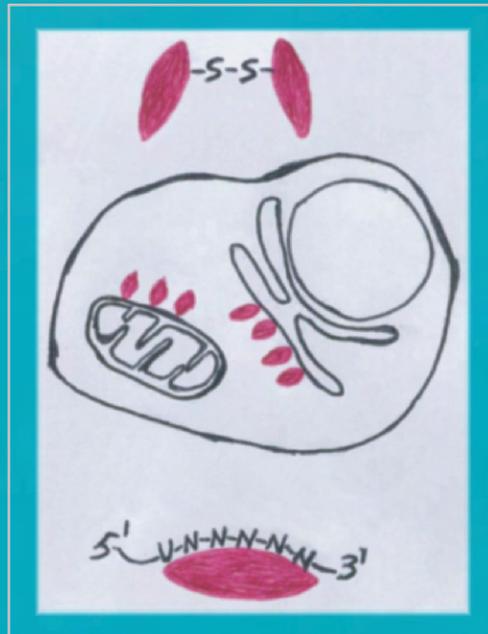


# CHARAKTERISIERUNG DES CORE-PROTEINS VON PESTIVIREN

**GLEYDER ROMAN-SOSA**



## INAUGURAL-DISSERTATION

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

**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 2007

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.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Betreuer: Prof. Dr. Till Rügenapf

# **Charakterisierung des Core-Proteins von Pestiviren**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**GLEYDER ROMAN-SOSA**

Tierarzt aus el Mariel, la Habana, Kuba

Gießen 2007

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. T. Rümenapf  
Prof. Dr. M. Diener

Tag der Disputation: 30 März 2007

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.

*Meinen Eltern,  
meinem Freund Carlos,  
meiner Liebe Jessica*

## **Danksagung:**

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Leitung von Prof. Dr. Till Rügenapf angefertigt. Die Arbeit wurde als Projekt im Graduiertenkolleg „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“ durch die DFG gefördert.

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Till Rügenapf, der mir die Möglichkeit gab, so ein interessantes Thema zu bearbeiten und mich während dieser Zeit unterstützt und betreut hat. Ich danke dir Till für die Diskussionsbereitschaft, die gute Atmosphäre in unserem Labor, deine ansteckende Begeisterung für die Laborarbeit und insbesondere dafür, dass du in mir großes Interesse an der Grundlagenforschung erweckt hast.
- Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel, der mir die Gelegenheit gab in seinem Institut zu promovieren und mich immer unterstützt hat. Vielen Dank Herr Thiel, meine Erwartungen sind übertroffen worden.
- Manuela Heimann, Karin Müller, Dr. Thomas Krey, Dr. Yvonne Hausmann und Dr. Anke Himmelreich für die nette Zusammenarbeit und die geduldige Einweisung in die für mich neuen Techniken. Ihr habt mich eingearbeitet und mir sehr geholfen.
- Siby (Dr. Sibilina Cedillo Rosales), die mich am Anfang bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern unterstützt hat. Noch wichtiger danke ich dir Siby für deine Freundschaft.
- Dr. Matthias König, der mich durch sein fachliches Wissen und seine ermutigenden Wörter unterstützt hat. Vielen Dank Matthias für deine Freundschaft.
- Steffi, Babsi, Tine und Claudia, die mir freundlicherweise immer Funktionen des Word Systems gezeigt haben, die für das Zusammenschreiben dieser Dissertation sehr hilfreich waren. Für den netten Umgang miteinander vielen Dank.
- Heidrun Will, die die für das Testen der monoklonalen Antikörper notwendige EM Präparate bereitstellte.
- Dr. Sybille Herzog, die mir Ratschläge bei der Anwendung von Fluoreszenz gekoppelten Antikörper gab.
- Dr. Norbert Tautz, der sich immer für meine Arbeit interessiert hat. Danke Norbert für die hilfreichen Anregungen und Denkanstöße.

- Debo und Vera, die sich immer Zeit genommen haben, um mir ihre Erfahrungen und Kenntnisse mit der konfokalen Mikroskopie beizubringen. Euch möchte ich auch für eure ermutigenden Wörter danken.
- Erik, mit dem ich mich immer treffen konnte um Erfahrungen bezüglich Proteinreinigung auszutauschen.
- Sylvaine, die die für die Charakterisierung der anti NS5B monoklonalen Antikörper nötigen Lysate herstellte.
- Dr. Stefan Korte, aus dem Institut für Physiologie (FB Tiermedizin), Dr. Birgit Rabe und Alexandra Schwarz aus dem Institut für Virologie (FB Humanmedizin), die mich bei der Durchführung der Koloalisationsexperimente geduldig- und freundlicherweise unterstützt haben.
- Prof. Dr. Alfred Pingoud und Dr. Jamilah Michel, deren Unterstützung mir innerhalb des Graduiertenkollegs nie gefehlt hatte.
- Herr Szauter und den Mitarbeitern der Werkstatt des MZI, die sich immer darum bemüht haben, Geräte bzw. Apparaturen zügig zu reparieren oder herzustellen
- Meinen Freunden Dominique, Verena und Yerko, Angelica, Vinni, Pepe und Marce, die mir wie eine Familie immer geholfen haben.
- Meiner deutschen Familie Jenny, Oma Edith, Tante Gabi, Familie Simons und Uli, die mich liebe- und verständnisvoll unterstützt haben.
- a mi familia, a mis queridos padres Mirta Sosa Rodriguez y Domingo Roman Rodriguez, que siempre se han preocupado por mi formacion profesional, y cuyo amor, a pesar de la distancia, nunca me ha faltado. A mi abuelita Aurea, mi tio Antonio, mi tia Milagros y tio Cheo, mi tia Migdalia y tio Benito, y mis primos Juan Manuel, Mabel, Julio Cesar, Yosvany y Yanelis, les agradezco por todo lo que han hecho y hacen para que yo haya logrado tanto en la vida. Ustedes son mi mayor inspiracion. Gracias !!!
- meinem Freund Carlos, der Bruder, der mir das Leben geschenkt hatte. Vielen Dank Carlos für alles, insbesondere für deine Freundschaft, Ratschläge, ständige Hilfe und die Unterstützung. Gracias mi hermano !!!
- meiner Jessica, die diese Dissertation sorgfältig und gewissenhaft korrigierte. Ich danke dir Jess, vor allem dafür, dass deine Unterstützung und deine Liebe in diesen zwei Jahren mich immer begleitet haben. Du hast immer an mich geglaubt, mich immer verstanden und für mich alles getan. Mehr Hilfe, Liebe und Unterstützung hätte

ich mir nicht erträumen können. Ich bin dir sehr dankbar meine Jessica und es ist mir bewusst, dass diese Wörter immer noch zu wenig sind.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie (FB Tiermedizin), da sie alle direkt- oder indirekterweise zu dem Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Pestiviren</i>	1
1.1.1 <i>Eigenschaften und Funktion der Strukturproteine von Pestiviren</i>	4
1.1.1.1 <i>Glykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2</i>	4
1.1.1.2 <i>Kapsid-Protein (Core)</i>	5
1.2 <i>Eigenschaften und Funktion des Core-Proteins anderer Mitglieder der Familie Flaviviridae</i>	6
1.2.1 <i>Hepatitis C Virus</i>	6
1.2.2 <i>Flaviviren</i>	8
1.3 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	10
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>11</b>
2.1.1 <i>Eukaryotische Zelllinien</i>	11
2.1.2 <i>Prokaryotische Zellen</i>	11
2.1.3 <i>Virusstämme</i>	11
2.1.4 <i>Antikörper</i>	12
2.1.5 <i>Enzyme</i>	13
2.1.6 <i>Chemikalien</i>	13
2.1.7 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	14
2.1.8 <i>Geräte</i>	14
<b>2.2 Methoden</b>	<b>15</b>
2.2.1 <i>Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten</i>	15
2.2.1.1 <i>Medien und Puffer</i>	15
2.2.1.2 <i>Allgemeine Zellkulturarbeiten</i>	16
2.2.1.3 <i>Elektroporation von RNS in SK6-Zellen</i>	17
2.2.1.4 <i>Indirekter immunhistochemischer Nachweis</i>	18
2.2.1.4.1 <i>Indirekte Immunperoxidase</i>	18
2.2.1.4.2 <i>Protein Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz</i>	18
2.2.1.4.2.1 <i>Einbettungsmedium</i>	20
2.2.1.4.2.2 <i>Färbung von Zellkernen mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)</i>	20

