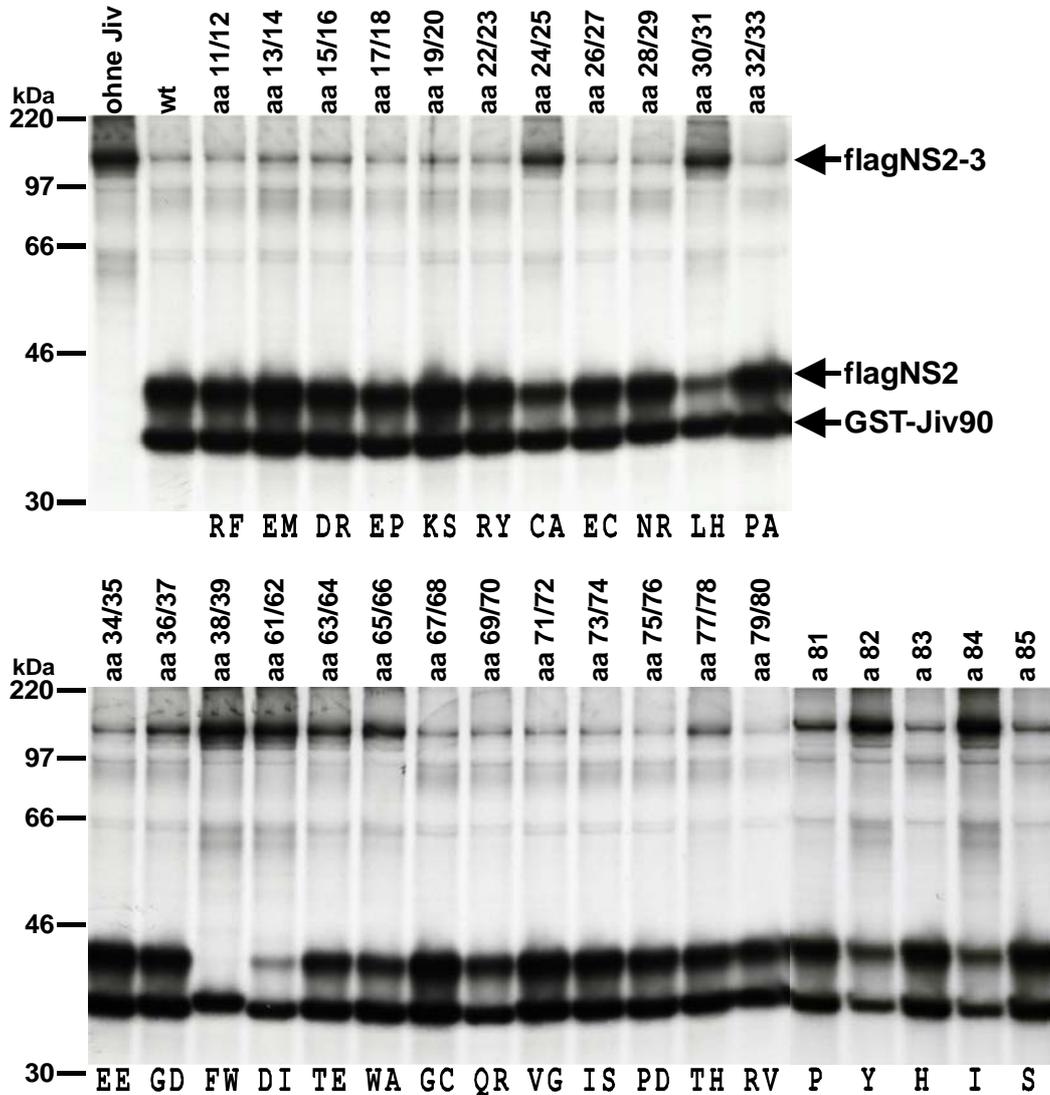


Abbildung B34: Alanin-Scan der restlichen Bereiche von Jiv90 (RIP)

flagNS2-4A i- wurde in BHK Zellen alleine oder mit GST-Jiv90 wt bzw. dessen Mutanten koexprimiert und metabolisch markiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das flag-Epitop, die Auswertung nach SDS-PAGE mittels Autoradiographie. Die Zahlen über den jeweiligen Spuren der Gele geben die Positionen der Substitution(en) zu Alanin innerhalb des Jiv90 an, die Buchstaben unter den Spuren die Art der ausgetauschten Aminosäuren (siehe Übersicht der Mutanten in Abbildung B33). flagNS2 ist Indikator der durch GST-Jiv90 induzierten Prozessierung von flagNS2-3. Die Detektion von GST-Jiv90 beruht auf Kopräzipitation mit flagNS2 bzw. flagNS2-3. Alle Mutanten von GST-Jiv90 können mit flagNS2 bzw. flag NS2-3 interagieren. Gleiches gilt in Bezug auf die Induktion der NS2-3 Spaltung, allerdings mit einer einzigen Ausnahme: Bei Substitution der Aminosäuren F38 und W39 des Jiv90 zu Alanin kann das entsprechende GST-Jiv90 Derivat die Prozessierung von flagNS2-3 nicht mehr induzieren.

Ergebnisse

Antikörper immunpräzipitiert, die radioaktiv markierten Proteine anschließend im SDS-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie und Phosphorimager-Analyse ausgewertet. Die Originaldaten sind in Abbildung B34, die quantitative Auswertungen in B35 dargestellt.

Die erzeugten Doppel- und Einzelmutanten sind diesen Daten zufolge bis auf eine Ausnahme alle in Lage, die NS2-3-Prozessierung auszulösen (erkennbar am Auftreten des Spaltproduktes flagNS2). Bei der genannten Ausnahme handelt es sich um die Doppelmutante aa 38/39, bei der das Phenylalanin an Position 38 und das Tryptophan an der Position 39 durch Alanin ersetzt worden waren; diese Mutante konnte trotz unverändert guter Interaktion mit NS2-3 die NS2-3-Prozessierung nicht mehr induzieren (0 %).

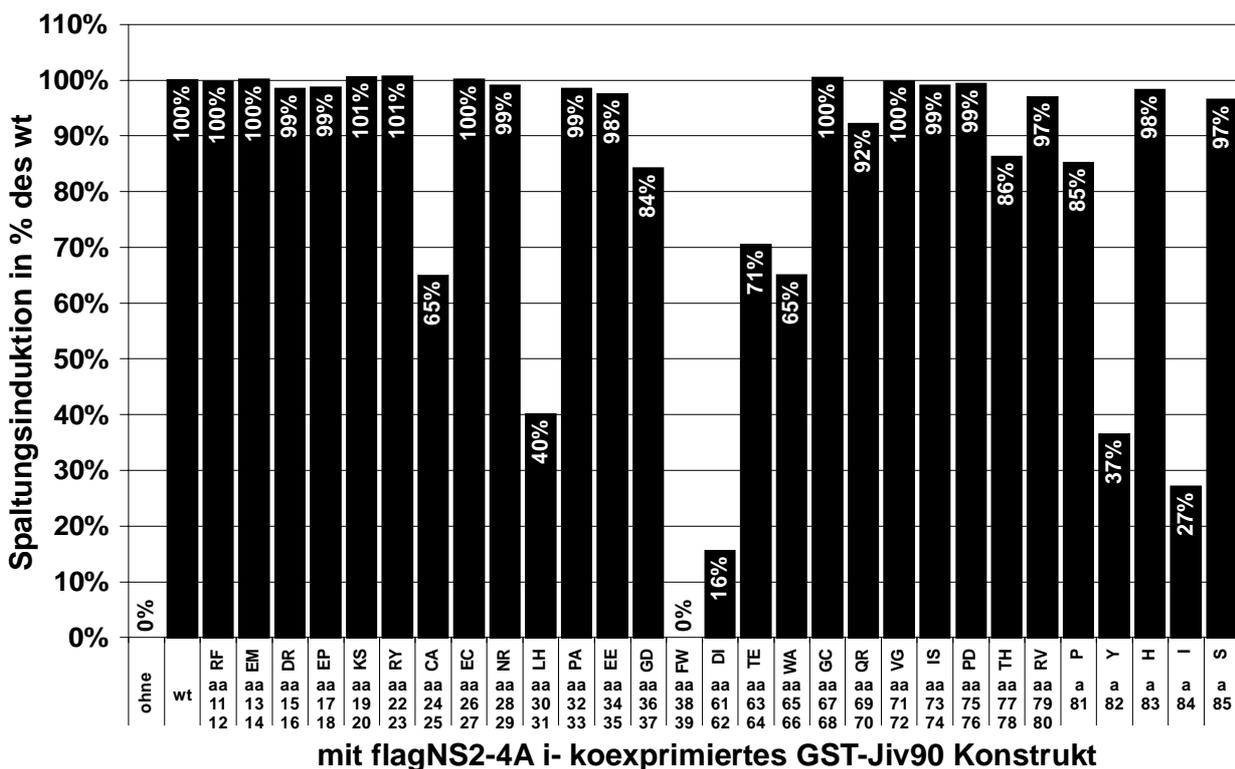


Abbildung B35: Effizienz der NS2-3 Prozessierung bei Koexpression von GST-Jiv90 Alanin-Scan Mutanten

Durch Phosphorimager-Analyse der Gele aus Abbildung B34 wurden die Mengen an flagNS2-3 und freiem flagNS2 bestimmt. Der Quotient aus freiem NS2 und der Summe dieser beiden Signale wurde berechnet. Die Effizienz der durch GST-Jiv90 wt ausgelösten NS2-3 Spaltung wurde als 100 % definiert und die restlichen Werte entsprechend angepasst. Durch gepaarte Austausch der Aminosäuren 38 und 39 (0 % Spaltung) bzw. 61 und 62 (16 % Spaltung) von Jiv90 konnten die stärksten negativen Effekte auf Spaltungsinduktion beobachtet werden.

Ergebnisse

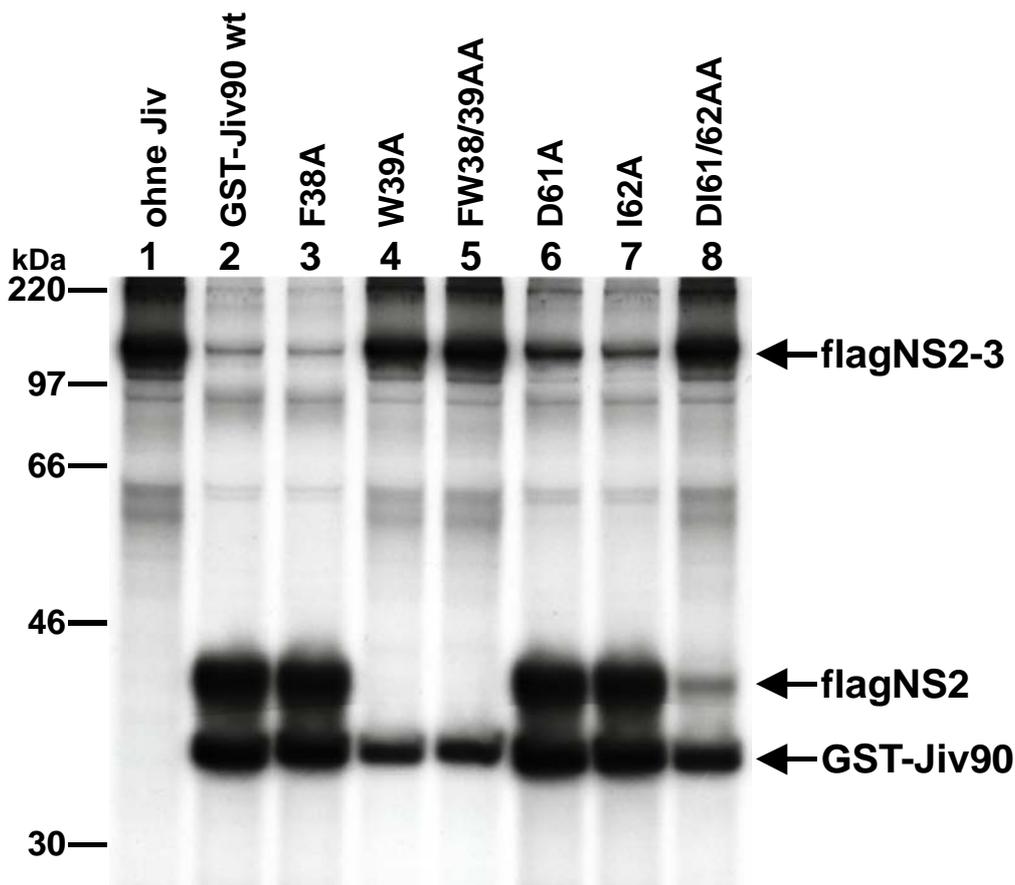


Abbildung B36: Einfluss von Mutationen an den Positionen 38, 39, 61 und 62 des Jiv90 auf die Effizienz der NS2-3 Spaltung (RIP)

flagNS2-4A i- wurde in BHK Zellen alleine (Spur 1), mit GST-Jiv90wt (Spur 2) oder dessen Mutanten (Spuren 3 bis 8) koexprimiert, metabolisch markiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das flag-Epitop immunpräzipitiert. Über den jeweiligen Spuren des SDS-Gels sind die Art und Position der Substitution(en) zu Alanin innerhalb des Jiv90 angegeben (siehe Übersicht der Mutanten in Abbildung B33). flagNS2 ist Indikator der durch GST-Jiv90 induzierten Prozessierung von NS2-3. Die Detektion von GST-Jiv90 beruht auf Kopräzipitation mit flagNS2 bzw. flagN2-3. Die Substitution von F38 zu Alanin hat keine Auswirkungen auf die NS2-3 Spaltungsinduktion (Spur 3), der Austausch des direkt benachbarten Tryptophans (W39, Spur 4) hingegen unterbindet diese. Dies erklärt, dass die entsprechende Doppelmutante (Spur 5) nicht in der Lage ist, die NS2-3 Spaltung auszulösen. Obwohl der doppelte Austausch von D61 und I62 (Spur 8) die Effizienz der NS2-3 Spaltung deutlich reduziert, haben die einzelnen Substitutionen dieser Aminosäuren (Spuren 6 und 7) nur geringen Einfluss auf diesen Vorgang.

Eine besonders schwache Induktion der NS2-3-Spaltung zeigte auch die Mutante aa 61/62, bei der eine Asparaginsäure und ein Isoleucin jeweils durch Alanin ersetzt worden waren (16 %).

Da die Positionen 38, 39, 61 und 62 diesen Ergebnissen nach eine entscheidende Rolle für die Induktion der Prozessierung spielen, wurden diese nun einzeln durch Alanin substituiert und in einem identischen

Ergebnisse

Versuchsaufbau untersucht (Abb. B36). Es zeigte sich, dass das Phenylalanin in Position 38 keine Bedeutung für die Induktion der Spaltung besitzt (Spur 3 in Abb. B36). Hingegen konnte kein Spaltprodukt (flagNS2) beobachtet werden, wenn das nachfolgende Tryptophan (W39) durch Alanin substituiert worden war (Spur 4). Die Unfähigkeit der Doppelmutante der Positionen 38/39, die NS2-3-Spaltung auszulösen (siehe Abb. B34 und B36 Spur 5), beruhte folglich nur auf dem Austausch an der Position 39.

Völlig anders ist die Situation an den Positionen 61 und 62: Hier zeigen die Einzel-Substitutionen (Spuren 6 und 7 in Abb. B36) im Vergleich zum GST-Jiv90 wt einen jeweils nur geringen negativen Effekt auf die NS2-3-Prozessierungsleistung (Abb. B37). Kumulativ jedoch wirken diese beiden negativen Effekte kooperativ, sodass die entsprechende Doppelmutante (Spur 8) nur eine deutlich reduzierte NS2-3-Spaltung vermitteln kann. Im Gegensatz zum Tryptophan an Position 39 sind die beiden Aminosäuren

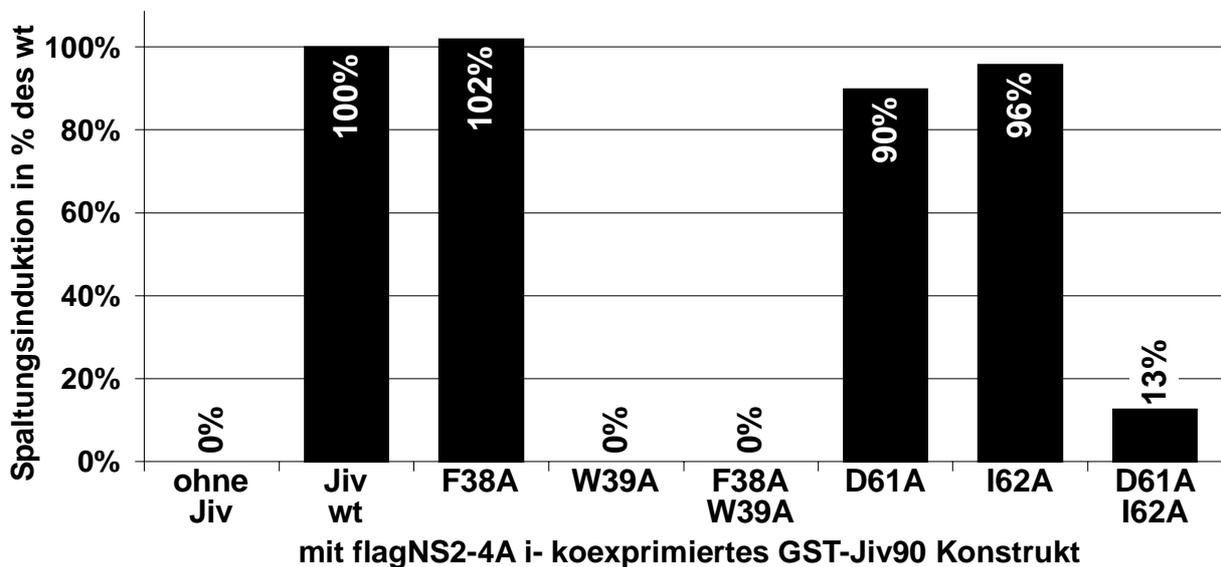


Abbildung B37: Einfluss von Mutationen an den Positionen 38, 39, 61 und 62 des Jiv90 auf die Effizienz der NS2-3 Spaltung (Quantifizierung)

Durch Phosphorimager-Analyse des Gels aus Abbildung B36 wurden die Mengen an flagNS2-3 und freiem flagNS2 bestimmt. Der Quotient aus freiem NS2 und der Summe dieser beiden Signale wurde berechnet. Die Effizienz der durch GST-Jiv90 wt ausgelösten NS2-3 Spaltung wurde als 100 % definiert und die restlichen Werte entsprechend angepasst. Die Substitution des Tryptophans an Position 39 des Jiv90 zu Alanin (W39A) führt zum vollständigen Verlust der Induktion der NS2-3 Prozessierung.

Ergebnisse

allerdings nicht essentiell für diesen Vorgang – eine Spaltung auf niedrigem Niveau findet selbst bei doppeltem Aminosäure-Austausch noch statt.

Eine Übersicht der wichtigsten Ergebnisse zur Funktionsweise von Jiv90 gibt die Abb. B38.

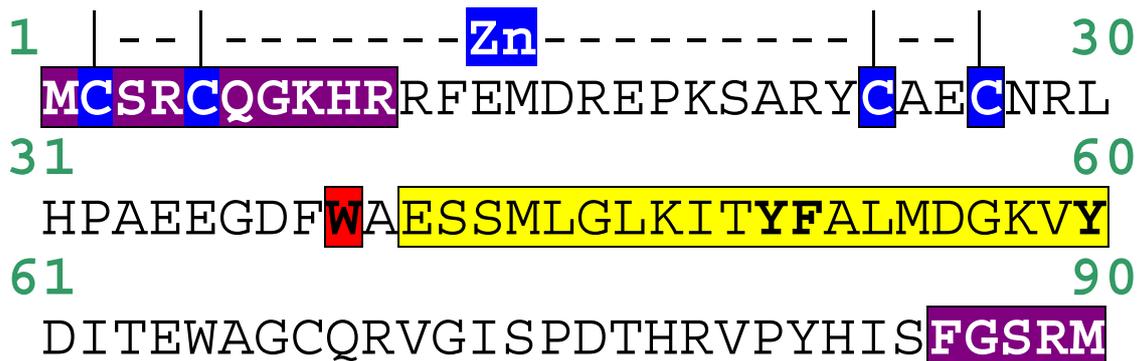


Abbildung B38: Zusammenfassung der Ergebnisse zu Jiv90

Die Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz von Jiv90. Durch Farben sind verschiedene Bereiche des Proteins hervorgehoben:

- Blau hinterlegt:** Putativ zink-koordinierende Cysteine an den Positionen 2, 5, 24 und 27.
- Violett hinterlegt:** Bereiche, die zur Induktion der NS2-3-Spaltung nicht notwendig sind.
- Gelb hinterlegt:** Bereich von Jiv90, der für die Bindung an NS2 verantwortlich ist. Die aromatischen Aminosäuren in diesem Bereich sind fett dargestellt und spielen eine besonders wichtige Rolle, sind aber nicht essentiell.
- Rot hinterlegt:** Zur NS2-3-Spaltungsinduktion essentielles Tryptophan an Position 39. Alle anderen Aminosäuren von Jiv90 können ohne Verlust der NS2-3-Spaltungsinduktion paarweise oder einzeln durch Alanin ersetzt werden.

7 Diskussion

Die Daten in der vorliegenden Arbeit belegen eine autoproteolytische Funktion für das pestivirale NS2-Protein; diese Cystein-Protease im NS2 ist für die Spaltung des NS2-3 Fusionsproteins verantwortlich und ermöglicht somit die Freisetzung des Nichtstrukturproteins NS3.

NS3 ist nach den beschriebenen Ergebnissen dieser Arbeit ein essentieller Bestandteil des viralen RNA-Replikationskomplexes. Die Bereitstellung von NS3 durch die NS2-Protease ist nur in noncp BVDV-infizierten Zellen zeitlich und mengenmäßig begrenzt. Die limitierten Mengen an NS3 korrelieren hier mit eingeschränkter viraler RNA-Synthese und dem noncp Biotyp.

Alle bisher erhaltenen Daten sprechen dafür, dass die NS2-Protease vom zellulären Kofaktor Jiv abhängig ist und hierüber die NS3-Synthese limitiert wird.

Im Folgenden werden besonders wichtige Aspekte dieser Arbeit genauer diskutiert werden.

7.1 Verwandtschaft der pestiviralen NS2-Protease mit der NS2-3-Protease von Hepaciviren

Die Identifizierung der für die NS2-3-Spaltung verantwortlichen Protease war ein entscheidender Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Abläufe bei der Zusammensetzung des pestiviralen RNA-Replikationskomplexes. Das nach bioinformatischen Analysen von A. E. Gorbalenya vorhergesagte Protease-Modell im C-terminalen Bereich von NS2 konnte durch 64 Punktmutanten *in vitro* und neun Mutanten *in vivo* bestätigt und verfeinert werden. Der Aufbau der Protease ähnelt dem der proteolytischen Domäne der NS2-3-Protease der verwandten Hepaciviren (HCV). Es konnte gezeigt werden, dass die katalytisch aktiven Aminosäuren Cystein und Histidin, analog zur Situation bei den Hepaciviren (Kolykhalov et al., 2000), tatsächlich

Diskussion

für die NS2-3-Prozessierung *in vitro* und die Replikationsfähigkeit der Viren beider Biotypen (noncp und cp) *in vivo* essentiell sind.

Besonders auffällig war der Phänotyp nach Mutation des katalytischen Cysteins (C₁₅₁₂) zu Serin: Im Gegensatz zu allen anderen Austausch an dieser Position, erlaubte diese Mutante eine, wenn auch reduzierte (26 %), Aktivität der Protease *in vitro* (nach transienter Expression in BHK-Zellen im T7-Vacciniavirus-System); allerdings ist auch diese Punktmutation an der katalytischen Aminosäure letal für das Virus *in vivo*. Umgekehrtes gilt für die Mutation Arginin (R₁₅₈₉) zu Prolin an der NS2-3-Spaltstelle: Die Menge an gebildetem NS3 lag hier *in vitro* unter der Nachweisgrenze, dennoch war die RNA mit dieser Mutation *in vivo* quasi-infektiös, denn sie erlaubte das Auftreten von Rückmutationen (Revertanten). Diese Phänotypen legen nahe, dass die Autoprozessierung von NS2-3, vergleichbar mit Proteinprozessierungen in anderen Virussystemen (Birghan et al., 2000; Hahn and Strauss, 1990), nach strengen Regeln abzulaufen hat, um die virale Replikation zu ermöglichen. So ist denkbar, dass die Protease mit einem Serin als Nukleophil im aktiven Zentrum (C1512S) zwar *in vitro* zur teilweisen Spaltung befähigt ist, aber *in vivo* eine abweichende Kinetik der Prozessierung aufweist, was dramatische Einflüsse auf nachfolgende Prozesse, wie beispielsweise eine korrekte Membran-Insertion des Proteins, haben könnte. In diesem Fall wäre, unabhängig von einer ablaufenden NS2-3-Spaltung, die Ausbildung eines funktionierenden RNA-Replikationskomplexes und damit auch das Auftreten von Revertanten nicht möglich. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine funktionelle Membran-Insertion im verwandten HCV-System von der NS2-3-Spaltung abhängt (Santolini et al., 1995). Im Gegensatz hierzu könnte ein gravierender negativer Effekt auf die Spaltungseffizienz im Falle der Mutante R1589P *in vitro* die Ausbildung einiger weniger funktioneller RNA-Replikationskomplexes *in vivo* durchaus zulassen. In diesem Fall ist die

Diskussion

enzymatisch aktive Domäne der Protease nicht verändert und wenige funktionelle Replikationskomplexe könnten im Rahmen der RNA-Synthese die Entstehung von replikationsfähigen Revertanten ermöglichen.

Die Identifizierung einer möglichen dritten katalytischen Aminosäure der NS2-Protease ist nicht gelungen. Die Prozessierung von NS2-3 ist *in vitro* nur teilweise sensitiv gegenüber Mutationen der Glutaminsäure an Position 1462, die im NS2 von Pesti-, Hepaci- und GB-Viren durchgängig konserviert ist. Dieses Ergebnis repräsentiert folglich nicht das typische Profil einer katalytischen Aminosäure und geht mit den bioinformatischen Vorhersagen nicht konform. Allerdings ist auch über die Rolle der E₁₄₆₂ entsprechenden Glutaminsäure bei HCV nur wenig bekannt; genauere Untersuchungen zu deren Funktion stehen noch aus.