2.2.1.5 <i>Titration von Pestiviren</i>	20
2.2.1.6 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration (BC-Mikroassay)</i>	20
2.2.2 <i>Herstellung monoklonaler Antikörper</i>	21
2.2.2.1 <i>Erzeugung rekombinanter Proteine</i>	21
2.2.2.2 <i>Immunisierung von Mäusen</i>	22
2.2.2.3 <i>Gewinnung und Ausplattierung von „Feeder“-Zellen</i>	23
2.2.2.4 <i>Gewinnung der Splenozyten (Milzzellen)</i>	23
2.2.2.5 <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	24
2.2.2.6 <i>Fusion von Splenozyten und Myelomzellen</i>	24
2.2.2.7 <i>Selektion von Hybridomzellen</i>	25
2.2.2.8 <i>ELISA zum Screening von Hybridom Überständen</i>	25
2.2.2.9 <i>Screening von Hybridomzellen</i>	27
2.2.2.10 <i>Klonierung positiver Hybridome</i>	27
2.2.2.11 <i>Produktion von mAks</i>	27
2.2.2.12 <i>Isotypisierung der mAks mit einem kommerziellen vorgefertigten Test (ImmunoPure<sup>®</sup> Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (HRP/ABTS))</i>	28
2.2.2.13 <i>Bestimmung der Epitope der anti Core-Protein mAks</i>	28
2.2.3 <i>Kolokalisierungsstudien</i>	28
2.2.3.1 <i>Kolokalisierung von Struktur- bzw. Nichtstrukturproteinen mit dem ER</i>	28
2.2.3.2 <i>Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Mitochondrien</i>	29
2.2.3.2.1 <i>Färbung von Mitochondrien</i>	30
2.2.3.3 <i>Kolokalisierung des Core-Proteins mit „lipid droplets“</i>	30
2.2.3.3.1 <i>Färbung der „lipid droplets“ mit Red Oil O</i>	30
2.2.3.4 <i>Kolokalisierung des Core-Proteins mit „P-Bodies“</i>	31
2.2.3.5 <i>Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS3</i>	31
2.2.3.5.1 <i>Direkte Markierung der mAks mit dem „Zenon<sup>®</sup> Mouse Labeling Kit“ (Fa. Pierce)</i>	32
2.2.3.5.1.1 <i>Reinigung von monoklonalen Antikörpern</i>	32
2.2.3.6 <i>Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS5B</i>	33
2.2.4 <i>Protein-RNS Agarose Gel Bindungsassay</i>	33
2.2.5 <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	34
2.2.5.1 <i>SDS-PAGE</i>	34

2.2.5.2 <i>Coomassie-Färbung</i>	35
2.2.5.3 <i>Immunoblot-Analyse von Proteinen (Western Blot)</i>	36
2.2.5.4 <i>Gewinnung von Virionen aus dem Überstand infizierter Zellkulturen</i>	37
2.2.5.5 <i>Präparation von Lysaten aus KSPV infizierten Zellen zur Western Blot Analyse</i>	37
2.2.5.6 <i>Präparation von Lysaten aus mit nzp7 NS5A-B transfizierten Zellen zur Western Blot Analyse</i>	37
2.2.6 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	38
2.2.6.1 <i>Anzucht von Bakterien</i>	38
2.2.6.2 <i>Plasmidisolierung</i>	38
2.2.6.3 <i>Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien</i>	40
2.2.6.4 <i>Isolierung von Gesamt-RNS durch RNeasy</i>	41
2.2.6.5 <i>Phenol/Chloroform Extraktion von DNS</i>	41
2.2.6.6 <i>Ethanolpräzipitation von DNS/RNS und Isopropanolpräzipitation von DNS</i>	42
2.2.6.7 <i>Quantifizierung von DNS/RNS-Proben</i>	42
2.2.6.8 <i>DNS- bzw. RNS-Agarose-Gelelektrophorese</i>	43
2.2.6.9 <i>Dephosphorylierung von DNS</i>	44
2.2.6.10 <i>Aufreinigung und Ligation von DNS-Fragmenten</i>	44
2.2.6.11 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	45
2.2.6.12 <i>Ortsgerichtete Mutagenese mittels „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis“ und Deletions-PCR</i>	46
2.2.6.13 <i>In vitro Transkription</i>	48
2.2.6.13.1 <i>Herstellung von Transkripten verschiedener Länge</i>	49
2.2.6.14 <i>Sequenzierung der DNS durch „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer</i>	49
2.2.6.15 <i>Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen</i>	50
2.2.7 <i>Klonierungen</i>	52
2.2.7.1 <i>Synthetische Oligonukleotide</i>	52
2.2.7.2 <i>Klonierung des Gens des KSPV Core-Proteins</i>	53
2.2.7.2.1 <i>Generierung der am 3'-Ende verkürzten Formen des KSPV Core-Protein Gens (pCore 6, pCore 8, pCore 11, pCore 14)</i>	53

2.2.7.3 Generierung eines KSPV Gesamtklons mit einem Cystein an der Aminosäureposition 200 des Core-Proteins (pCore29)	54
2.2.7.4 Klonierung des Gens vom BVDV Core-Protein (p940)	54
2.2.7.4.1 Generierung der am 3'-Ende verkürzten Formen des BVDV Core-Protein Gens (pCore 24, pCore 26, pCore 27, pCore 28)	55
2.2.7.5 Klonierung des KSPV NS5B-Protein Gens (p1141)	55

### 3 Ergebnisse

<b>3.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung des Core-Proteins vom Virus der klassischen Schweinepest</b>	56
3.1.1 Klonierung	56
3.1.2 Expression	58
3.1.3 Reinigung	60
<b>3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung des BVDVncp7 Core-Proteins</b>	61
3.2.1 Klonierung	61
3.2.2 Expression	61
3.2.3 Reinigung	62
<b>3.3 Präparation monoklonaler Antikörper gegen das pestivirale Core-Protein</b>	63
3.3.1 Immunisierung	63
3.3.2 Fusion von Splenozyten immunisierter Mäuse mit Myelomzellen	64
3.3.2.1 Gewinnung von Splenozyten (Milzzellen) zur Fusion	65
3.3.2.2 Fusion von Splenozyten und Myelomzellen	65
3.3.3 Etablierung eines Screeningsystems zur Identifizierung positiver Hybridome	65
3.3.4 „Screening“ von Hybridom-Überständen im ELISA, Selektion und Klonierung positiver Hybridome	66
3.3.4.1 „Screening“ der Fusionen von Splenozyten aus Mäusen, die mit KSPV Core-Protein immunisiert wurden	67
3.3.4.2 „Screening“ der Fusionen von Splenozyten aus Mäusen, die mit BVDV Core-Protein immunisiert wurden	67
3.3.5 Isotypisierung der gewonnenen monoklonalen Antikörper	67

<b>3.4 Charakterisierung der anti Core-Protein mAks</b>	68
3.4.1 Reaktion der mAks im Western Blot mit gereinigtem bakteriellen Core-Protein	68
3.4.2 Nachweis des Core-Proteins in Virionen von Pestiviren verschiedener Spezies im Western Blot mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern	69
3.4.3 Epitop Lokalisierung der anti Core-Protein mAks	72
3.4.3.1 Epitop Lokalisierung von mAk GRS-C1 und GRS-C2	72
3.4.3.2 Epitop Lokalisierung der mAks GRS-C3, GRS-C4, GRS-C5, GRS-C6, GRS-C7 und GRS-C8	73
<b>3.5 Charakterisierung des höheren Molekulargewichtproduktes des Core-Proteins vom Stamm 890 und vom Isolat Gi-4</b>	74
3.5.1 Stabilität des Produktes in Anwesenheit reduzierender Reagenzien	75
3.5.2 Funktion der Homodimerisierung von Core	76
<b>3.6 RNS bindende Aktivität des KSPV Alfort<sub>iii</sub> Core-Proteins</b>	77
3.6.1 Bindung des Core-Proteins an pestivirale RNS	78
3.6.2 Bindung des Core-Proteins an KSPV RNS Transkripte verschiedener Länge	79
3.6.3 Bindung des Core-Proteins an nicht pestivirale RNS	81
3.6.3.1 Bindung des Core-Proteins an RNS Homopolymere	82
3.6.4 Bindung des Core-Proteins an dsRNS	83
<b>3.7 Nachweis des Core-Proteins von Pestiviren mit indirekter Immunfluoreszenz</b>	83
<b>3.8 Kolokalisierungsstudien des Core-Proteins in infizierten Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie</b>	86
3.8.1 Kolokalisierung vom KSPV Core-Protein mit dem ER Marker Protein-Disulfidisomerase (PDI)	86
3.8.1.1 Kolokalisierung der KSPV Strukturglykoproteine E <sup>ms</sup> , E1 und E2 mit PDI	89
3.8.2 Kolokalisierung vom KSPV Core-Protein mit Mitochondrien	92
3.8.3 Kolokalisierung des Core-Proteins mit „RNA processing bodies (P-Bodies)“	93
3.8.4 Kolokalisierung des KSPV Core-Proteins mit „lipid droplets“(LD)	94
3.8.5 Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Bestandteilen des Replikationskomplexes NS3 und NS5B	95
3.8.5.1 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS3	96