Unter Berücksichtigung der nur geringen Ähnlichkeiten der Polyprotein-Sequenzen von Hepaci- und Pestiviren ist die Konservierung der Proteasedomäne im NS2 bei Vertretern aus beiden Genera bemerkenswert. Ein grundlegender Unterschied besteht jedoch in dem Befund, dass zur NS2-3-Prozessierung bei BVDV lediglich sieben Aminosäuren NS3 benötigt werden, während eine Spaltung bei HCV nur dann stattfindet, wenn etwa 180 Aminosäuren NS3 vorhanden sind (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). Die Abhängigkeit der HCV NS2-3 Autoprotease von NS3 wurde in einer früheren Untersuchung mit einer Zink-bindenden Struktur im NS3 in Verbindung gebracht. Dieses Zink-Bindemotiv ist selbst nicht katalytisch, hat aber anscheinend eine essentielle strukturelle Bedeutung für die Ausbildung einer Chymotrypsin-ähnlichen Proteinfaltung und ist daher Voraussetzung für die Prozessierung von NS2-3 bei HCV (Gorbalenya and Snijder, 1996). Kristallstruktur-Analysen zufolge liegt diese Struktur gegenüber des Spaltes im Protein, der das aktive Zentrum der Serinprotease im N-terminalen Teil des NS3 beherbergt (Kim et al., 1996; Love et al., 1996). Es könnte sich dabei um eine besondere Variante eines Zinkfingers handeln, der sonst nur

Diskussion

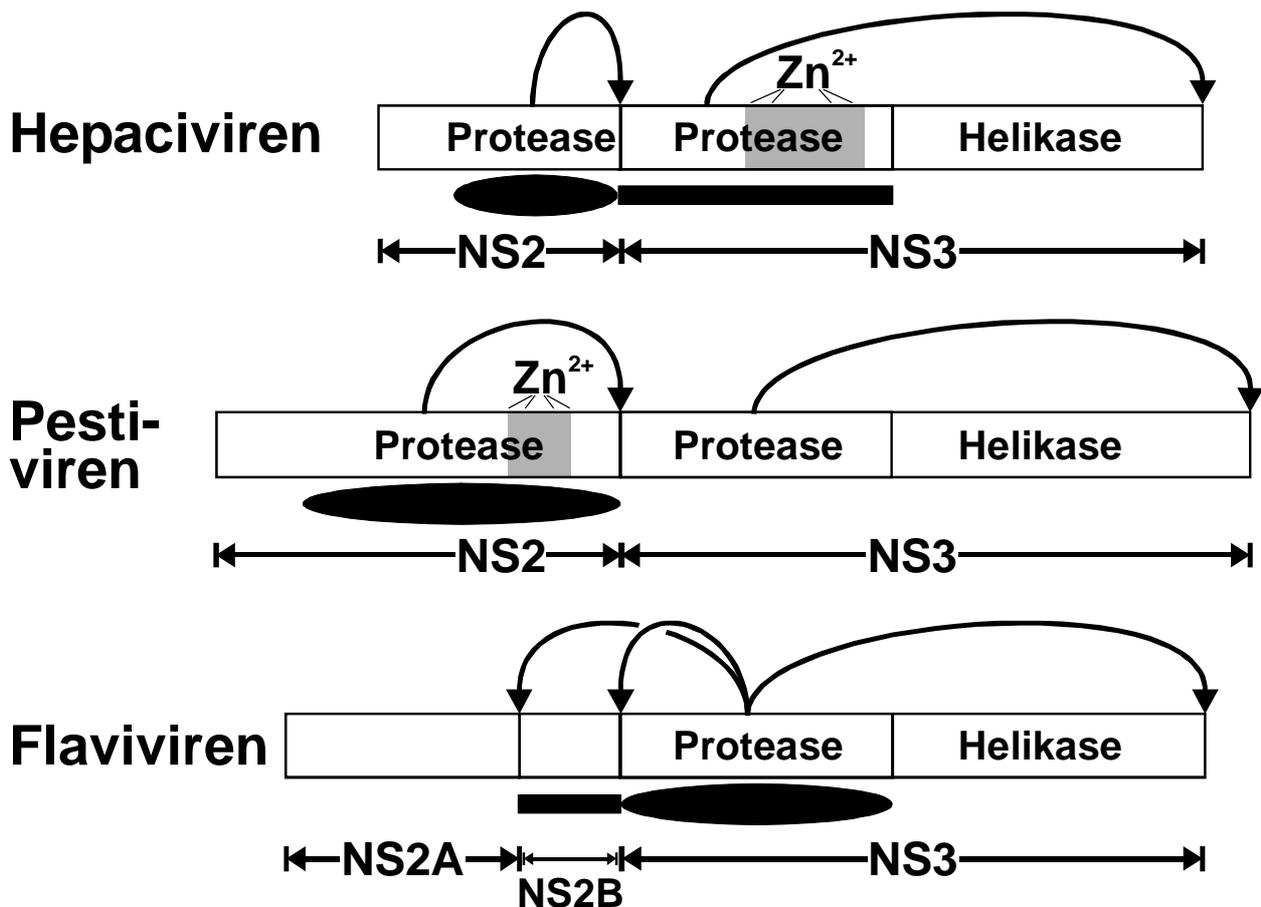


Abbildung C1: Vergleichendes Schema zur Prozessierung von NS2-3 in der Familie *Flaviviridae*

Kästen symbolisieren Proteinabschnitte, die schwarzen Ellipsen darunter die für die NS2-3-Spaltung verantwortlichen Proteasen und die schwarzen Balken die von diesen zur enzymatischen Aktivität benötigten zusätzlichen Proteinbereiche. Die gebogenen Pfeile entspringen den jeweiligen Proteasen und ihren Spitzen zeigen auf die entsprechenden Spaltstellen.

Eine Protease im NS2 ist für die NS2-3-Spaltung bei Pestiviren verantwortlich. Im HCV-System wird diese Spaltung durch die NS2-3-Protease katalysiert. Im NS3 existiert bei Vertretern dieser beiden Genera eine zweite Protease, die alle Prozessierungsschritte im Polyprotein unterhalb von NS3 bewerkstelligt. Mitglieder des Genus *Flavivirus* besitzen hingegen nur eine Protease (NS2B-3-Protease), die auch den N-Terminus von NS3 generiert.

noch bei einer Cysteinprotease im 2A-Protein von Entero- und Rhinoviren der Familie *Picornaviridae* vorkommt (Petersen et al., 1999; Yu and Lloyd, 1992), jedoch nicht im NS3 der Pestiviren. Bemerkenswerterweise existiert nach den Daten aus der bioinformatischen Analyse eine für Pestiviren einzigartige Insertion innerhalb des aktiven Zentrums der NS2-Protease, die eine putativ Zink-bindende Struktur beinhaltet. Nach den Ergebnissen der Mutagenese-Studie haben die putativ an der Zink-Bindung beteiligten Cysteine auch

Diskussion

Einfluss auf die NS2-3 Autoprozessierung *in vitro* und auf die Replikation der viralen RNA *in vivo*. Um Funktion und Bedeutung der Zinkfinger-Struktur vollständig zu verstehen, wäre als nächster Schritt ihre strukturelle und biochemische Charakterisierung notwendig. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann bei Pesti- und Hepaciviren bezüglich der Bedeutung des Zinkfingers für die NS2-3-Prozessierung lediglich die Variation eines gemeinsamen Mechanismus postuliert werden: Das gegenwärtige Arbeitsmodell besagt, dass die Spaltung von NS2-3 von einer Protease katalysiert wird, deren aktives Zentrum bei Vertretern beider Genera innerhalb des NS2-Proteins liegt; diese Protease wird von einer Zink-bindenden Struktur unterstützt, die im Falle der Hepaciviren von NS3, im Falle der Pestiviren von NS2 bereitgestellt wird (siehe Abb. C1). Diese Hypothese ist eine mögliche Erklärung für die Abhängigkeit dieses Prozessierungsschrittes von NS3 bei Hepaciviren, und dessen Unabhängigkeit von NS3 bei Pestiviren.

Vertreter des Genus *Flavivirus*, der dritten Gruppe der Familie *Flaviviridae*, besitzen im Gegensatz zu Pesti- und Hepaciviren nur eine virale Protease; dabei handelt es sich um eine Serinprotease im NS3-Protein, die zusammen mit ihrem Kofaktor NS2B (NS2B-3 Protease) auch für die Spaltung von NS2-3 verantwortlich ist (Abb. C1; (Lindenbach and Rice, 2001)). Dies unterstreicht ein weiteres Mal die engere Verwandtschaft von Pesti- und Hepaciviren innerhalb der Familie *Flaviviridae*.

7.2 Modulation der NS2-3-Spaltungseffizienz

Bisher galt der Grundsatz, dass NS2-3 ausschließlich in cp BVDV-infizierten Zellen gespalten wird (Corapi et al., 1990; Meyers and Thiel, 1996), was nun durch diese Arbeit widerlegt werden konnte. Die Ursache für den zuvor fehlenden Nachweis einer Prozessierung von NS2-3 in noncp BVDV-infizierten Zellen lag offensichtlich im dramatischen Abfall der Spaltungseffizienz schon neun Stunden nach der Infektion. Daher ergibt sich zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion, zu dem in der Regel die Zell-Lyse zur weiteren Untersuchung erfolgte, ein massiver Überschuss an ungespaltenem NS2-3 im Vergleich zu freiem NS3, der dessen Nachweis sehr erschwerte oder gänzlich unmöglich machte.

Die beobachtete Kinetik in der NS2-3 Autoprozessierung könnte unterschiedliche Ursachen haben. So wäre es möglich, dass ein Inhibitor unbekannter Art die Effizienz der NS2-3-Prozessierungsleistung zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion der Zellen reduziert. Dieser Inhibitor könnte ein virales Protein sein, welches im Laufe der Zeit nach der Infektion intrazellulär akkumuliert und dann seine Wirkung ausübt, oder auch ein zelluläres Protein, das verzögert als zelluläre Reaktion auf die Infektion oder auch induziert durch das Virus selbst gebildet wird. Denkbar wäre dagegen auch, dass die effektive Prozessierung zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion durch das Vorhandensein eines essentiellen Kofaktors zustande kommt; dieser Kofaktor könnte beispielsweise durch eine stabile Bindung an sein Substrat (NS2-3) immobilisiert und dadurch „verbraucht“ werden. Infolgedessen verarmen die Zellen nach und nach an diesem Kofaktor, sofern er nicht in ausreichenden Mengen nachgeliefert werden kann, und die Spaltungseffizienz sinkt dementsprechend mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Infektion immer weiter ab. Zu späten Zeiten nach der Infektion könnten dann nur noch NS2-3 Moleküle gespalten werden, die an einen neu

Diskussion

synthetisierten Kofaktor gebunden haben, der überwiegende Teil des viralen NS2-3 bliebe dann jedoch ungespalten. Der beste Kandidat für einen solchen zellulären Kofaktor ist das zelluläre J-Domänen Protein Jiv (siehe Einleitung); von diesem Chaperon ist bekannt, dass es stabil mit NS2 interagiert und die Spaltung von NS2-3 zu induzieren vermag. In frisch infizierten Zellen könnte die vorhandene Menge dieses Proteins die effiziente Spaltung von neu synthetisiertem NS2-3 induzieren, mit Verbrauch dieses „Jiv-Pools“ sänke die Spaltungseffizienz dann unter detektierbare Werte ab. Für diese Vermutung spricht, dass in Rinderzellen wie MDBK nur eine sehr geringe Menge an Jiv-Protein existiert (Rinck et al., 2001). Gemäß diesem Modell würde es sich bei Jiv um einen für noncp BVD-Viren essentiellen zellulären Kofaktor handeln. Ohne Jiv könnte keine NS2-3-Prozessierung und damit auch keine virale RNA-Replikation stattfinden. Die Überprüfung dieser Hypothese ist Gegenstand aktueller Arbeiten (Tautz, persönliche Mitteilung).

Die für den BVDV-Stamm CP7 spezifische Insertion von neun Aminosäuren innerhalb von NS2 wirkt der nahezu vollständigen Herunterregulierung der Aktivität der NS2-Protease entgegen. Aber auch bei diesem Stamm kann eine Abnahme der Prozessierungs-Effizienz im Verlauf einer Infektion beobachtet werden, die allerdings im Vergleich zum noncp Virus deutlich schwächer ausfällt: Während die NS3 Synthese bei letzterem schon zehn Stunden nach der Infektion unter die Nachweisgrenze abfällt, bleibt in CP7-infizierten Zellen auch spät nach der Infektion noch eine Spaltungseffizienz von etwa 67 % erhalten. Dennoch zeigen beide Biotypen zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion ein ähnliches Bild der regulierten Prozessierung mit anfangs nahezu vollständiger Spaltung und Reduktion dieses Wertes im Zeitraum zwischen sechs und neun Stunden nach der Infektion. Der Mechanismus der Aktivitätsregulierung greift also auch in CP7-infizierten Zellen; allerdings bleibt dort ein Basalwert der Spaltung von 67 % erhalten (siehe Abb. C2). Diese Befunde sprechen für eine Überlagerung

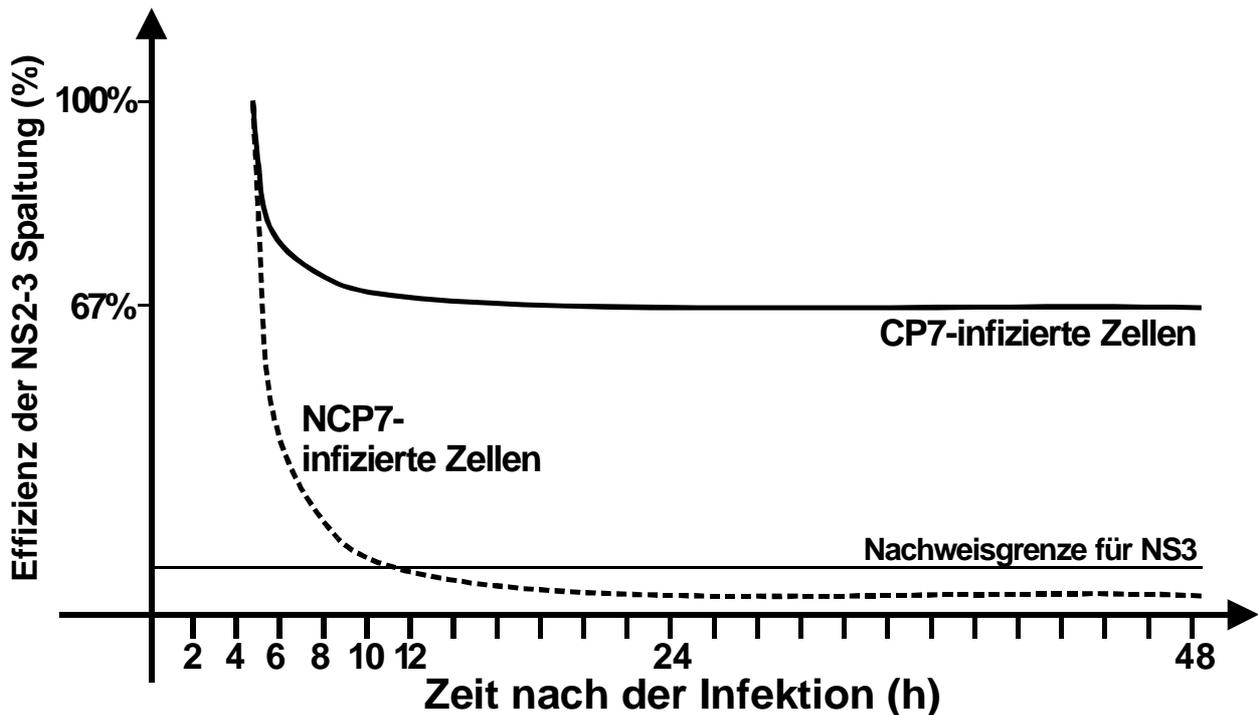


Abbildung C2: Schema der NS2-3-Prozessierungseffizienz in BVDV infizierten Zellen

Eine Regulierung der Prozessierung existiert sowohl in NCP7- als auch in CP7-infizierten Zellen. Während die Effizienz der Spaltung in noncp BVDV-infizierten Zellen schon zehn Stunden nach der Infektion unter die Nachweisgrenze abfällt, bleibt in CP7-infizierten Zellen eine basale Spaltungseffizienz von etwa 67 % erhalten. Mögliche Erklärung hierfür ist ein zweiter, von der Regulierung unabhängiger Spaltungsmechanismus der CP7-NS2-Protease, der auf die neun Aminosäuren große Insertion im NS2 dieses Stammes zurückzuführen ist.

zweier Phänomene in CP7-infizierten Zellen: (1) Eine Regulierung der NS2-3-Prozessierung, wie sie auch bei noncp BVDV vorkommt und (2) einen zweiten, unabhängigen Weg der NS2-3-Spaltung durch die NS2-Protease, der keiner Regulierung unterliegt und eine basale Prozessierungs-Effizienz von etwa 67 % garantiert. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass sich die NS2-Protease von CP7 durch die Insertion im NS2 von einer Regulierung, also von der Abschaltung durch einen Inhibitor oder von der Aktivierung durch die Präsenz eines Kofaktors (s.o.), unabhängig gemacht hat. Hierfür spricht auch der Befund, dass NS2-3 aus einem Polyproteinfragment des CP7 nach transienter Expression in BHK-Zellen (beispielsweise nach der Transfektion des Polyproteinfragmentes E2-NS4A) gespalten wird; dabei liegt die Effizienz der NS2-3-Prozessierung etwa in der Größenordnung, wie sie

Diskussion

zu späteren Zeiten nach der CP7-Infektion in MDBK-Zellen zu beobachten ist. Unter den analogen Bedingungen nach transienter Expression in BHK-Zellen bleibt eine Spaltung des noncp NS2-3 allerdings aus ((Meyers et al., 1996; Tautz et al., 1996) und diese Arbeit). Die Insertion von neun Aminosäuren ermöglicht folglich auch nach transienter Expression in BHK-Zellen eine effektive, aber keine vollständige NS2-3-Spaltung. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, dass BHK-Zellen keine natürlichen Wirtszellen für BVDV darstellen und keine effektive RNA-Replikation von noncp BVDV zulassen, auch wenn Zelllinien selektiert werden können, die eine solche RNA-Replikation auf niedrigem Niveau erlauben. Die fehlende (oder nur unter der Nachweisgrenze stattfindende) NS2-3-Prozessierung in BHK-Zellen nach transienter Expression eines Polyproteinfragmentes könnte daher durch fehlende oder in unzureichenden Mengen vorliegende virale oder zelluläre Kofaktoren oder durch die Präsenz eines Inhibitors begründet sein. Die Aktivierung der NS2-Protease durch die 9-Aminosäuren-Insertion bei CP7 tritt jedoch diesen Befunden und Überlegungen zufolge unabhängig von einem hypothetischen Kofaktor auf, der in BVDV-infizierten MDBK-Zellen vorkommt.

Auch andere cp BVDV-Stämme haben sich durch die Etablierung verschiedener Mechanismen der NS2-3-Spaltung (z.B. Nutzung zellulärer Proteasen durch Insertionen von Ubiquitin oder ähnlichen Proteinen direkt oberhalb von NS3) oder die Aufnahme von Jiv-kodierenden Sequenzen in ihr eigenes Genom von dem postulierten zellulären Kofaktor unabhängig gemacht. Möglicherweise können sie dadurch im infizierten Tier, zusätzliche Zellpopulationen als Wirtszellen erschließen, in denen aufgrund der fehlenden oder mangelhaften Jiv-Expression eine Replikation von noncp BVD-Viren nicht oder nur eingeschränkt möglich ist.

7.3 Effekte der regulierten NS2-3 Autoprozessierung auf den pestiviralen Replikationszyklus

Die Prozessierung des Polyproteins durch virale und zelluläre Proteasen ist der Hauptmechanismus zur Regulation der Replikation von RNA-Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom positiver Polarität (siehe Einleitung). Für Picornaviren und auch für das Alphavirus „Sindbis Virus“ sind zentrale Einflüsse verschiedener Prozessierungen oder zeitlicher Regulierungen einzelner Spaltungsreaktionen auf verschiedene Aspekte des viralen Replikationszyklus beschrieben worden (Griffin, 2001; Lemm et al., 1994; Racaniello, 2001). Die zeitliche Regulierung der NS2-3-Spaltung vor allem in noncp BVDV-infizierten Zellen erlaubt dem Virus eine selektive Expression von NS2-3 oder seiner Spaltprodukte in verschiedenen Stadien der Infektion. Die großen Mengen an freiem NS3, die in cp BVDV-infizierten Zellen im Vergleich mit noncp infizierten Zellen gebildet werden, korrelieren mit einer erhöhten Akkumulation viraler RNA in diesen Zellen (Becher et al., 2001; Mendez et al., 1998; Vassilev and Donis, 2000). Diese Befunde gehen konform mit der Beobachtung in dieser Arbeit, dass die intrazelluläre Konzentration von NS3 streng mit der Effizienz der viralen RNA-Replikation korreliert. Vom Protein NS3, welches Protease-, Helikase- und NTPase-Funktion in sich vereint, ist bekannt, dass es für die Replikation subgenomischer pestiviraler RNAs, die für die Proteine NS3 bis NS5B kodieren, essentiell ist (Behrens et al., 1998). Da diese so genannten Replikons autonom und sehr effizient replizieren können, ist klar, dass weder NS2 noch NS2-3 essentielle Rollen bei der Synthese von plus- oder minus-Strang RNA spielen. Durch diese Arbeit konnte darüber hinausgehend gezeigt werden, dass NS2-3 nicht in der Lage ist, sein Spaltprodukt NS3 als Bestandteil des viralen RNA-Replikationskomplexes funktionell zu ersetzen; eine Replikation der viralen RNA ist also nicht möglich, wenn kein freies NS3 vorhanden ist. Beide Befunde (die Korrelation der NS3-Menge mit der

Diskussion

Effizienz der viralen RNA-Synthese und die fehlende RNA-Replikation bei ausschließlicher Anwesenheit von NS2-3) erlauben die Schlussfolgerungen, dass NS3, nicht jedoch NS2-3, eine essentielle Komponente des viralen RNA-Replikationskomplexes ist und dass die NS2-Protease, die dessen Freisetzung katalysiert, darüber die virale RNA-Replikation kontrolliert.

Während der BVDV-Stamm CP7 sein NS3 durch die Spaltung von NS2-3 generiert, exprimieren die überwiegende Mehrzahl der cp BVDV-Stämme ihr NS3 mittels einer duplizierten viralen Genomregion (siehe Einleitung). In den entsprechenden Polyproteinen dieser Stämme finden sich oft zelluläre Sequenzen, wie Ubiquitin oder ähnliche Proteine, direkt oberhalb von NS3 (direkt vor AS 1590 nach SD-1 Nummerierung), die ein zusätzliches Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen in das Polyprotein einführen, welches zur Generierung des N-Terminus von NS3 führt. Bislang ist unbekannt, ob solche cp BVD-Viren außerdem auch noch von einer funktionierenden NS2-Protease abhängig sind; dies soll in weiteren Arbeiten abgeklärt werden. Auch wenn es unterschiedliche Wege zur Bildung von NS3 in großen Mengen gibt, nach einer Infektion von Zellen mit solchen Virusstämmen korreliert das Auftreten hoher NS3 Mengen stets mit einer gesteigerten viralen RNA-Synthese und der Induktion der Apoptose der infizierten Zellen. Die effektive und zeitlich unbegrenzte Produktion von NS3 korreliert folglich generell mit gesteigerter viraler RNA-Synthese und dem zytopathogenen Biotyp des jeweiligen BVDV-Stammes. Dies geht auch konform mit dem Befund aus dieser Arbeit, dass die Konzentration von NS3 die RNA-Replikation von noncp BVDV limitiert, was vermutlich entscheidend für dessen Biotyp ist. Eine Korrelation zwischen einer gesteigerten viralen RNA-Synthese und der viralen Zytopathogenität wurde auch schon für das Hepatitis-A-Virus (HAV) aus der Familie *Picornaviridae* (Gosert et al., 2000; Zhang et al., 1995) und für das Alphavirus Sindbis Virus (Agapov et al., 1998; Dryga et al., 1997; Frolov et al., 1999) beschrieben. Bei beiden Viren handelt

Diskussion

es sich ebenfalls um Vertreter der plus-Strang-RNA-Viren.

Bei allen natürlich vorkommenden BVD-Viren konnte eine gesteigerte RNA-Synthese ausschließlich bei cp Stämmen beobachtet werden. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang aber ein noncp BVD-Virus, das aus einem zytopathogenen Virus in Zellkultur unter Selektionsdruck entstanden ist. Dieses Virus zeigt nämlich, wie das cp BVD-Virus aus dem es hervorgegangen ist, eine unverändert hohe Synthese von NS3 und auch eine gesteigerte Syntheserate viraler RNA (Qu et al., 2001). Bei der Sequenzierung dieses Virus konnten keine Veränderungen im NS3, jedoch eine Aminosäure-Substitution im Bereich von NS4B (Y2441C) gefunden werden. Die Substitution dieser stark konservierten Aminosäure erwies sich als ausreichend, um einen nicht zytopathogenen Biotyp auf Basis des sonst unveränderten cp BVDV NADL zu erhalten. Auch bei diesem Stamm existiert der direkte Zusammenhang zwischen NS3-Menge und der Effizienz der viralen RNA-Synthese. Allerdings ist die bei den natürlich auftretenden Viren mit diesen beiden Eigenschaften normalerweise einhergehende Zytopathogenität durch die Punktmutation im NS4B auf unbekannte Weise unterdrückt. Diese Befunde zeigen, dass der Mechanismus der pestiviralen Zytopathogenität komplex ist und gegenwärtig nicht zwingend durch eine toxische Wirkung von NS3 oder die erhöhte Akkumulation viraler RNA begründet werden kann.

Unter Berücksichtigung des viralen „Lebenszyklus“ erscheint eine effektive Prozessierung von NS2-3 mit Freisetzung von NS3 zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion für das Virus sehr günstig, denn in diesem Zeitfenster steht die Replikation der viralen RNA im Vordergrund und hierzu ist NS3 zwingend erforderlich. Etwa acht bis zehn Stunden nach der Infektion beginnt dann die Bildung infektiöser Virionen, ein Vorgang, für welchen ungespaltenes NS2-3 benötigt wird (Agapov et al., 2004). Genau in diesem Zeitraum fällt auch die Effizienz der NS2-3-Spaltung in noncp BVDV-infizierten Zellen dramatisch

Diskussion

ab, was zur Bereitstellung des benötigten NS2-3 führt. Die zeitlich regulierte Aktivität der NS2-Protease scheint für das Umschalten zwischen der frühen Phase der RNA-Replikation und der darauf folgenden Phase der Bildung von Virionen entscheidend zu sein.

7.4 NS2-3-Spaltung und Virulenz von BVDV

BVDV ist ein Modellsystem zur Untersuchung persistenter Infektionen bei Mensch und Tier. noncp BVDV-Stämme fallen durch eine weltweit sehr hohe Prävalenz bei Rindern auf und persistieren in einem geringen Prozentsatz aller Rinder, auch in Deutschland; diese Persistenz geht mit einer ständigen massiven Ausscheidung infektiöser Virionen einher. Somit sind solche persistent infizierten Tiere die herausragende Erregerquelle für horizontale Infektionen und damit auch Teil der „Überlebensstrategie“ des Virus. Ganz im Gegensatz hierzu sind cp BVDV Isolate nicht in der Lage, persistente

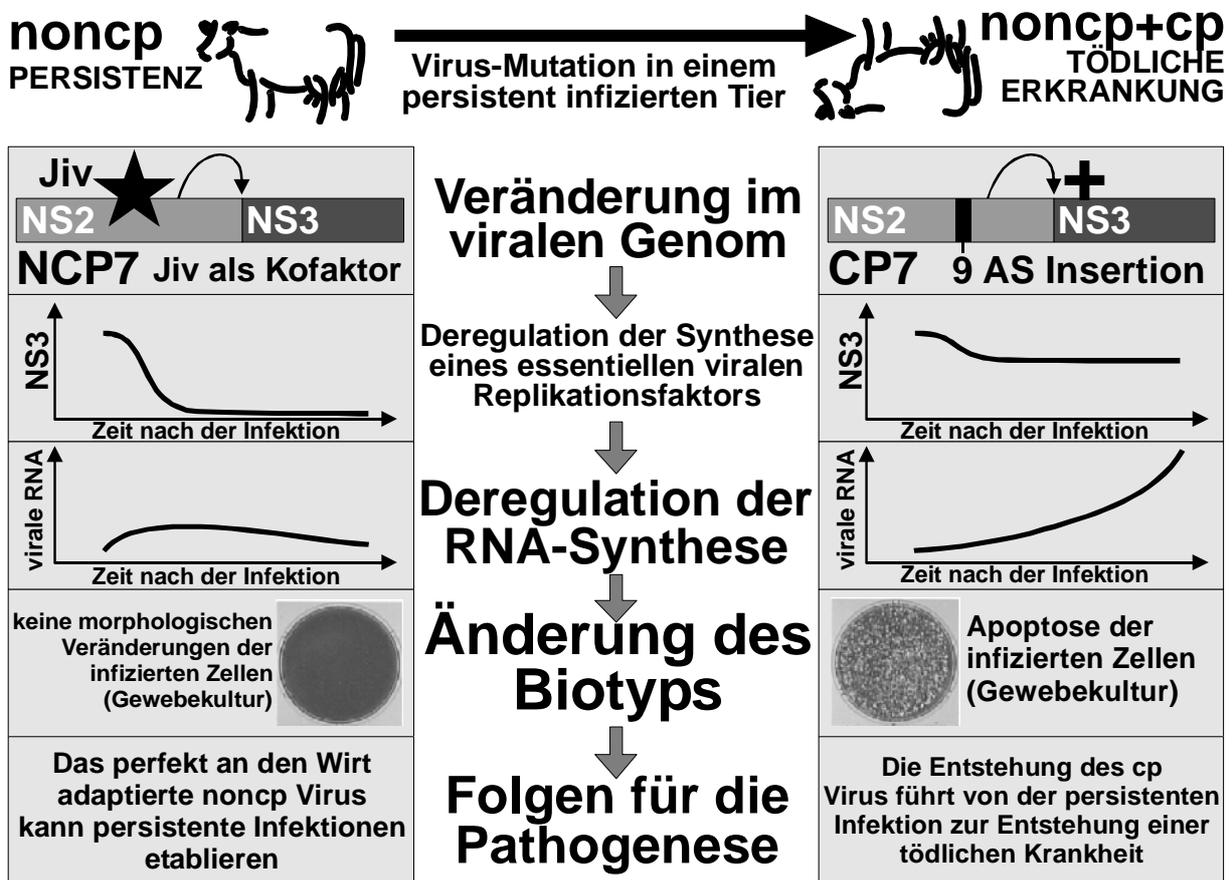


Abbildung C3: Von der Veränderung im Virusgenom zur tödlichen Krankheit
 Noncp BVDV-Stämme bilden nur zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion NS3 (aus Spaltung von NS2-3 durch die NS2-Protease) und akkumulieren deshalb kaum virale RNA in den Zellen; diese beiden Eigenschaften korrelieren mit dem nichtzytopathogenen Biotyp. Solche Viren können persistente Infektionen auslösen und töten das Tier nicht. Im Falle des untersuchten cp BVDV-Stammes CP7 verhindert eine 9 AS große Insertion im NS2 das Abschalten der NS2-Protease: durch diese Insertion wird das Enzym unabhängig vom intrazellulär limitierten Kofaktor Jiv. In infizierten Zellen wird daher stetig NS3 gebildet und die virale RNA häuft sich intrazellulär stark an. Dies geht einher mit der Induktion der Apoptose der infizierten Zellen. Es entsteht die Krankheit MD, die stets tödlich endet.