3.8.5.2 <i>Herstellung von mAk gegen das NS5B Protein von KSPV</i>	97
3.8.5.2.1 <i>Klonierung, Expression und Reinigung des KSPV Alfort<sub>tü</sub> NS5B Proteins (RNS abhängige RNS Polymerase)</i>	97
3.8.5.2.2 <i>Immunisierung von Mäusen und Fusion von Lymphozyten mit Myelomzellen</i>	97
3.8.5.2.3 <i>„Screening“, Isolierung und Klonierung positiver Hybridome</i>	98
3.8.5.2.5 <i>Charakterisierung der gegen das NS5B hergestellten monoklonalen Antikörper GRS-Pol-1, -2, -3, -4, -5 und -6</i>	98
3.8.5.2.5.1 <i>Bestimmung des Subtyps der anti NS5B mAks</i>	98
3.8.5.2.5.2 <i>Western Blot Analyse der Hybridom-Überstände mit Zelllysaten von KSPV infizierten und BVDV NS5A-B transient exprimierenden Zellen</i>	98
3.8.5.2.5.3 <i>Detektion des NS5B Proteins KSPV infizierter Zellen in indirekter Immunfluoreszenz</i>	100
3.8.5.3 <i>Kolokalisierung des NS5B Proteins mit dem ER</i>	101
3.8.5.4 <i>Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS5B</i>	103
<b>4 Diskussion</b>	104
4.1 <i>Herstellung und Charakterisierung von mAk gegen das pestivirale Core-Protein und Nachweis des Core-Proteins in Virionen von Pestiviren verschiedener Spezies</i>	104
4.2 <i>Nachweis des Core-Proteins von Pestiviren verschiedener Spezies in infizierten Zellen, und Kolokalisierungsuntersuchungen mit Hilfe monoklonaler Antikörper</i>	106
4.3 <i>Charakterisierung der RNS bindenden Aktivität des Core Proteins</i>	109
<b>5 Zusammenfassung</b>	113
<b>6 Summary</b>	114
<b>7 Literatur</b>	115

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AEC	Aminoethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	„ <i>american type culture collection</i> “
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	„ <i>border disease virus</i> “
BVDV	„ <i>bovine viral diarrhoea virus</i> “, Virus der bovinen Virusdiarrhöe
ca.	circa
CIAP	„ <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> “, Alkalische Phosphatase
cp	zytopathogen
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
<i>cut off</i>	Schwellenwert
°C Grad	Celsius
DABCO	0,1g1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
defiz.	defizient
DMEM	Dulbecco's „ <i>minimal essential medium</i> “
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelstrang RNS
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„ <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> “
ER	endoplasmatisches Restikulum
E <sup>rns</sup>	„ <i>ribonuclease secreted</i> “
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FHG	Fisch Haut Gelatine
FITC	„ <i>fluorescein isothiocyanate</i> “
FKS	fötales Kälberserum
<i>g</i>	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanidin
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanidintriphosphat
h	„ <i>hour</i> “
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, und Thymidin
HCV	Hepatitis C Virus
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl Transferase
His	Histidin
HPRI	„ <i>Human placenta ribonuclease inhibitor</i> “
HT	Hypoxanthin und Aminopterin
6His	Hexahistidin
I	Inosin
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
IMAC	„ <i>immobilized metal affinity purification</i> “, immobilisierte metall Affinitätsreinigung
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopiranosid
IRES	Ribosomenbindungsstelle
IU	international units
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kRNS	komplementäre Ribonukleinsäure
KSPV	Virus der klassischen Schweinepest
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDs	„ <i>lipid droplets</i> “
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	„ <i>mucosal disease</i> “
MDBK	„ <i>Madin Darby bovine kidney</i> “
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “, Multiplizität der Infektion
mRNS	„ <i>messenger RNS</i> “
ncp	nicht zytopathogen
Ni	Nickel
N <sup>pro</sup>	N terminal Protease
Nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	nicht translatierten Region
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei „x“ nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>P-Bodies</i>	„ <i>RNA processing bodies</i> “, RNS prozessierende Körper
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
r	rekombinant
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„ <i>rotation per minute</i> “, Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SK	„ <i>swine kidney</i> “
SPP	Signal Peptid Peptidase
ss	einzelstrang
TB	„ <i>terrific broth</i> “
TBE	„ <i>Tick-Borne Encephalitis</i> “
TCID <sub>50</sub>	„ <i>tissue culture infectious dosis 50</i> “
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidine

tRNS	„transfer“ RNS
TSP	„transferable surface plate
TTP	Thymintriphosphat
U	Uridin
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

### 1.1 Pestiviren

Das Genus Pestivirus bildet mit den Genera Flavivirus und Hepacivirus die Familie *Flaviviridae* (Wengler et al., 1995). Es umfasst das Virus der bovinen Virusdiarrhöe (BVDV), den Erreger der klassischen Schweinepest (KSPV) und der „Border Disease“ (BDV), sowie ein Isolat von der Giraffe (Giraffe-1; (Avalos-Ramirez et al., 2001)). Als neue Spezies wurden zwei weitere Pestivirusisolate („Reindeer-1“ und „Bison“) vorgeschlagen (Becher et al., 1999). Alle drei Genera besitzen eine ähnliche Genomorganisation (Wengler et al., 1995).

Pestiviren sind behüllte RNS-Viren mit einer Größe von ca. 40-60nm (Horzinek et al., 1971; Enzmann und Weiland 1978; Moennig und Plagemann 1992). Ein vermutlich ikosaedrisches Nukleokapsid enthält die virale Nukleinsäure und wird von einer Doppellipidmembran umschlossen (Horzinek et al., 1967). In diese Lipidhülle sind die viralen Glykoproteine eingelagert. Sie ist für die Empfindlichkeit von Pestiviren gegen Substanzen wie Chloroform, Äther und Detergenzien verantwortlich.

Das Genom von Pestiviren besteht aus einer einzelsträngigen RNS, die eine Länge von etwa 12,3kb aufweist. Einige BVDV-Isolate besitzen Genome mit einer Größe bis zu 16,5kb, die auf Duplikationen oder Insertionen zellulärer Sequenzen zurückzuführen sind (Meyers und Thiel 1996). Die RNS liegt, wie bei allen Vertretern der *Flaviviridae*, in positiver („messenger sense“) Orientierung vor und enthält einen einzelnen großen Leserahmen. Dieser offene Leserahmen kodiert ein Polyprotein von ca. 4000 Aminosäuren und wird am 5'- und 3'- Ende von einer nicht translatierten Region (NTR) flankiert. Die 5'- NTR funktioniert, aufgrund ihrer komplexen Sekundärstruktur, als interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) und vermittelt die Initiation der Translation (Poole et al., 1995; Rijnbrandt et al., 1997). Ein IRES-Element initiiert auch die Translation beim Hepatitis C Virus (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Somit ist die Translationsinitiation von Pestiviren und Hepaciviren unterschiedlich im Vergleich zu den Flaviviren, bei denen die Translation durch eine „Cap“-Struktur am 5'-Terminus vermittelt wird (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Poole et al., 1995). Das pestivirale Polyprotein wird ko- und posttranslational von viralen als auch zellulären Proteasen prozessiert, um 12 reife Proteine zu generieren (Collett et al., 1988a; Collett et al., 1988b; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Unmittelbar am N-Terminus des Polyproteins liegt das Nichtstrukturprotein N<sup>pro</sup>, das sich autokatalytisch vom Polyprotein abspaltet (Stark et al., 1993; Rümenapf et al., 1998). C-terminal von N<sup>pro</sup> schließen sich die viralen Strukturproteine

an. Sie umfassen in dieser Reihenfolge das Kapsid-Protein (C) und die Glykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2.