Diskussion

Infektionen auszulösen. Horizontale Übertragungen von cp BVDV führen in gesunden Tieren nur zu transienten Infektionen, die rasch eliminiert werden. Die Entstehung eines zytopathogenen Virus (wie z.B. das in dieser Arbeit verwendete Isolat CP7) in einem Tier aus dem persistierenden nicht zytopathogenen Vorläufer (hier: NCP7) führt zum Ausbruch einer stets tödlich verlaufenden Krankheit, der Mucosal Disease (MD). Der virale Biotyp ist folglich eine entscheidende Determinante für den Verlauf der Infektion und die Verbreitung des Virus innerhalb der Wirtspopulation. In diesem Kontext legen die Daten aus der vorliegenden Arbeit nahe, dass die Regulierung der Aktivität der viralen Autoprotease im NS2 für die Anpassung des Virus an seinen Wirt eine entscheidende Rolle spielt: Eine Deregulierung des Enzyms, wie hier für CP7 gezeigt, korreliert mit der Zytopathogenität des Virus und der Entstehung einer tödlichen Erkrankung im persistent infizierten Tier (Abb. C3).

Die dargelegten Ergebnisse der Untersuchungen leisten daher einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Grundlagen von Viruspersistenz und der Entwicklung einer tödlichen Erkrankung.

7.5 Wirkung des zellulären Proteins Jiv auf die NS2-3-Spaltung

Zu Beginn der Erstellung dieser Arbeit war bereits bekannt, dass ein zelluläres Protein an das NS2 der Pestiviren binden kann und die NS2-3-Spaltung induziert (Rinck et al., 2001). Da das betreffende Protein zur Familie der J-Domänen Chaperone gehört und an ein virales Protein bindet, wurde es „Jiv“ genannt (J-domain protein interacting with viral protein). Ein 90 Aminosäuren langes Peptid aus der C-terminalen Region von Jiv erwies sich als ausreichend zur NS2-Bindung und NS2-3-Spaltungsinduktion und erhielt daher die Bezeichnung Jiv90. Unklar war jedoch, wie Jiv oder Jiv90 an NS2 binden und die Prozessierung von NS2-3 auslöst.

Generell waren zwei mögliche Szenarien vorstellbar, wie Jiv die Spaltung von NS2-3 bewirken kann: (1) Jiv hat selbst die Eigenschaft einer Protease und führt zur Spaltung von NS2-3, oder (2) Jiv überführt die Autoprotease im NS2 in eine aktive Konformation, wirkt also als Kofaktor einer viralen Protease. Die erste Möglichkeit erschien von Beginn an eher unwahrscheinlich, da Jiv90 mit einer Länge von nur 90 Aminosäuren die kürzeste je beschriebene trans-aktive Protease wäre und bislang auch keine für eine Protease charakteristischen Motive in der Jiv-Sequenz gefunden werden konnten. Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben zudem, dass etwa ein 1,5:1 Verhältnis von Jiv zu NS2-3 benötigt wird, um optimale Spaltungseffizienzen zu erreichen; somit wird Jiv nicht in katalytischen, sondern in stöchiometrischen Mengen benötigt; auch dies spricht gegen eine Aktivität als Enzym.

Um zu zeigen, dass es sich bei Jiv90 tatsächlich um einen Kofaktor der NS2-Protease und nicht selbst um eine Protease handelt, wurde in dieser Arbeit ein Alanin-Scan in allen zur NS2-3-Spaltungsinduktion relevanten Bereichen von Jiv90 durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es, die zur NS2-3-Spaltungsinduktion entscheidenden Aminosäuren innerhalb von Jiv90

Diskussion

zu identifizieren. Die Untersuchung zeigte, dass nur die Identität einer einzigen Aminosäure von Jiv90 zur Induktion der NS2-3-Spaltung essentiell ist. Hierbei handelt es sich um ein Tryptophan an Position 39; alle anderen Aminosäuren von Jiv90 konnten unter Erhalt der NS2-3-Spaltung entweder deletiert oder durch Alanin ersetzt werden. Tryptophan ist als katalytische Aminosäure von Proteasen bislang nie beschrieben worden (siehe Einleitung). Daher kann als gesichert angesehen werden, dass Jiv90 keine proteolytische Aktivität besitzt. Dieser Befund stützt im Besonderen die bisherige Hypothese von der Kofaktorfunktion des Jiv90 und steht damit im Einklang mit den restlichen in dieser Arbeit erhaltenen Daten.

Um einen genaueren Einblick in die Funktionsweise des Kofaktors Jiv zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das minimale Jiv90-Fragment bestimmt, das die Spaltung von pestiviralem NS2-3 zu induzieren vermag. Es stellte sich heraus, dass 10 Aminosäuren N-terminal und 5 Aminosäuren C-terminal vom Jiv90 deletiert werden können, ohne die Fähigkeit zur NS2-3-Spaltungsinduktion zu verlieren. Allerdings nahm die Effizienz der NS2-3-Prozessierung deutlich ab, wenn Aminosäuren des Jiv90 deletiert oder Veränderungen am N-terminal gelegenen Zink-Bindemotiv vorgenommen wurden. Daher lässt sich schlussfolgern, dass nur ein vollständiges Jiv90 mit intakter Zinkbindestruktur die optimale Prozessierungsleistung von NS2-3 auslösen kann. Dies erklärt, warum cp BVDV-Stämme mit Jiv-Insertionen stets Jiv-Proteinabschnitte in ihrem Polyprotein enthalten, die mindestens diese 90 Aminosäuren umfassen (siehe auch Abb. A7).

Im Gegensatz zur NS2-3-Spaltungsinduktion, genügen zur Bindung an NS2 lediglich 20 Aminosäuren von Jiv90 (Aminosäuren 41 bis 60). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid aus 20 Aminosäuren mit zwei separaten Bindungsstellen innerhalb von BVDV NS2 wechselwirken kann. Die N-terminale Bindungsstelle liegt zwischen den Aminosäuren 1470 und 1515 und damit genau im aktiven Zentrum der NS2-Autoprotease (katalytisches

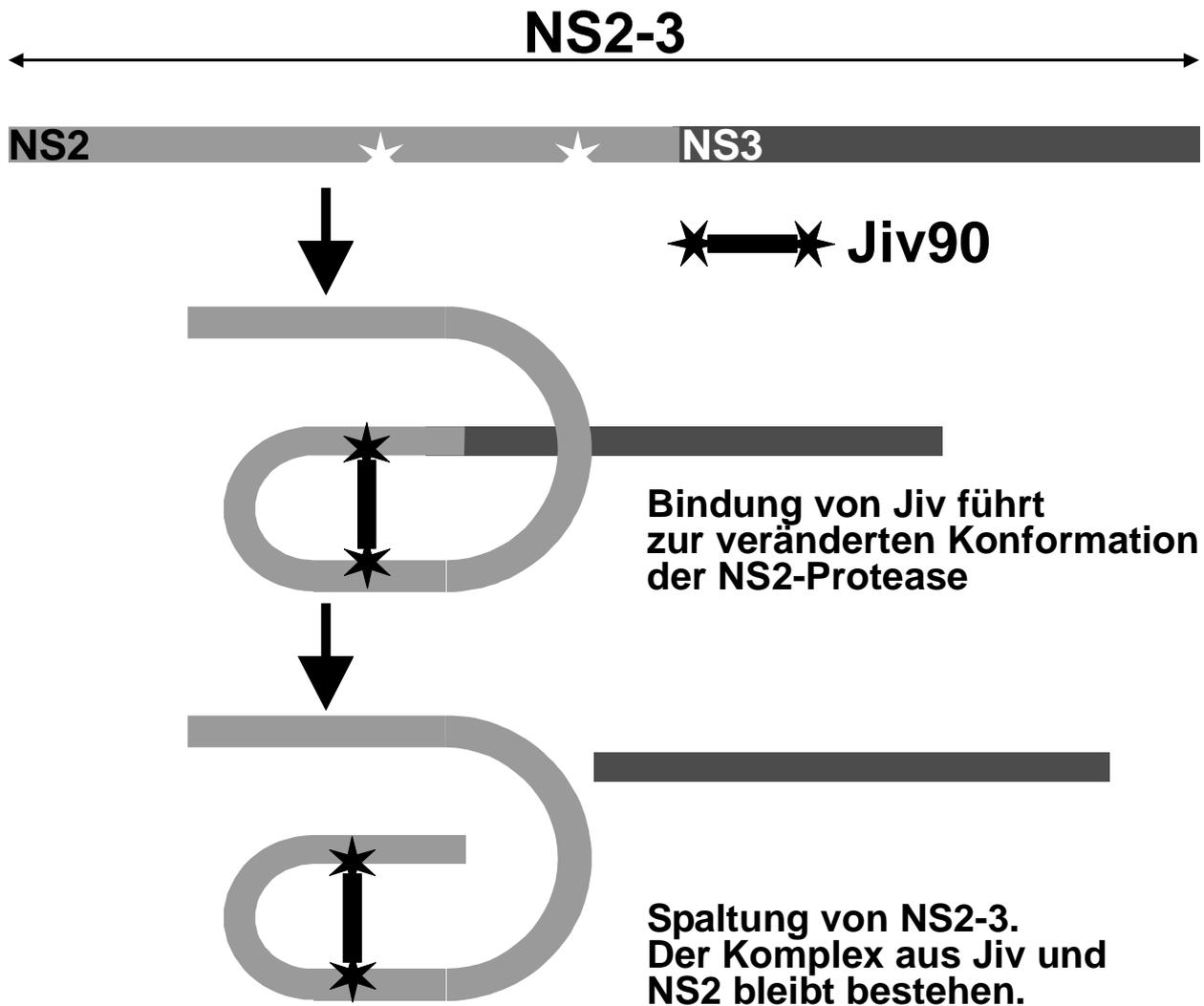


Abbildung C4: Modell der Wirkungsweise von Jiv zur Induktion der NS2-3-Spaltung
 Durch Interaktion mit beiden Bindungsstellen im NS2 kommt es zur Umfaltung und Aktivierung der NS2-Protease. Auch nach der Abspaltung von NS3 bleibt der Komplex aus Jiv und NS2 bestehen, was zu einem Entzug des zellulären Jivs aus dem Reaktionskreislauf führt.

Cystein: C₁₅₁₂). Die C-terminale Bindungsstelle befindet sich im Bereich der Aminosäuren 1540-1560 und damit nicht weit entfernt von der NS2-3-Spaltstelle (zwischen den Aminosäuren 1589 und 1590). Es ist davon auszugehen, dass zelluläres Jiv, wie auch Jiv90, mit diesen beiden Bindungsstellen des NS2 interagiert und hierdurch eine Konformationsänderung der NS2-Protease hervorruft. Dem gegenwärtigen Arbeitsmodell nach führt diese Änderung in der Konformation erst zur Aktivierung der Protease und damit zur Spaltung von NS2-3 (Abb. C4).

Diskussion

Die Kopräzipitationsdaten zeigte, dass die Bindung von Jiv an NS2 stabil ist. Daher ist davon auszugehen, dass der Komplex aus Jiv und der NS2-Protease auch nach der NS2-3-Spaltung bestehen bleibt. Das zelluläre, nur limitiert vorkommende, Jiv könnte dadurch immobilisiert werden. Nach einmaliger Bindung an NS2 und Induktion einer NS2-3-Spaltung stünde ein Jiv-Molekül für weitere Bindungen an NS2 dann nicht mehr zur Verfügung, würde also dem Reaktionskreislauf entzogen werden. Wäre dem nicht so, so müsste man trotz der äußerst geringen zellulären Jiv-Spiegel eine zeitlich und mengenmäßig unbegrenzte NS2-3-Prozessierung in noncp BVDV-infizierten Zellen beobachten können. Stattdessen ist dieser Prozessierungsschritt in noncp BVDV-infizierten Zellen auf die ersten Stunden nach der Infektion beschränkt, und die insgesamt in diesen Zellen entstehenden Mengen an NS3 sind begrenzt. Diese Befunde passen in das oben erwähnte Bild von Jiv, das als Kofaktor der viralen Protease nur einmal wirken kann und dann für weitere Reaktionen nicht mehr zur Verfügung steht.

Werden die bereits diskutierten Befunde dieser Arbeit in die Betrachtung mit einbezogen, so erscheint es aus der Sicht des Virus vorteilhaft, sich von einem solchen Faktor abhängig zu machen, der nur in begrenzten Mengen in den Zellen vorkommt und nach einmaliger Aktion verbraucht wird: Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die NS2-Protease, als deren Kofaktor er dient nur zeitlich limitiert aktiv ist. Durch Limitierung der Anzahl aktiver Proteasemoleküle wird die NS3-Synthese und damit indirekt die RNA-Replikation gedrosselt; dies korreliert mit dem nichtzytopathogenen Biotyp des Virus. Letzterer ist eine essentielle Voraussetzung zur Etablierung persistenter Infektionen, die für die Verbreitung des Virus die entscheidende Rolle spielen. Eine schematische Darstellung des Arbeitsmodells zeigt die Abb. C5.

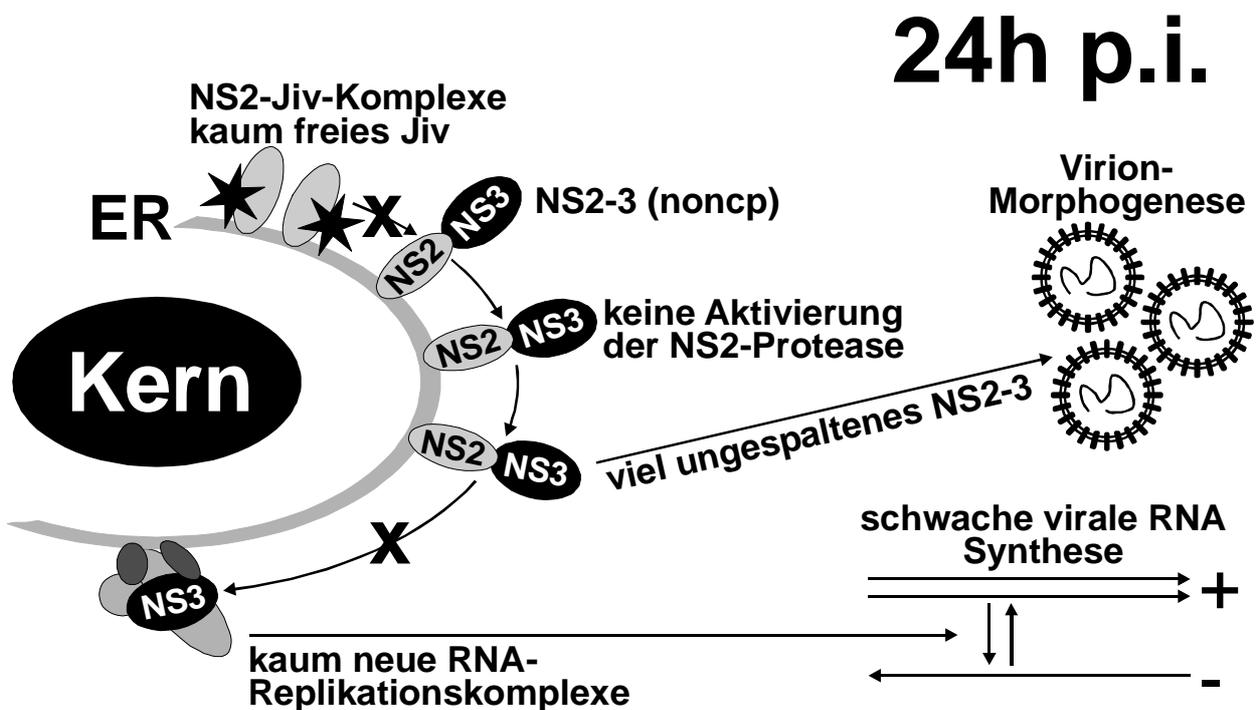
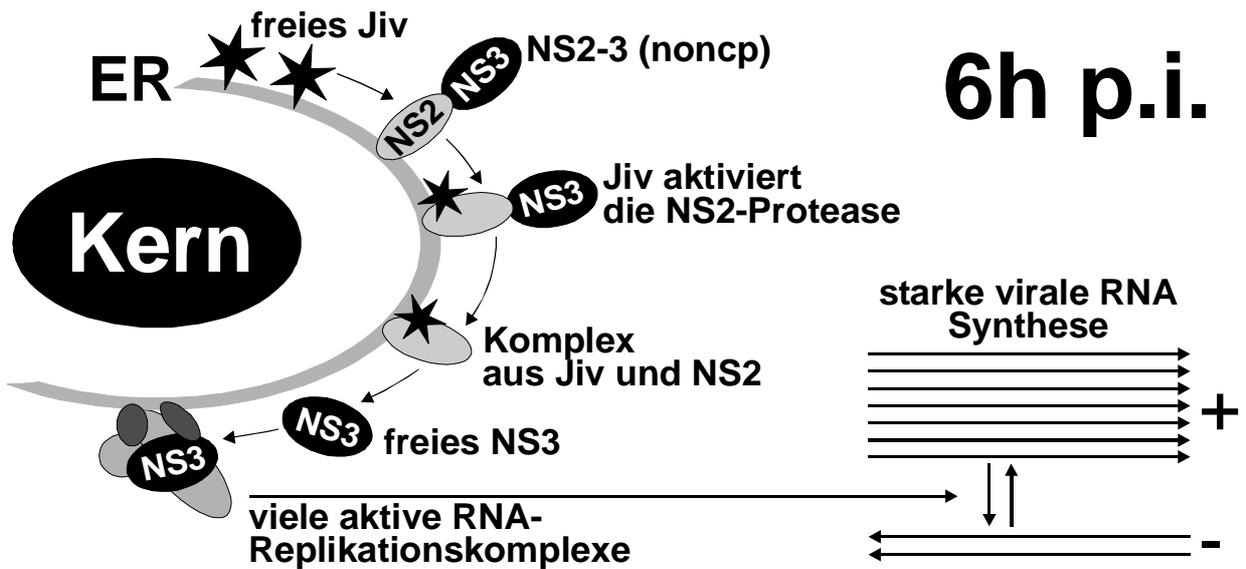


Abbildung C5: Modell zur zeitlichen Regulierung der NS2-3-Spaltung durch Jiv in noncp BVDV-infizierten Zellen

Zu frühen Zeitpunkten nach Infektion einer Zelle mit noncp BVDV (oben) kann zelluläres Jiv die NS2-Protease aktivieren und zur Freisetzung von NS3 führen. NS3 formt zusammen mit NS4A, NS4B, NS5A und NS5B die aktiven RNA-Replikationskomplexe, welche die virale RNA stark vermehren. NS2 bleibt auch nach der NS2-3-Spaltung an Jiv gebunden. Jiv kann daher nicht ein weiteres Mal in Aktion treten, somit unterbleibt zu späten Zeitpunkten nach Infektion (unten) die NS2-3-Prozessierung. NS2-3 kann nicht zur Bildung aktiver RNA-Replikationskomplexe beitragen. Auf diese Weise wird die RNA-Replikation begrenzt und NS2-3 steht für die Bildung infektiöser Virionen zur Verfügung.

7.6 Mechanismen der NS3-Entstehung

In persistent mit noncp BVDV-infizierten Tieren entstehen durch Punktmutationen oder RNA-Rekombination zytopathogene Virusvarianten, deren Auftreten zum Ausbruch der stets letalen Mucosal Disease führt. Alle cp BVD-Viren unterscheiden sich von den noncp Vorläufern durch eine starke und zeitlich nicht begrenzte Expression von NS3. Genetische Grundlage der NS3-Synthese sind verschiedenste Veränderungen im viralen Genom (siehe Einleitung).

Zu Beginn dieser Arbeit war der Mechanismus der NS3-Entstehung nur für einen Teil der cp BVD-Virusisolate bekannt, bei anderen noch ungeklärt. Diese Arbeit hat zur Aufklärung dieser unbekanntenen Mechanismen der NS3-Synthese beigetragen. So ist es nun möglich, auf der Grundlage des Mechanismus der NS3-Generierung eine Klassifizierung für cp BVDV einzuführen in Stämme, die:

1. NS3 durch Veränderungen im Polyprotein direkt oberhalb des NS3 bilden
 - a. über die Prozessierung durch zelluläre Proteasen anhand eines eingefügten Prozessierungssignals
 - b. über die Prozessierung durch relokalisiertes virales N^{pro}
2. NS2-3 durch die NS2-Protease spalten
 - a. über eine Aktivierung der NS2-Protease durch Insertion viraler Sequenzen oder Punktmutationen
 - b. über eine Aktivierung der NS2-Protease durch Jiv

Zur Gruppe 1a gehören cp BVDV-Stämme, die in ihr Genom Sequenzen aufgenommen haben, die für Ubiquitin oder verwandte Proteine kodieren (z.B. Osloss, CP14 oder CP1; siehe Einleitung). Die Veränderungen im viralen Genom führen zu einem zusätzlichen Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen im Polyprotein direkt oberhalb von NS3. Zelleigene Proteasen sind in diesem Fall für die NS3-Generierung verantwortlich.

Diskussion

Zur Gruppe 1b zählen Stämme, bei denen durch Duplikation (z.B. Pe515CP) oder Deletion (z.B. CP9) die virale Autoprotease N^{pro} im Polyprotein direkt oberhalb von NS3 liegt; in diesem Fall ist die virale Protease N^{pro} für die Freisetzung des NS3 verantwortlich.

Mitglieder der Gruppe 2a tragen Punktmutationen (Stamm Oregon) oder kurze Duplikationen viraler Sequenzen (Stamm CP7) in der NS2-kodierenden Region; die daraus resultierenden Veränderungen am NS2-Protein führen zur Aktivierung der NS2-Autoprotease, die dann die NS2-3-Spaltung katalysiert. Der Mechanismus der Aktivierung der Protease durch Punktmutationen oder Insertion ist noch nicht hinreichend geklärt; Ergebnisse aus dieser Arbeit sprechen jedoch dafür, dass die NS2-Protease durch diese Veränderungen von ihrem zellulären Kofaktor Jiv unabhängig wird.

Die Gruppe 2b schließlich bilden cp BVDV-Stämme, die einen zur NS2-3-Spaltungsinduktion essentiellen Teil des Kofaktors Jiv in ihr eigenes Genom aufgenommen haben (z.B. NADL, CP8). Diese Viren umgehen damit die limitierten intrazellulären Mengen dieses Proteins. Der Kofaktor Jiv führt wahrscheinlich über eine Umfaltung der NS2-Protease zu deren Aktivierung. Damit ist in diesem Fall die Autoprotease im NS2 das für die NS2-3-Spaltung verantwortliche Enzym.

7.7 Ausblick

Aktuelle und zukünftige Arbeiten befassen sich mit dem Einfluss des intrazellulären Jiv-Spiegels auf die Replikation von BVDV; so soll geklärt werden, ob es sich bei Jiv tatsächlich um einen essentiellen Wirtsfaktor handelt, ohne den in noncp BVDV-infizierten Zellen keine Prozessierung von NS2-3 und damit keine virale RNA-Replikation möglich ist. Jiv-freie Zellen wären in diesem Fall resistent gegenüber noncp BVDV-Infektionen. Ziel zukünftiger Arbeiten ist es auch, mehr über die zellulären Aufgaben des Jiv-Proteins zu erfahren; im Rahmen einer Untersuchung sollen hierzu zelluläre Interaktionspartner von Jiv identifiziert werden. Einen wichtigen Aspekt für weitere Studien bildet auch die Rolle von Jiv bei anderen Viren. So wäre es denkbar, dass verwandte virale Proteasen einen ähnlichen Regulationsmechanismus aufweisen und Jiv hierbei wieder eine wichtige Funktion übernimmt. Zu nennen sind hier vor allem die verwandte NS2-3-Protease von HCV (Familie *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus*) und die 2A-Protease von Poliovirus (Familie *Picornaviridae*, Genus *Enterovirus*).

Ungeachtet zukünftiger Ergebnisse bleibt der Befund dieser Arbeit, dass ein zelluläres Protein als Kofaktor einer viralen Proteasen fungiert und hierüber die Replikation der viralen RNA steuert, bislang einzigartig in der Virologie.

8 Summary

Noncytopathogenic (noncp) strains of the pestivirus bovine viral diarrhea virus (BVDV) can establish persistent infections. In persistently infected animals, mutations in viral non-structural protein 2 (NS2) can result in cytopathogenic (cp) BVDV variants which lead to onset of lethal disease. A hallmark of cp BVDV is high-level expression of the NS3-Protease/helicase which is, together with NS2, derived from NS2-3.

In this work evidence for NS2-3 autoprocessing by a cysteine protease in NS2 is presented. This NS2-Protease is distantly related to the NS2-3 autoprotease of hepatitis C viruses and GB viruses. The vital role of the autoprotease, also for noncp BVDV, suggested an essential function of free NS3 in pestiviral RNA replication. Accordingly, contrary to a paradigm, cleavage of NS2-3 was detected in noncp BVDV infected cells. At 6-9 h post infection NS2-3 autoprocessing diminished from almost complete to barely detectable for noncp BVDV but decreased only moderately for cp BVDV. Viral RNA synthesis rates strictly correlated with different NS3 levels in noncp and cp BVDV-infected cells, implicating the NS2 autoprotease in RNA replication control. The phenotype specific regulation indicates a crucial role of the autoprotease in pathogenicity of BVDV.

A cellular J-domain-protein (Jiv) was previously shown to interact with NS2 and to stimulate NS2-3 cleavage (Rinck et al., 2001); the second part of this work deals with investigations on the molecular details of this phenomenon. According to the obtained results, a 20 amino acids (aa) Jiv-derived peptide interacts with two distinct binding sites within NS2. The identity of only one amino acid residue of this Jiv is essential for cleavage induction. Accordingly, Jiv does not represent an enzyme but rather a cofactor of the NS2-Protease, which induces an allosteric activation of the enzyme.

9 Literaturverzeichnis

- Agapov, E.V., Frolov, I., Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., Schlesinger, S. and Rice, C.M. (1998) Noncytopathic sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 12989-12994.
- Agapov, E.V., Frolov, I., Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., Schlesinger, S. and Rice, C.M. (2004) Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, **78**, 2414-2425.
- Agashe, V.R. and Hartl, F.-U. (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Cell & Developmental Biology*, **11**, 15-25.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J. and Becher, P. (2001) Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, **286**, 456-465.
- Baker, J.A., York, C.J., Gillespie, J.H. and Mitchell, G.B. (1954) Virus diarrhea in cattle. *Am.J. Vet. Res.*, **15**, 525-553.
- Baker, J.C. (1987) Bovine viral diarrhea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **190**, 1449-1458.
- Baker, R.T., Tobias, J.W. and Varshavsky, A. (1992) Ubiquitin-specific protease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **267**, 23364-23375.
- Baroth, M., Orlich, M., Thiel, H.-J. and Becher, P. (2000) Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology*, **278**, 456-466.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Yasargil, K., Mous, J. and Jacobsen, H. (1995) Substrate determinants for cleavage in cis and in trans by hepatitis C virus NS3 proteinase. *J Virol*, **69**, 198-205.
- Bazan, J.F. and Fletterick, R.J. (1989) Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*, **171**, 637-639.
- 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., König, M. and Thiel, H.-J. (1999) Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J Virol*, **73**, 5646-5653.
- 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. (1998) Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol*, **72**, 5165-5173.
- Becher, P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (2000) Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus result in altered growth characteristics. *J Virol*, **74**, 7884-7894.
- Becher, P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (2001) RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol*, **75**, 6256-6264.
- Becher, P., Shannon, A.D., Tautz, N. and Thiel, H.-J. (1994) Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, **198**, 542-551.