An das Kapsid-Protein schließt sich eine interne Signalsequenz an, die die Translokation der Glykoproteine in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) bewirkt (Rümenapf et al., 1993). Zwei Drittel des offenen Leserahmens kodieren ausschließlich für Nichtstrukturproteine, welche die strukturellen und enzymatischen Komponenten des viralen Replikationskomplexes enthalten.

Aufgrund von Sequenzvergleichen und serologischer Kreuzreaktivität werden BVDV Stämme in die Genotypen BVDV-I und BVDV-II unterteilt (Pellerin et al., 1994; Ridpath und Bolin 1995). Im Genotyp BVDV-I befinden sich Stämme, die überwiegend milde Diarrhöe und Fertilitätsstörungen bei Rindern verursachen. Im Gegensatz hierzu verursachen einige der in den Genotyp BVDV II eingeordneten BVDV Stämme schwere durch hohes Fieber und Hämorrhagien gekennzeichnete Krankheitsausbrüche (Pellerin et al., 1994; Ridpath und Bolin 1995).

Aufgrund ihres Verhaltens in Zellkultur lassen sich die Pestiviren in zytopathogene (zp) und nicht-zytopathogene (nzp) Biotypen einteilen. Die Infektion eines Fetus mit einem nzp Virus im ersten Drittel der Trächtigkeit, führt zur Geburt persistent infizierter, immunotoleranter Kälber, die größere Mengen an Virus ausscheiden. Bei diesen Kälbern kann die sogenannte „*mucosal disease*“ (MD) beobachtet werden, die als Folge der BVDV Infektion in der Regel innerhalb der ersten 24 Lebensmonate auftritt. Aus den an MD erkrankten Tieren kann sowohl ein zp Virus als auch ein nzp Virus isoliert werden, das häufig aus dem nzp Virus hervorgeht (Meyers und Thiel 1996).

Von großer wirtschaftlicher Bedeutung in vielen Ländern mit intensiver Schweinehaltung ist die klassische Schweinepest (Edwards et al., 2000; Saatkamp et al., 2000). Das Krankheitsbild hängt hauptsächlich vom Alter des Tieres und der Virulenz des Stammes ab. Allerdings ist die Virulenz des KSPV eine schwer zu untersuchende Eigenschaft, da dasselbe Isolat eine unterschiedliche Symptomatik auslösen kann, die zusätzlich zum Alter der betroffenen Gruppe vom Zustand des Immunsystems und der Rasse abhängig ist (Moennig et al., 2003).

In der akuten Phase zeigen KSPV infizierte Tiere hohes Fieber (häufig > 40°C), verminderte Futteraufnahme, Konjunktivitis, Atmungsstörungen und Konstipation, die in Diarrhöe mündet (Moennig et al., 2003). Typischerweise treten Hämorrhagien in der Haut auf, die auf Ohren, Schwanz und Abdomen verteilt sind. Auch in inneren Organen (Lymphknoten, Nieren und Milz) sind Petechien bzw. Ekchymosen erkennbar.

Die KSPV Infektion verursacht eine schwere Lymphopenie und eine damit verbundene Immunsuppression, die bereits vor Auftreten der ersten Symptome nachweisbar ist (Pauly et al., 1998). Die Apoptose und Nekrose hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarks sind sehr wahrscheinlich für die Lymphopenie verantwortlich (Summerfield et al., 2000), Allerdings ist die Reduktion der Lymphozytenzahl nicht auf eine direkte Schädigung dieser Zellen durch das Virus zurückzuführen (Summerfield et al., 2001; Gómez-Villamandos et al., 2003).

Die chronische Verlaufsform der KSP tritt auf, wenn die betroffenen Tiere nicht in der Lage sind eine adäquate und effektive Immunantwort auszubilden. Diese Form der Krankheit dauert mehr als 30 Tage und die Tiere zeigen abwechselnd Phasen akuter klinischer Erkrankung und zeitweiliger Besserung. Chronisch erkrankte Schweine können mehrere Monate überleben, die Erkrankung endet jedoch immer tödlich. Die kranken Tiere zeigen unspezifische Krankheitszeichen wie z.B. Mattigkeit, Fressunlust und wiederkehrende Fieberschübe (Moennig et al., 2003).

In der pränatalen Infektion führt eine KSPV Infektion in der frühen Phase der Trächtigkeit meistens zu Aborten bzw. Totgeburten, aber auch zu Mumifikationen und Missbildungen. Eine Infektion zwischen dem 50. und 70. Tag der Trächtigkeit kann zur Geburt persistent infizierter Ferkel führen. Bei der Geburt können diese Ferkel klinisch gesund erscheinen und einige Monate überleben („*late onset CSF*“). Somit stellen sie ein Virusreservoir dar, das die KSPV Infektion in der Schweinepopulation aufrecht erhält (Moennig et al., 2003). Eine ähnliche Situation wird bei BVDV persistent infizierten Rindern festgestellt.

Durch die Wirkung staatlicher Bekämpfungsprogramme hat sich das Krankheitsbild zu einem milderem, häufig unspezifischen Verlauf gewandelt, wobei meist die chronischen Formen der Erkrankung beobachtet werden (Dunne 1973; Moennig und Plagemann 1992; Thiel et al., 1996).

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

Das Wirtsspektrum der Pestiviren umfasst ausschließlich Paarhufer. Auch in Zellkultur sind fast nur Zelllinien aus Paarhufer empfänglich für Pestiviren. Die Bezeichnung der Virusspezies geht jeweils auf die Tierart zurück, aus der sie ursprünglich isoliert wurde und in der die betreffende Krankheit auftritt. Unter natürlichen Bedingungen wurde die KSPV

Infektion nur in Schweinen nachgewiesen, dagegen konnte BVDV auch aus Schafen und Ziegen isoliert werden (Becher et al., 1997; Becher et al., 1998). Das Wirtsspektrum von BVDV (und auch von BDV) ist demnach weniger eingeschränkt.

### 1.1.1 *Eigenschaften und Funktion der Strukturproteine von Pestiviren*

#### 1.1.1.1 *Glykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2*

Die drei Glykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2 bilden mit dem Kapsid-Protein das pestivirale Virion (Thiel et al., 1991). Im viralen Partikel kommen Homodimere von E<sup>ms</sup> und E2 und ein Heterodimer von E1-E2 (Weiland et al., 1990) vor, die durch Disulfidbrücken gebildet werden. Zusätzlich wurde auch ein Disulfid verbrücktes E<sup>ms</sup>-E2 Heterodimer sowohl in infizierten Zellen als auch in gereinigten Virionen nachgewiesen (Lazar et al., 2003). Die Spaltungen am N-Terminus von E<sup>ms</sup>, E1/E2 und E2/p7 erfolgen ziemlich sicher durch Signalpeptidase (Rümenapf et al., 1993).

Das E<sup>ms</sup> („*ribonuclease secreted*“) wird in Zellkultur von infizierten Zellen sezerniert (Rümenapf et al., 1993) und besitzt eine ribonukleolytische Aktivität (Schneider et al., 1993) mit starker Substratpräferenz für NpU-haltige, einzelsträngige RNS Moleküle (Hausmann et al., 2004). Das E<sup>ms</sup> ist möglicherweise am pestiviralen Invasionsmechanismus beteiligt. Durch Zugabe von großen Mengen E<sup>ms</sup> zu permissiven Zellen kann eine pestivirale Infektion inhibiert werden (Hulst und Moormann 1997), was auf seine Bindung an Glykosaminoglykane an der Oberfläche von eukaryotischen Zellen zurückzuführen ist (Iqbal et al., 2000). Außerdem wiesen einige anti E<sup>ms</sup> mAbs neutralisierende Aktivität auf und durch die Impfung mit diesem Protein konnte eine belastbare Immunität erzielt werden (Weiland et al., 1992; König et al., 1995). Jedoch zeigten Untersuchungen mit den Hüllproteinen (E<sup>ms</sup>, E1, E2) von KSPV exprimierenden retroviralen, pseudotypisierten Partikeln, dass das „*entry*“ vom E<sup>ms</sup> unabhängig erfolgt (Wang et al., 2004).

Im C-terminalen Bereich wurde ein 27 Aminosäure langes Peptid charakterisiert, das die Aufnahme von E<sup>ms</sup> in das Zellinnere ermöglicht (Langedijk 2001). Kürzlich wurde im C-Terminus eine weitere Sequenz von 11 Aminosäuren identifiziert, die eine Assoziation von Fusionsproteinen mit Membranen vermittelt (Fetzer et al., 2005). Ein Genprodukt, das dem E<sup>ms</sup> entspricht, existiert bei den anderen Genera der Flaviviren nicht (Rice 1996).

Das Glykoprotein E2 stellt das Hauptantigen dar, gegen das im Verlauf einer pestiviralen Infektion Antikörper nachgewiesen werden (Meyers und Thiel 1996). Durch die Impfung mit E2-Antigen wurde der Schutz vor einer KSPV Infektion bzw. Erkrankung erzielt (Rümenapf

et al., 1991; König et al., 1995). Als das E2 Protein des BDV („border disease“) in einen BVDV Gesamtklon eingebaut wurde, zeigte diese Chimäre einen Phenotyp in bovinen Zellen, der dem des ursprünglichen BDV entspricht (Liang et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das E2 Protein bei der Speziespezifität (Wirtswechsel) von Pestiviren eine wichtige Rolle spielen könnte. Es wäre vorstellbar, dass das E2 als viraler Ligand bei der Interaktion des Virus mit dem Rezeptor CD46 fungiert (Maurer et al., 2004; Krey et al., 2006).

Über die Funktion des Glykoproteins E1 ist so gut wie nichts bekannt. Dieses Protein kommt in Virionen und infizierten Zellen nur als Disulfid verbrücktes Heterodimer mit E2 vor (Thiel et al., 1991) und vermittelt keinen Schutz vor der Infektion mit dem KSPV (König et al., 1995). Für E1 wird angenommen, dass es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991).

Die subzelluläre Lokalisierung der Proteine von Pestiviren ist bisher überwiegend für die Glykoproteine E<sup>ms</sup> und E2 untersucht worden. In einer Studie zeigten Grummer et al. (Grummer et al., 2001), dass E<sup>ms</sup>, E2 und das Nichtstrukturprotein NS3 mit zytosolischen Membranen assoziieren. Am C-Terminus des E2-Proteins wurde eine Signalsequenz identifiziert, die für seine Topologie im ER verantwortlich ist und den Weitertransport verhindert (Köhl et al., 2004). In Experimenten, betreffend der Lokalisierung von diesen Proteinen in infizierten Zellen und Virionen, konnten das E<sup>ms</sup> und das E2 in geringer Menge auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Weiland et al., 1999). Der Nachweis dieser Proteine auf der Zellmembran wurde darauf zurückgeführt, dass die entsprechenden Antikörper die Glykoproteine auf Virionen erkannten, die an der Zelloberfläche gebunden blieben.

#### 1.1.1.2 Core-Protein (Core)

Das Core-Protein von Pestiviren, in früheren Studien als p14 bezeichnet, wurde in pestiviralen Virionen durch Radioimmunpräzipitation nachgewiesen (Thiel et al., 1991). Das pestivirale Core-Protein umfasst 87 Aminosäuren beim KSPV und 90 beim BVDV und ist hochgradig geladen. Im viralen Polyprotein befindet sich das Core hinter der N-terminalen Protease N<sup>pro</sup>, die sich autoproteolytisch abspaltet. Das Serin<sup>169</sup> stellt die erste Aminosäure am N-Terminus des reifen Core-Proteins dar (Stark et al., 1993; Heimann et al., 2006). Für die Prozessierung des C-Terminus vom Core-Protein ist die Signal Peptidase (SPP) verantwortlich (Heimann et al., 2006). In diesen Studien zeigten Heimann et al., dass diese Protease zwischen Alanin<sup>255</sup> und Valin<sup>256</sup> am C-Terminus vom KSPV Core-Protein spaltet. Da der

hydrophobe Bereich RKKLEKALLAWA<sup>255</sup> bei Pestiviren aller Spezies konserviert ist, ist davon auszugehen, dass die SPP den C-Terminus aller Pestiviren generiert. Durch die Anwendung des SPP spezifischen Inhibitors (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton oder die Überexpression einer inaktiven SPP Mutante konnte die Anzahl von Viruspartikeln im Überstand bis zum 100fachen verringert werden. Das deutet darauf hin, dass die korrekte Prozessierung des C-Terminus vom Core-Protein bei der Bildung von Virionen eine wichtige Rolle spielt. Für diese Untersuchungen wurde dem Core-Protein am N-Terminus, direkt vor dem Serin<sup>169</sup>, ein FLAG „Tag“ angefügt, um es via Immunität aus Virionen reinigen zu können. Der „Tag“ (8 Aminosäuren lang) hatte nur wenig Einfluss auf das Viruswachstum, wodurch gezeigt wird, dass das Core-Protein Größenzunahmen von 10 Prozent toleriert. Die Prozessierung des C-Terminus vom Core-Protein stellt eine Gemeinsamkeit der Pestiviren mit dem Virus der Hepatitis C dar, bei dem der C-Terminus ebenfalls durch SPP generiert wird (McLauchlan et al., 2000). In zahlreichen Studien wurde die Funktion des HCV Core-Proteins untersucht, jedoch liegen keine Erkenntnisse über die Funktion des pestiviralen Core-Proteins vor.

## 1.2 *Eigenschaften und Funktion des Core-Proteins anderer Mitglieder der Familie Flaviviridae*

### 1.2.1 *Hepatitis C Virus*

Bei HCV stellt das Core-Protein das erste Produkt nach Prozessierung des viralen Polyproteins durch zelluläre und virale Proteasen dar (McLauchlan 2000) und bildet mit den Glykoproteinen E1 und E2 das Virion vom HCV. Es wurde gezeigt, dass das HCV Core-Protein an Ribosomen bindet, was auf die sequenzunabhängige RNS bindende Aktivität der C-terminalen Aminosäuren 1 bis 75 zurückgeführt wurde (Santollini et al., 1994).

Diese Sequenz besteht überwiegend aus basischen Aminosäuren, die wahrscheinlich mit der Ribose oder den Phosphatgruppen der RNS interagieren. Andererseits vermuteten die Autoren, dass die Bindung an ribosomale RNS eine Funktion beim „*uncoating*“ des viralen Partikels haben könnte. Durch seine RNS bindende Aktivität fungiert das HCV Core-Protein als ein RNS Chaperon, welches die Bildung eines RNS Dimers ermöglicht, der für die Entstehung von rekombinanten Viren von Bedeutung sein könnte (Cristofari et al., 2004). RNS Chaperone sind Proteine, die ungefaltene Bereiche besitzen (Tompa und Csermely 2004) und sequenzunabhängig mit RNS interagieren, um die Konformation zu stabilisieren, die für die Funktion des RNS-Moleküls wichtig ist (Ivanyi-Nagy et al., 2005). Es wurde auch postuliert, dass durch seine RNS Chaperon Funktion das HCV Core-Protein mit den in der

Zelle auftretenden RNS Chaperonen interferiert. Eine weitere Studie zeigte, dass der N-terminale und positiv geladene Bereich des HCV Cores für die Dimerisierung von genomischer RNS bzw. für die RNS Chaperon Aktivität ausreichend ist (Ivanyi-Nagy et al., 2006).

Der C-Terminus des authentischen HCV Core-Proteins wird, wie bei den Pestiviren, durch die SPP in der Membran des ERs generiert (McLauchlan et al., 2002). Nach der Spaltung am C-Terminus assoziiert das HCV Core-Protein zügig mit „*lipid droplets*“ (LDs) (Hope und McLauchlan 2000), bei denen es sich um zytosolische Ansammlungen von Tryacylglycerol und Cholesterol handelt (Londos et al., 1999). In der Domäne 2 (Aminosäuren 119-174) des Proteins befinden sich die für die Assoziation mit LDs nötigen Aminosäurereste, die einen sehr hydrophoben Bereich in der Mitte des Proteins bilden. In dieser Domäne wurde auch ein Motiv identifiziert (Aminosäuren 125-144), das für die Stabilität des Proteins entscheidend ist.

Die Expression des HCV Core-Proteins in prokaryotischen Zellen *Escherichia coli* (*E.coli*) resultierte in einem toxischen Effekt. Bedingt durch seine hohe Hydrophobizität blieb es nur in Anwesenheit milder Detergenzien löslich. Das Protein besteht aus  $\alpha$ -Helices und bildet ein Dimer, welches die basische Einheit für die Bildung des Nukleokapsids darstellt (Boulant et al., 2005).

Nach der Bindung an RNS nimmt das HCV Core-Protein Konformationsänderungen an und bildet Nukleokapsid ähnliche Strukturen, die Protease resistent sind (Kunkel und Watowich 2002). Kürzlich wurde beschrieben, dass das Protein nach der Interaktion mit tRNS oligomerisiert und damit in der Lage ist, mit der zytoplasmatischen Domäne vom E1 zu interagieren (Nakai et al., 2006).

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung dieses Proteins in HCV Core-Protein exprimierenden Zellen zeigten, dass es sowohl am ER als auch an den Mitochondrien nachgewiesen wird (Schwer et al., 2004; Suzuki et al., 2005). Jedoch wurden diese Erkenntnisse in Lokalisationsstudien des HCV Core-Proteins in infizierten Zellen nicht bestätigt (Rouillé et al., 2006). Obwohl der C-Terminus des HCV Core-Proteins von der ER residenten Signal Peptidase prozessiert wird (McLauchlan et al., 2000), gelang Rouillé et al. keine Lokalisierung mit Calnexin, Calreticulin oder der Protein Disulfid Isomerase, die als ER Marker in diesen Kolokalisierungsstudien dienten. Mit dem E1-E2 Heterodimer kolokalisierte das HCV Core-Protein ebenfalls nicht. Jedoch wurde das HCV Core-Protein an der Oberfläche von „*lipid droplets*“ nachgewiesen. Das HCV Core-Protein kolokalisierte

teilweise mit dem Nichtsstrukturprotein NS3, das überwiegend in Assoziation mit dem ER nachgewiesen wurde.

Es wurde postuliert, dass die Orte, an denen „*lipid droplets*“ gebildet werden, die Bedingungen bieten, die das „*assembly*“ begünstigen. Möglicherweise findet eine Anreicherung viraler und zellulärer Faktoren in den „*lipid droplets*“ statt, die für die Bildung von Nukleokapsiden benötigt werden. Es wurde vermutet, dass die Morphogenese bei HCV in zwei räumlich voneinander getrennten Schritten erfolgt, wobei zuerst Nukleokapsiden gebildet werden und danach das „*budding*“ der viralen Partikel stattfindet.

Die Rolle des HCV Core-Proteins bei der Induktion von Apoptose ist sehr umstritten, was teilweise auf die Anwendung von unterschiedlichen Zellen zurückgeführt werden kann (McLauchlan 2000). Aufgrund von Experimenten in einem Mausmodell wurde vermutet, dass das HCV Core-Protein als Kofaktor bei der Zellproliferation und möglicherweise bei der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms eine Rolle spielt (Ray et al., 1996). Der mögliche Beitrag zur Etablierung einer HCV persistenten Infektion wurde dadurch unterstützt, dass die HCV IRES („*internal ribosomal entry site*“) abhängige Translation durch Bindung des Core-Proteins an dieser Struktur blockiert wurde, wodurch eine Regulation auf Translationsebene stattfinden könnte. (Li et al., 2004).

Die Wirkung des HCV Core-Proteins auf das RNS-Interferenzsystem ist von Wang et al., getestet worden (Wang et al., 2006). Dieses System funktioniert in der eukaryotischen Zelle wie eine Art Sensor für die doppelsträngige RNS (dsRNS), die z.B. während der Virusreplikation generiert wird. Danach wird die dsRNS von der RNAase, Dicer, in 21 bis 23 Nukleotide lange Fragmente degradiert. Anschließend paaren sich diese Fragmente mit der mRNA und die Duplex wird von anderen Ribonukleasen abgebaut (Bagasra und Prilliman 2004). In ihren Studien stellten Wang et al. fest (Wang et al., 2006), dass das HCV Core-Protein, die durch die virale dsRNS ausgelöste, antivirale Antwort hemmte. Grund dafür waren allerdings nicht die RNS bindenden Eigenschaften des HCV Core-Proteins, sondern dessen direkte Interaktion mit dem Enzym Dicer. Viren aus verschiedenen Familien generieren Proteine oder RNS, die mit verschiedenen Komponenten des Interferenzsystems interagieren und sie hemmen (Schütz und Sarnow 2006).

### 1.2.2 *Flaviviren*

Der C-Terminus des reifen Core-Proteins wird durch die virale Protease NS2B/3 auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums generiert (Rice 1996). Das Protein besitzt positiv geladene Bereiche, die sehr wahrscheinlich eine Wechselwirkung mit

der viralen RNS ermöglichen. Allerdings ist bisher kein Sequenzmotiv identifiziert worden, das für die Interaktion mit der RNS verantwortlich ist (Mandl 2004).

In Lösungen aus gereinigtem Protein kommt das Core-Protein des Gelbfieber Virus, des Dengue Virus und des „*Tick-Borne Encephalitis*“ (TBE) Virus als Dimer vor (Jones et al., 2003; Kiermayr et al., 2004). Core-Protein Dimere des TBE Virus wurden nach Behandlung mit Detergenzien aus Virionen isoliert. Diese Dimere waren nur in Anwesenheit von *in vitro* transkribierten RNS oder DNS Oligonukleotiden in der Lage Nukleokapsid ähnliche Partikel zu bilden. Allerdings scheint es so, als ob das Kapsid-Protein von Flaviviren in den Virionen keine eindeutig bestimmbare Struktur aufweist (Kiermayr et al., 2004). Bei kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen von Virionen des Dengue Virus war eine geordnete Nukleokapsidstruktur nicht erkennbar, was die Hypothese unterstützt, dass das Kapsid-Protein von Flaviviren ähnlich wie ein Histon fungieren könnte (Mukhopadhyay et al., 2005).

Der Einfluss von Deletionen im Gen des Core-Proteins auf die *in vivo* Infektiösität ist für das TBE Virus untersucht worden (Mandl 2004). In diesen Studien wurde eine Reihe von TBE Virus Mutanten charakterisiert, die in drei Gruppen unterteilt waren. In der ersten Gruppe befinden sich Mutanten mit Deletionen zwischen 1 bis 16 Aminosäuren ab Position 28 in der Sequenz des Core-Proteins. Obwohl die  $\alpha$ -Helices 1 und 2 teilweise deletiert wurden, waren diese Viren in der Lage infektiöse Partikel zu bilden und *in vivo* (Maus Modell) attenuiert. Die zweite Gruppe bestand aus Mutanten mit Deletionen von 19 bis 30 Aminosäuren, wobei die  $\alpha$ -Helix 2 (interne hydrophobe Domäne) zu einem großen Teil oder vollständig deletiert wurde. Diese Mutationen verschlechterten die Infektiösität der Viren eindeutig oder hoben sie komplett auf. Allerdings traten in der Sequenz des Core-Proteins, C-terminal der Deletionen, kompensierende Mutationen auf, die die Infektiösität dieser Viren wiederherstellten, jedoch zeigten sie einen attenuierten Phänotyp *in vivo*. Die Mutationen (an einer, zwei oder drei Stellen) erhöhten die Hydrophobizität des Proteins und ersetzten somit die Funktion des fehlenden hydrophoben Fragmentes (fast ein Drittel des reifen Core-Proteins). Den Mutanten der dritten Gruppe fehlten 62 Aminosäurereste des Core-Proteins und durch Mutationen an dessen C-Terminus wurde eine Signalsequenz erschaffen, die die Spaltung der viralen Protease NS2B/3 unabhängig von der Signalase ermöglichte. Diese Mutanten waren in der Lage zu replizieren, generierten allerdings kapsidlose, subvirale Partikel, die nicht infektiös waren, aber eine schützende Immunantwort hervorriefen.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz zu den anderen Strukturproteinen von Pestiviren ist über die Funktion des Core-Proteins so gut wie nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisierung vom Core-Protein in infizierten Zellen bestimmt und seine RNS bindende Aktivität charakterisiert werden.

Die Charakterisierung des Core-Proteins wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

- Klonierung, Expression und Reinigung des pestiviralen Core-Proteins in prokaryotischen Zellen (*E.coli*)
- Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das Core-Protein von Pestiviren
- Nachweis des Core-Proteins von Pestiviren verschiedener Spezies in Virionen und infizierten Zellen
- Subzelluläre Lokalisierung des Core-Proteins in infizierten Zellen
- Charakterisierung der Nukleinsäure bindenden Aktivität des Core-Proteins

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Eukaryotische Zelllinien

MDBK Zellen („*marbin darby bovine kidney*“):

ATCC Nummer: CCL-22

SK-6 Zellen („*swine kidney*“ Zelllinie):

Institut für Virologie, Gießen

#### 2.1.2 Prokaryotische Zellen

*E.coli* K12-Stamm HB101

Genotyp *supE44 hsdS20* ( $r_B^- m_B^-$ ) *recA13 ara-14 proA2 lacY1GalK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*

*E.coli* Stamm Rosetta<sup>TM</sup> (BL21)

Genotyp  $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-)$  *gal dcm* pRARE<sup>6</sup> (Cam<sup>R</sup>) (Fa.Novagen)

#### 2.1.3 Virusstämme

##### **BVDV-1**

Stamm **C86**

Stamm **New York**

Stamm **Osloss**

Stamm **519**

Stamm **721**

Stamm **S10**

Stamm **11468**

##### **BVDV-2**

Stamm **890**

Stamm **Gi-4**

##### **BDV**

Stamm **BD31**

Stamm **AZ79**

## KSPV

### Stamm Alfort

Alle Stämme bzw. Isolate standen im Institut für Virologie (FB Tiermedizin) der Justus Liebig Universität zur Verfügung

#### 2.1.4 Antikörper

##### *Primärantikörper:*

mAk $\alpha$ 18:	gegen das virale Strukturprotein E2 von KSPV gerichteter monoklonaler Antikörper (Weiland et al., 1990)
mAk 24/16:	gegen das virale Strukturprotein E <sup>rns</sup> von KSPV gerichteter monoklonaler Antikörper (Weiland et al., 1990)
mAk Code 4:	gegen das pestivirale Nichtstrukturprotein NS3 gerichteter monoklonaler Antikörper (Corapi et al., 1990)
anti-Ge-1-Serum:	humanes Serum, das das Ge-1 Protein von „P-Bodies“ erkennt (Yu et al., 2005)
anti-PDI-Serum:	gegen die Protein Disulfid Isomerase gerichtetes Kaninchenserum (Fa. Sigma)

##### *Sekundärantikörper:*

Ziege anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert	Fa. Dianova
Ziege anti-Maus IgG, FITC-konjugiert	Fa. Dianova
Ziege anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert	Fa. Dianova
Ziege anti-Human IgG, FITC-konjugiert	Fa. Dianova
Ziege anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert	Fa. Dianova

2.1.5 *Enzyme*

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fa. Boehringer Mannheim
<i>DpnI</i>	Fa. New England BioLabs
„ <i>Human placenta ribonuclease inhibitor</i> “ (HPRI)	Fa. Takara
<i>Pfu</i> DNS-Polymerase	Fa. Stratagene
RNase A	Fa. Alexis
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England BioLabs/Takara
Sp6 RNS-Polymerase	Fa. Takara
<i>Taq</i> DNS-Polymerase	Fa. New England BioLabs
T4 DNS-Polymerase	Fa. Takara
T4 Polynukleotidkinase	Fa. New England BioLabs
Trypsin	Fa. Sigma

2.1.6 *Chemikalien*

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Fa. Roth
Acrylamid (reinst, 2x krist.)	Fa. Serva
Agar-Agar	Fa. DIFCO
Agarose	Fa. GIBCO (Invitrogen Co.)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fa. Aldrich
Ampicillin	Fa. Fluka
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fa. Fluka
Bromophenolblau	Fa. Sigma
Calciumchlorid	Fa. Merck
Chloroform	Fa. Fluka
(Desoxy)ribonukleotide	Fa. Boehringer Mannheim
Ethanol	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer Mannheim

Harnstoff	Fa. United States Biochemical
Isopropanol	Fa. Fluka
Methanol	Fa. Fluka
Natriumacetat	Fa. Merck
Natriumhydroxid	Fa. Fluka
Penicillin	Fa. Sigma
Phenol	Fa. Appligene
Rubidiumchlorid	Fa. Fluka
Schwefelsäure	Fa. Fluka
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. ICN
Streptomycin	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Fluka
Triton X-100	Fa. Fluka
TWEEN 20	Fa. Fluka
Wasser, RNase frei	Fa. Roth

#### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Fa. Braun
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Nitrozellulosemembran	Fa. Pall
Nukleobond AX 100-Säulen	Fa. Macherey & Nagel

#### 2.1.8 Geräte

Glaswaren	Fa. Schott
Kühlwasserbad RM6	Fa. LAUDA
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA
Mikroskop Eclipse TS 100	Fa. Nikon
Pipetten	Fa. Eppendorf; Fa. Gilson; Fa. Biohit
Reinstwasseranlage	Fa. Purolab
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Fa. AGFA
Spannungsgeräte	Fa. Biorad; Fa. Strategene

Vortex	Fa. IKA
Waagen	Fa. Mettler
Wasserbad	Fa. Braun

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten

#### 2.2.1.1 Medien und Puffer

Dulbecco's MEM (DMEM)

mit Zusätzen (CCM-34):	Dulbecco's MEM Pulvermedium, GIBCO (Invitrogen Corporation)	
	0,0178g/l	L-Alanin
	0,7g/l	Glycin
	0,075g/l	L-Glutaminsäure
	0,025g/l	L-Prolin
	0,1mg/l	Biotin
	0,025g/l	Hypoxanthin
	3,7g/l	NaHCO <sub>3</sub>

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

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

PBS defiz:	0,25g/l	KCl
	1,8g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

	0,25g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10g/l	NaCl
PBS:	PBS defiz.	
	0,1g/l	CaCl <sub>2</sub>
	0,1g/l	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O

*Medien für die Arbeit mit Myelomzellen und Hybridomen*

Myelom Medium:	450ml	DMEM
	75ml	FKS
	5ml	Glutamin (100mM)
	1,75ml	β-Mercaptoethanol Lösung (100µl in 100ml defiz. PBS)
	5ml	Hepes-Lösung (1M in defiz. PBS)
	1ml	Penicillin/Streptomycin (500x)
	Hybridom Medium:	200ml
100ml		Medium F-10 (Fa. Gibco-Invitrogen)
100ml		Medium F-12 (Fa. Gibco-Invitrogen)
75ml		FKS
5ml		OPI Supplement (Fa.Sigma-Aldrich) (in 10ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> gelöst)
5ml		Glutamin (100mM)
5ml		Hepes-Lösung (1M in defiz. PBS)
1ml		Penicillin/Streptomycin (500X)
HAT Medium:		500ml
	10ml	HAT Supplement (in 10ml DMEM gelöst)
HT Medium:	500ml	Hybridom-Medium
	10ml	HT Supplement (in 10ml CCM-34 gelöst)

*2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten*

Geräte:	Brutschränke mit CO <sub>2</sub> Begasung, (Fa. Forma Scientific; Fa. Memmert) Sterilbänke LaminAir (Fa.Heraeus)
Zellen:	SK-6, MDBK, Sp2/0, Hybridomzellen

Medien: Dulbecco's MEM, Myelom Medium, Hybridom-Medium,  
HAT Medium, HT Medium, Trypsinlösung

Alle Zellen wurden in Brutschränken bei 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken durchgeführt.

Nach Wachstum der Zellen zu einem konfluenten Zellrasen erfolgte die Passage der Zellen.

Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen anschließend mit 5ml Trypsin-Lösung inkubiert. Bevor sich die Zellen von der Platte ablösten, wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen noch zwei bis drei Minuten in den Brutschrank gestellt. Hiernach erfolgte die Aufnahme der Zellen in Medium und in geeigneten Verdünnungen die Verteilung auf frische Gewebekulturschalen. Um Sp2/0 bzw. Hybridomzellen zu passagieren, konnte auf eine Trypsinbehandlung vor dem Abspülen der Zellen vom Boden der Gewebekulturschale verzichtet werden, da diese Zellen nicht fest am Boden der Kulturschale haften.

### 2.2.1.3 Elektroporation von RNS in SK6-Zellen

Zellen: SK-6 Zellen  
Geräte: BioRad Gene Pulser® II (Fa. BioRad)  
Elektroporationsküvette 0,2µm (Molecular BioProducts)  
Laborfuge 400R (Fa. Heraeus)  
Medien  
und Puffer: Trypsinlösung, Dulbecco's MEM, PBS defiz.

Die Transfektion von RNS in SK6-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierbei wird mittels eines kurzen elektrischen Impulses die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert und die RNS kann auf diese Weise in das Zellinnere gelangen. Für die Elektroporation von RNS wurden 10<sup>7</sup> Zellen abtrypsiniert und in 10ml Dulbecco's MEM aufgenommen. Die Zellen wurden 4min bei 235 x g abzentrifugiert und dann in 10ml PBS defiz. aufgenommen und resuspendiert. 1µg Transkript in H<sub>2</sub>O wurde zugegeben. Die Elektroporation wurde bei unendlichem Widerstand, 950µF und 0,22kV mit einem Puls durchgeführt. Die Zellen pro Ansatz wurde in 2ml Dulbecco's MEM auf 6-„well“-Gewebekulturschalen ausgesät und für 24h im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.1.4 Indirekter immunhistochemischer Nachweis

##### 2.2.1.4.1 Indirekte Immunperoxidase

Zellen:	SK-6, MDBK		
Antikörper:	Primärantikörper (Verdünnung in PBS+0,01% Tween 20): mAk Code 4 (1:10) Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS+0,01% Tween 20): Meerrettich gekoppelter Ziege anti-Maus IgG (1:1000)		
Lösungen:	Substrat:	9ml	Aminoethylcarbazol (AEC) in Dimethylformamid (4mg/ml)
		1ml	50mM Na-Acetat pH 5,2
		5µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)
			Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS, Octylglycosid (OG) 0,5% in PBS, PBS, PBS+0.01% Tween 20

Die infizierten Zellen wurden nach zweimaligen Waschen mit PBS für 20min bei 4°C mit PFA (4%) fixiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur 5min mit OG 0,5% permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 1h bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper in der angegebenen Konzentration. Die Zellen wurden vor Zugabe des Sekundärantikörpers zweimal für 5min mit PBS+0,01% Tween 20 gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG-Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 in PBS+0,01% Tween 20 verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur und zweifachem Waschen für jeweils 5min mit PBS+ 0,01% Tween 20 erfolgte die Detektion der Antikörperbindung durch Inkubation mit dem Substrat, das durch die Peroxidase in einem wasserunlöslichen roten Niederschlag umgesetzt wurde. Die Auswertung erfolgte unter einem Lichtmikroskop.

##### 2.2.1.4.2 Protein Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz

Zellen:	SK-6, MDBK
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Viren:	BVDV-1a (C86); BVDV-1b (Osloss); BVDV-2a (890);

	BVDV-2b (Giessen-4); BDV-1a (BD31); BDV-1 (AZ79); Giraffe; KSPV (Alfort <sub>tü</sub> )
Antikörper:	Primärantikörper (Überstand 1:5): mAks GRS-C1, -C2, -C3, -C4, -C5 und -C6; -Pol-1, -Pol-2, -Pol-3, -Pol-4, -Pol-5 und -Pol-6; Code 4 Sekundärantikörper: Cy3 markierter Ziege anti Spezies (Fa. Dianova)
Materialien:	Glas-Deckgläschen rund, 12mm Ø (Fa. MAGV)
Lösungen:	3% Paraformaldehyd in PBS; 3% Paraformaldehyd in PBS + 0,1% Triton X-100; 0,1% Fisch Haut Gelatine (FHG) (Fa. Sigma-Aldrich) in PBS; PBS; Waschpuffer (PBS + 0,1 % Tween 20) Einbettungsmedium (2.2.1.4.2.1)
Chemikalien:	DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Fa. Sigma)
Geräte:	Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert und Filtermodule (Fa. Zeiss)

SK-6 Zellen wurden mit KSPV und MDBK Zellen mit Pestiviren verschiedener Spezies mit einer MOI zwischen 0,1 und 0,5 in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 Prozent. Der Zellüberstand wurde verworfen und der Zellrasen mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Paraformaldehyd 20min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,1 Prozent Triton X-100 10min bei 4°C permeabilisiert.

Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation infizierter und nicht infizierter Zellen mit in 0,1% FHG 1:5 verdünntem Hybridom Überstand für 1h bei 37°C. Danach wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper 1: 500 1h bei 37°C inkubiert und erneut dreimal gewaschen wurden. Zum Schluss wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (siehe 2.2.1.4.2.2). Die Deckgläschen wurden abgetupft und umgedreht auf einen Tropfen Einbettungsmedium gelegt. Der Rand wurde mit Nagellack versiegelt und die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

#### 2.2.1.4.2.1 Einbettungsmedium

Mowiol        6g     Glycerin  
                 2,4g   Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol) (Fa. Sigma)  
Lösen in:     6ml    H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
                 12ml   0,2M Tris pH 8,5  
zentrifugieren bei 5000 x g 15min  
pro ml angesetztes Mowiol zugeben:  
0,1g 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO, Fa. Fluka)

#### 2.2.1.4.2.2 Färbung von Zellkernen mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)

Nachdem den Zellpräparaten die entsprechende Färbung unterzogen wurde, wurde die Kern DNS mit DAPI gefärbt. Hierfür wurden die Präparate mit einer DAPI Lösung (66µg/ml) 5min im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen erst zweimal 5min mit PBS und anschließend kurz mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

#### 2.2.1.5 Titration von Pestiviren

Für die Virustitration wurde mit Medium eine Verdünnungsreihe (1:10) von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-8</sup> hergestellt. 100µl jeder Verdünnung wurden in jeweils 4 Vertiefungen einer 96 „Well“ Platte pipettiert. Anschließend wurden 100µl einer Zellsuspension (2,2 x 10<sup>5</sup> MDBK/SK6-Zellen/ml in Kulturmedium mit 10% FKS) pro Vertiefung zugegeben und der Ansatz 72 Stunden bei 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung der Titration erfolgte über indirekte Immunperoxidase (siehe 2.2.1.4.1).

Titer wurden gemäß der Formel von Spaermann und Kärber berechnet und als TCID<sub>50</sub> angegeben (Kärber 1931).

#### 2.2.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration (BC-Mikroassay)

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurde das „BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit“ (Fa.Pierce) nach Angabe des Herstellers verwendet.

Die Proben werden hierzu mit PBS 1:50 bzw. 1:100 verdünnt. Für die Standardkurve wurde BSA (2mg/ml Stammlösung, Fa.Pierce) in Konzentrationen von 5µg/ml bis 500µg/ml in PBS verwendet. Die Reagenzien A und B aus dem Kit wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und

jeweils 200µl in Röhrchen vorgelegt, dann wurden 25µl der verdünnten Probe dazugegeben. Nach einer Inkubation von 30min. bei 60°C konnte die Extinktion zwischen 540 und 590nm photometrisch gemessen werden. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand der BSA-Standardkurve.

## 2.2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

### 2.2.2.1 Erzeugung rekombinanter Proteine

Bakterien:	<i>E.coli</i> Bakterien Stamm Rosetta <sup>TM</sup> (Fa. Novagen)
Puffer:	K-Phosphat Puffer: 23,1g           KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 125,4g           K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> bis 1l
Puffer A:	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300mM NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.5)
Puffer B:	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300mM NaCl, Imidazol 500mM, 0,1% Triton X-100, pH 7.5)
TB- Medium:	12g           Bacto Trypton 24g           Hefe Extrakt 4ml           Glyzerol 900ml       H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 100ml       K-Phosphat Puffer
Substanzen:	IPTG (Fa. AppliChem); Glukose (Fa. Roth); Ampicillin (Fa. Fluka); Chloramphenicol (Fa. AppliChem); His-