Literaturverzeichnis

- Becher, P., Thiel, H.-J., Collins, M., Brownlie, J. and Orlich, M. (2002) Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric Acid (a) receptor-associated protein and Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. *J Virol*, **76**, 13069-13076.
- 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.
- Behrens, S.-E., Tomei, L. and de Francesco, R. (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*, **15**, 12-22.
- Bermak, J.C., Li, M., Bullock, C. and Zhou, Q.Y. (2001) Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol*, **3**, 492-498.
- Bielefeldt Ohmann, H. (1988) *Acta Vet. Scand.*, 77-84.
- Bielefeldt Ohmann, H. (1988) *Vet. Pathol.*, 304-309.
- Bielefeldt Ohmann, H., Ronsholt, L. and Bloch, B. (1987) Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J Gen Virol*, **68 (Pt 7)**, 1971-1982.
- Birghan, C., Mundt, E. and Gorbalenya, A.E. (2000) A non-canonical Ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J*, **19**, 114-123.
- Birboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Cutlip, R.C. and Coria, M.F. (1985) Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res*, **46**, 573-576.
- Bolin, S.R., Moennig, V., Kelso Gourley, N.E. and Ridpath, J. (1988) Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. *Arch Virol*, **99**, 117-123.
- Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J. (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec*, **114**, 535-536.
- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A. and Anderson, N. (1998) Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest*, **10**, 27-35.
- Carrasco, L. (1995) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv Virus Res*, **45**, 61-112.
- Cheetham, M.E. and Caplan, A.J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell stress & Chaperones*, **3**, 28-36.
- Chen, J., Huang, Y., Wu, H., Ni, X., Cheng, H., Fan, J., Gu, S., Gu, X., Cao, G., Ying, K., Mao, Y., Lu, Y. and Xie, Y. (2003) Molecular cloning and characterization of a novel human J-domain protein gene (HDJ3) from the fetal brain. *J Hum Genet*, **48**, 217-221.
- Chon, S.K., Perez, D.R. and Donis, R.O. (1998) Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhea virus. *Virology*, **251**, 370-382.
- Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S. and Retzel, E. (1988) Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: The genome organization of a pestivirus. *Virology*, **165**, 200-208.

Literaturverzeichnis

- Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K. and Purchio, A.F. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **165**, 191-199.
- Collett, M.S., Wiskerchen, M.A., Welniak, E. and Belzer, S.K. (1991) Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch Virol*, **Suppl. 3**, 19-27.
- Corapi, W.V., Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1988) Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea infections. *J Virol*, **62**, 2823-2827.
- Corapi, W.V., Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1990) Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*, **51**, 1388-1394.
- Corapi, W.V., Elliott, R.D., French, T.W. and Dubovi, E.J. (1990) Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc*, **196**, 590-596.
- Corapi, W.V., French, T.W. and Dubovi, E.J. (1989) Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, **63**, 3934-3943.
- Darbyshire, J.A. (1960) *Vet. Rec.*, 331.
- De Francesco, R., Urbani, A., Nardi, M.C., Tomei, L., Steinkuhler, C. and Tramontano, A. (1996) A zinc binding site in viral serine proteinases. *Biochemistry*, **35**, 13282-13287.
- de Moerlooze, L., Desport, M., Renard, A., Lecomte, C., Brownlie, J. and Martial, J.A. (1990) The coding region for the 54-kDa protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "zinc finger-like" domain. *Virology*, **177**, 812-815.
- de Moerlooze, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberghe, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., Renard, A. and Martial, J.A. (1993) Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J Gen Virol*, **74**, 1433-1438.
- Deng, R. and Brock, K.V. (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology*, **191**, 867-879.
- Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1987) Characterization of bovine diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J Gen Virol*, **68**, 1597-1605.
- Dryga, S.A., Dryga, O.A. and Schlesinger, S. (1997) Identification of mutations in a Sindbis virus variant able to establish persistent infection in BHK cells: the importance of a mutation in the nsP2 gene. *Virology*, **228**, 74-83.
- Duff, K.C. and Ashley, R.H. (1992) The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers. *Virology*, **190**, 485-489.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Rumenapf, T. and Thiel, H.-J. (1996) Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7. *J Virol*, **70**, 4131-4135.
- Failla, C., Tomei, L. and de Francesco, R. (1994) Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*, **68**, 3753-3760.
- Finley, D., Bartel, B. and Varshavsky, A. (1989) The tails of ubiquitin precursors are

Literaturverzeichnis

- ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, **338**, 394-401.
- Finley, D., Özkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell*, **48**, 1035-1046.
- Fritzemeier, J., Greiser-Wilke, I., Haas, L., Pituco, E., Moennig, V. and Liess, B. (1995) Experimentally induced "late-onset" mucosal disease - characterization of the cytopathogenic viruses isolated. *Veterinary Microbiology*, **46**, 285-294.
- Frolov, I., Agapov, E., Hoffman, T.A., Jr., Pragai, B.M., Lippa, M., Schlesinger, S. and Rice, C.M. (1999) Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J Virol*, **73**, 3854-3865.
- Frolov, I., McBride, M.S. and Rice, C.M. (1998) cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *Rna*, **4**, 1418-1435.
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Koonin, E.V. and Blinov, V.M. (1989) N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3889-3897.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res*, **17**, 4713-4729.
- Gorbalenya, A.E. and Snijder, E.J. (1996) Viral Cysteine Proteinases. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 64-86.
- Gosert, R., Egger, D. and Bienz, K. (2000) A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology*, **266**, 157-169.
- Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M. and Rice, C. (1993) A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 10583-10587.
- Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowsky, C., Feinstone, S. and Rice, C. (1993) Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: Determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol*, **67**, 2832-2843.
- Grassmann, C.W., Isken, O. and Behrens, S.E. (1999) Assignment of the Multifunctional NS3 Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus during RNA Replication: an In Vivo and In Vitro Study. *J Virol*, **73**, 9196-9205.
- Grassmann, C.W., Isken, O., Tautz, N. and Behrens, S.E. (2001) Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol*, **75**, 7791-7802.
- Gray, E.W. and Nettleton, P.F. (1987) The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J Gen Virol*, **68 (Pt 9)**, 2339-2346.
- Griffin, D.E. (2001) Alphaviruses. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, New York, Vol. 1, pp. 917-962.
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P. and Rowlands, D.J. (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, **535**, 34-38.
- Gu, B., Liu, C., Lin-Goerke, J., Maley, D.R., Gutshall, L.L., Feltenberger, C.A. and Del Vecchio, A.M. (2000) The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of

Literaturverzeichnis

- the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J Virol*, **74**, 1794-1800.
- Hahn, C.S. and Strauss, J.H. (1990) Site-directed mutagenesis of the proposed catalytic amino acids of the Sindbis virus capsid protein autoprotease. *J Virol*, **64**, 3459-3465.
- Hamblin, C. and Hedger, R.S. (1979) The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea / mucosal disease virus in African wildlife. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **2**, 295-303.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harada, T., Tautz, N. and Thiel, H.-J. (2000) E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol*, **74**, 9498-9506.
- Harlow, E. and Lane, D. (1998) *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J. and Smith, M.H. (1985) The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *Embo J*, **4**, 3021-3024.
- Heinz, F.X., Collett, M.S., Purcell, R.H., Gould, E.A., Howard, C.R., Houghton, M., Moormann, J.M., Rice, C.M. and Thiel, H.-J. (2000) Family Flaviviridae. In M.H.V., R.v., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. (eds.), *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 859-878.
- Hellen, C.T. and Wimmer, E. (1992) Maturation of poliovirus capsid proteins. *Virology*, **187**, 391-397.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (eds.). (1992) *The ubiquitin system*.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K. and Shimotohno, K. (1993) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol*, **67**, 4665-4675.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kimura, K. and Shimotohno, K. (1993) Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 10733-10737.
- Hochstrasser, M. (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol*, **2**, E153-157.
- Hoff, H.S. and Donis, R.O. (1997) Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res*, **49**, 101-113.
- Horzinek, M.C., Maess, J. and Laufs, R. (1971) Studies on the substructure of Togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch. f. d. ges. Virusforschung*, **33**, 306-318.
- Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987) Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol*, **19**, 13-21.
- Hulst, M.M. and Moormann, R.J. (2001) Erns protein of pestiviruses. *Methods Enzymol*, **342**, 431-440.
- Hulst, M.M., Westra, D.F., Wensvoort, G. and Moormann, R.J. (1993) Glycoprotein E1 of

Literaturverzeichnis

- hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol*, **67**, 5435-5442.
- Iqbal, M., Flick-Smith, H. and McCauley, J.W. (2000) Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol*, **81**, 451-459.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S. and McCauley, J.W. (2004) Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol*, **78**, 136-145.
- Jentsch, S. (ed.). (1992) *The ubiquitin-conjugating system*.
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol*, **10**, 335-342.
- Jonnalagadda, S., Butt, T.R., Monia, B.P., Mirabelli, C.K., Gotlib, L., Ecker, D.J. and Crooke, S.T. (1989) Multiple (α -NH₂-ubiquitin) protein endoproteases in cells. *J Biol Chem*, **264**, 10637-10642.
- Kao, C.C., Del Vecchio, A.M. and Zong, W. (1999) De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant Flaviviridae RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, **253**, 1-7.
- Kelley, W.L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci*, **23**, 222-227.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., Harbeson, S.L., Rice, C.M., Murcko, M.A., Caron, P.R. and Thomson, J.A. (1996) Crystal structure of the hepatitis c virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, **87**, 343-355.
- Kolykhalov, A.A., Mihalik, K., Feinstone, S.M. and Rice, C.M. (2000) Hepatitis C Virus-Encoded Enzymatic Activities and Conserved RNA Elements in the 3' Nontranslated Region Are Essential for Virus Replication In Vivo. *J Virol*, **74**, 2046-2051.
- Kräusslich, H.G. and Wimmer, E. (1988) Viral proteinases. *Annu Rev Biochem*, **57**, 701-754.
- Kümmerer, B., Stoll, D. and Meyers, G. (1998) Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J Virol*, **72**, 4127-4138.
- Kümmerer, B.M. and Meyers, G. (2000) Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol*, **74**, 390-400.
- Kümmerer, B.M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. and Meyers, G. (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol*, **77**, 117-128.
- Kupfermann, H., Thiel, H.-J., Dubovi, E.J. and Meyers, G. (1996) Bovine viral diarrhoea virus: Characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions. *J Virol*, **70**, 8175-8181.
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A.E. and Tautz, N. (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol*, **78**, 10765-10775.
- Lambot, M., Hanon, E., Lecomte, C., Hamers, C., Letesson, J.J. and Pastoret, P.P. (1998) Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol*, **79**, 1745-1749.
- Langedijk, J.P. (2002) Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and

Literaturverzeichnis

- ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem*, **277**, 5308-5314.
- Laude, H. (1977) Improved method for the purification of hog cholera virus grown in tissue culture. *Arch Virol*, **54**, 41-51.
- Lawrence, C.E., Altschul, S.F., Boguski, M.S., Liu, J.S., Neuwald, A.F. and Wootton, J.C. (1993) Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment. *Science*, **262**, 208-214.
- Lawson, M.A. and Semler, B.L. (1991) Poliovirus thiol proteinase 3C can utilize a serine nucleophile within the putative catalytic triad. *Natl Acad Sci USA*, **63**, 5013-5022.
- Leary, T.P., Muerhoff, A.S., Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Desai, S.M. and Mushahwar, I.K. (1996) Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*, **48**, 60-67.
- Leclerc, P.C., Auger-Messier, M., Lanctot, P.M., Escher, E., Leduc, R. and Guillemette, G. (2002) A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology*, **143**, 4702-4710.
- Lemm, J.A., Rümenapf, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H. and Rice, C.M. (1994) Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *Embo J*, **13**, 2925-2934.
- Liebler, E.M., Waschbusch, J., Pohlenz, J.F., Moennig, V. and Liess, B. (1991) Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol Suppl*, **3**, 109-124.
- Liess, B. (1967) Die ätiologische Abgrenzung selbständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im sogenannten "Mucosal Disease Komplex" bei Rindern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **74**, 46-49.
- Liess, B., Frey, H.R., Kittsteiner, H., Baumann, F. and Neumann, W. (1974) [Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a "slow virus infection"]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **81**, 481-487.
- Lin, C., Lindenbach, B.D., Prágal, B.M., McCourt, D.W. and Rice, C.M. (1994) Processing in the Hepatitis C Virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol*, **68**, 5063-5073.
- Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2001) Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, New York, Vol. 1, pp. 991-1042.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110-113.
- Love, R.A., Parge, H.E., Wickersham, J.A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E.W., Adachi, T. and Hostomska, Z. (1996) The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell*, **87**, 331-342.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J. and Rümenapf, T. (2004) CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol*, **78**, 1792-1799.
- Mayer, A.N. and Wilkinson, K.D. (1989) Detection, resolution, and nomenclature of

Literaturverzeichnis

- multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochemistry*, **28**, 166-172.
- McClurkin, A.W., Bolin, S.R. and Coria, M.F. (1985) Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc*, **186**, 568-569.
- McKercher, D.G., Saito, J.K., Crenshaw, G.L. and Bushnell, R.B. (1968) Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhoea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc*, **152**, 1621-1624.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M.S. and Rice, C.M. (1998) Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J Virol*, **72**, 4737-4745.
- Meyer, C., Von Freyburg, M., Elbers, K. and Meyers, G. (2002) Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhoea viruses from infectious cDNA clones. *J Virol*, **76**, 8494-8503.
- 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., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1989) Ubiquitin in a togavirus. *Nature*, **341**, 491.
- Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1990) Insertion of ubiquitin-coding sequence identified in the RNA genome of a Togavirus. In Brinton, M.A. and Heinz, F.X. (eds.), *New aspects of positive strand RNA viruses*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 25-29.
- Meyers, G., Saalmüller, A. and Büttner, M. (1999) Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol*, **73**, 10224-10235.
- Meyers, G., Stoll, D. and Gunn, M. (1998) Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J Virol*, **72**, 4139-4148.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. and Kümmerer, B. (1996) Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J Virol*, **70**, 8606-8613.
- 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. *Advances in virus research*, **47**.
- Moennig, V., Frey, H.-R., Liebler, E., Polenz, P. and Liess, B. (1990) Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet Rec*, **127**, 200-203.
- Moennig, V., Greiser-Wilke, I., Frey, H.R., Haas, L., Liebler, E., Pohlenz, J. and Liess, B. (1993) Prolonged persistence of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a persistently viremic cattle. *Zentralbl Veterinarmed [B]*, **40**, 371-377.
- Moennig, V. and Plagemann, P.G.W. (1992) The pestiviruses. *Adv Vir Res*, **41**, 53-98.
- Moormann, R.J.M., Warmerdam, P.A.M., Van der Meer, B., Schaaper, W.M.M.,

Literaturverzeichnis

- 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 glycoprotein E1. *Virology*, **177**, 184-198.
- Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Dawson, G.J., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Schlauder, G.G., Desai, S.M. and Mushahwar, I.K. (1995) Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol*, **69**, 5621-5630.
- Müller, A., Rinck, G., Thiel, H.-J. and Tautz, N. (2003) Cell-derived sequences in the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J Virol*, **77**, 10663-10669.
- Myers, T.M., Kolupaeva, V.G., Mendez, E., Baginski, S.G., Frolov, I., Hellen, C.U. and Rice, C.M. (2001) Efficient translation initiation is required for replication of bovine viral diarrhea virus subgenomic replicons. *J Virol*, **75**, 4226-4238.
- Nagai, M., Sakoda, Y., Mori, M., Hayashi, M., Kida, H. and Akashi, H. (2003) Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol*, **84**, 447-452.
- Nettleton, P.F. (1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, **9**, 131-150.
- Pallaoro, M., Lahm, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Nardella, C., Orsatti, L., Bonelli, F., Orru, S., Narjes, F. and Steinkuhler, C. (2001) Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol*, **75**, 9939-9946.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B. and Zitzmann, N. (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6104-6108.
- Pellerin, C., Moir, S., Lecomte, J. and Tijssen, P. (1995) Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhea viruses. *Vet Microbiol*, **45**, 45-47.
- 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.
- Petersen, J.F., Cherney, M.M., Liebig, H.D., Skern, T., Kuechler, E. and James, M.N. (1999) The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: a proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *Embo J*, **18**, 5463-5475.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J. and Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- Pocock, D.H., Howard, C.J., Clarke, M.C. and Brownlie, J. (1987) Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol*, **94**, 43-53.
- Poole, T.L., Wang, C., Popp, R.A., Potgieter, L.N.D., Siddiqui, A. and Collett, M.S. (1995) Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, **206**, 750-754.
- Potgieter, L.N.D., McCracken, M.D., Hopkins, F.M. and Guy, J.S. (1985) Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 151-153.
- Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G.D. and Gage, P.W. (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett*, **557**, 99-103.

Literaturverzeichnis

- Purchio, A.F., Larson, R. and Collett, M.S. (1984) Characterization of bovine viral diarrhea viral proteins. *J Virol*, **50**, 666-669.
- Qi, F., Ridpath, J.F. and Berry, E.S. (1998) Insertion of a bovine SMT3B gene in NS4B and duplication of NS3 in a bovine viral diarrhea virus genome correlated with the cytopathogenicity of the virus. *Virus Res*, **57**, 1-9.
- Qu, L., McMullan, L.K. and Rice, C.M. (2001) Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol*, **75**, 10651-10662.
- Racaniello, V.R. (2001) Picornaviridae: The viruses and Their Replication. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, New York, Vol. 1, pp. 685-722.
- Rawlings, N.D., O'Brien, E. and Barrett, A.J. (2002) MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Res*, **30**, 343-346.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. and Barrett, A.J. (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, **32 Database issue**, D160-164.
- 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 virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med*, **3**, 42-46.
- Rechsteiner, M. (ed.). (1987) *Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis*.
- Redmann, K.L. and Rechsteiner, M. (1989) Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature*, **338**, 438-440.
- Renard, A., Dino, D. and Martial, J. (1987) Vaccines and diagnostics derived from bovine diarrhea virus. *European patent Application number 86870095.6*, publication number 02.08672.
- Rice, C.M. (1996) In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, pp. 933-959.
- Ridpath, F.F., Bolin, S.R. and Dubovi, E.J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, **205**, 66-74.
- Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. (1995) Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*, **212**, 259-262.
- 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 noncytopathic BVDV. *Virology*, **212**, 39-46.
- Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. (1997) Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res*, **50**, 237-243.
- Ridpath, J.F. and Neill, J.D. (2000) Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhea viruses. *J Virol*, **74**, 8771-8774.
- Rijnbrand, R., v.d. Straaten, T., v. Rijn, P.A., Spaan, W.J.M. and Breedenbeek, P.J. (1997) Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol*, **71**, 451-457.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H.-J. and Tautz, N. (2001) A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J Virol*, **75**, 9470-9482.

Literaturverzeichnis

- Roux, L., Simon, A.E. and Holland, J.J. (1991) Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Adv virus res*, **40**, 181-211.
- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M. and Thiel, H.-J. (1998) N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol*, **72**, 2544-2547.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1991) Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol*, **65**, 589-597.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H. and Thiel, H.-J. (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol*, **67**, 3288-3295.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11646-11651.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G. and La Monica, N. (1995) The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol*, **69**, 7461-7471.
- Sanz, M.A., Perez, L. and Carrasco, L. (1994) Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in Escherichia coli cells. *J Biol Chem*, **269**, 12106-12110.
- Schägger, H. and Jagow, G.v. (1987) Tricine- sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- 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.
- Schuler, G.D., Altschul, S.F. and Lipman, D.J. (1991) A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins*, **9**, 180-190.
- Schweizer, M. and Peterhans, E. (2001) Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol*, **75**, 4692-4698.
- Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Leary, T.P., Dawson, G.H., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Muerhoff, A.S., Erker, J.C., Buijk, S.L., Chalmers, M.L., vanSant, C.L. and Mushahwar, I.K. (1995) Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 3401-3405.
- Stapleton, J.T. (2003) GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin Liver Dis*, **23**, 137-148.
- 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.
- Sutter, G., Ohlmann, M. and Erfle, V. (1995) Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Letters*, **371**, 9-12.
- Tamura, J.K., Warren, P. and Collett, M.S. (1993) RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus.

Literaturverzeichnis

Virology, **193**, 1-10.

- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1997) Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol*, **71**, 5415-5422.
- Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S.E. and Thiel, H.-J. (1999) Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J Virol*, **73**, 9422-9432.
- Tautz, N., Kaiser, A. and Thiel, H.-J. (2000) NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology*, **273**, 351-363.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E.J. and Thiel, H.-J. (1996) Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27 nucleotide insertion. *J Virol*, **70**, 7851-7858.
- Tautz, N., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1993) Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology*, **197**, 74-85.
- Tautz, N. and Thiel, H.-J. (2003) Cytopathogenicity of pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication. *Arch Virol*, **148**, 1405-1412.
- Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E.J. and Meyers, G. (1994) Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by internal deletion. *J Virol*, **68**, 3289-3297.
- Thiel, H.-J., Plagemann, P.G.W. and Moennig, V. (1996) Pestiviruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, New York, Vol. 1, pp. 1059-1073.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., R umenapf, T. and Meyers, G. (1991) Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*, **65**, 4705-4712.
- Tian, P., Ball, J.M., Zeng, C.Q. and Estes, M.K. (1996) The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol*, **70**, 6973-6981.
- Tian, P., Ball, J.M., Zeng, C.Q. and Estes, M.K. (1996) Rotavirus protein expression is important for virus assembly and pathogenesis. *Arch Virol Suppl*, **12**, 69-77.
- Tratschin, J.D., Moser, C., Ruggli, N. and Hofmann, M.A. (1998) Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture. *J Virol*, **72**, 7681-7684.
- Tsukiyama-Kohara, K., Hozuka, N., Kohara, M. and Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **66**, 1476-1483.
- van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M. and Melchers, W.J. (1997) Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J*, **16**, 3519-3532.
- van Oirschot, J.T. (1992) In Lerman (ed.), *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 274-285.
- 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 glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol*, **65**, 2761-2765.
- Vassilev, V.B., Collett, M.S. and Donis, R.O. (1997) Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. *J Virol*, **71**, 471-478.

Literaturverzeichnis

- Vassilev, V.B. and Donis, R.O. (2000) Bovine viral diarrhoea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res*, **69**, 95-107.
- Vilcek, S., Greiser-Wilke, I., Nettleton, P. and Paton, D.J. (2000) Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet Microbiol*, **77**, 129-136.
- Wada, H., Kito, K., Caskey, L.S., Yeh, E.T. and Kamitani, T. (1998) Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**, 688-692.
- Warrener, P. and Collett, M.S. (1995) Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol*, **69**, 1720-1726.
- Weiland, S., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. and Thiel, H.-J. (1992) A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol*, **66**, 3677-3682.
- Weiland, S., Stark, R., Haas, B., Rümepf, 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.
- Wensvoort, G. and Terpstra, C. (1985) [Swine fever: a changing clinical picture]. *Tijdschr Diergeneeskd*, **110**, 263-269.
- Westaway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich, S., Horzinek, M.C., Igarashi, A., Kaariainen, L., Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russell, P.K. and Trent, D.W. (1985) Togaviridae. *Intervirology*, **24**, 125-139.
- Wilhelmsen, C.L., Bolin, S.R., Ridpath, J.F., Chevillie, N.F. and Kluge, J.P. (1991) Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am J Vet Res*, **52**, 269-275.
- Williams, C.F., Klinzman, D., Yamashita, T.E., Xiang, J., Polgreen, P.M., Rinaldo, C., Liu, C., Phair, J., Margolick, J.B., Zdunek, D., Hess, G. and Stapleton, J.T. (2004) Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med*, **350**, 981-990.
- Windisch, J.M., Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1996) RNase of Classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol*, **70**, 352-358.
- Wiskerchen, M., Belzer, S.K. and Collett, M.S. (1991) Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol*, **65**, 4508-4514.
- Wiskerchen, M. and Collett, M.S. (1991) Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, **184**, 341-350.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P.R., Lin, C., Murcko, M.A., Collett, M.S. and Rice, C.M. (1997) Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol*, **71**, 5312-5322.
- Yeh, E.T., Gong, L. and Kamitani, T. (2000) Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene*, **248**, 1-14.
- Yu, H., Grassmann, C.W. and Behrens, S.E. (1999) Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J Virol*, **73**, 3638-3648.

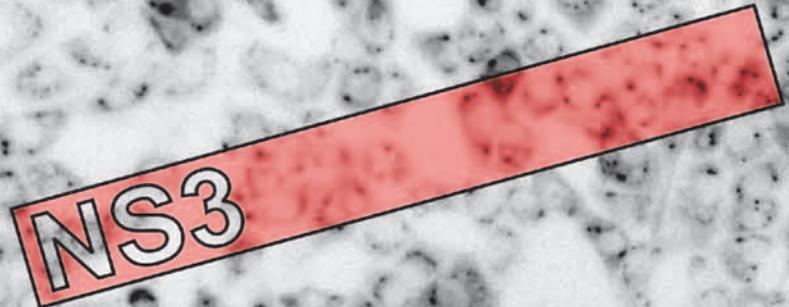
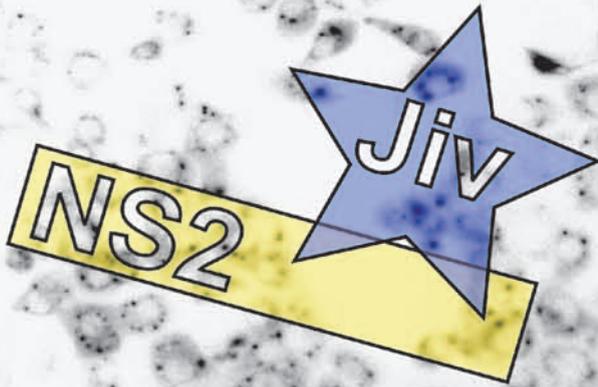
Literaturverzeichnis

- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C.W. and Behrens, S.E. (2000) A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol*, **74**, 5825-5835.
- Yu, S.F. and Lloyd, R.E. (1992) Characterization of the roles of conserved cysteine and histidine residues in poliovirus 2A protease. *Virology*, **186**, 725-735.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M.C. and McCauley, J.W. (1996) Cell death induced by cytopathic bovine diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol*, **77**, 1677-1681.
- Zhang, H., Chao, S.-F., Ping, L.-H., Grace, K., Clarke, B. and Lemon, S.M. (1995) An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: Genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology*, **212**, 686-697.
- Zhong, W., Gutshall, L.L. and Del Vecchio, A.M. (1998) Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, **72**, 9365-9369.

10 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere:

- Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit im Institut für Virologie durchzuführen. Ich danke ihm für die unzähligen und stets sehr hilfreichen Gespräche und die rasche Durchsicht dieser Arbeit.
- Herrn Dr. Norbert Tautz für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die unzähligen Hilfestellungen und guten Ideen, die stets entspannte Arbeitsatmosphäre und seine Begeisterung für die Forschung, die er an alle weiterzugeben versteht.
- Meinen Mitstreitern im Labor, Alexandra Müller, Sylvaine Jacobi und Erik Lattwein für die harmonische Zusammenarbeit, die gegenseitigen Hilfestellungen und alle nützlichen Diskussionen. Insbesondere danke ich Sylvaine für die unermüdliche Übernahme zahlreicher zeitaufwändiger Klonierungsschritte.
- Alexander Pankraz und Dr. Paul Becher, die als erste Anhaltspunkte für freies NS3 in noncp BVDV-infizierten Zellen fanden und diesen Befund an uns weitergaben. Ich danke ihnen auch für nützliche Diskussionen und Anregungen im weiteren Verlauf dieser Arbeit.
- Dr. Matthias König für die Überlassung von Hybridomüberstand und die Hilfe bei zahlreichen Gelegenheiten.
- Martin Ziess und Dr. Christoph Birghan für ihre Beiträge in der Anfangsphase dieses Projekts.
- Dr. A. E. Gorbalenya (Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center) für die Erstellung der bioinformatischen Analyse.
- Dr. John Ziebur (Institut für Virologie und Immunologie, Universität Würzburg) für seine Unterstützung bei der Durchführung der Radiosequenzierung.
- Dem SFB 535 und dem Graduiertenkolleg 455 für die finanzielle Unterstützung.
- Und meinen Eltern für die Unterstützung während Studium und Promotion.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-473-X

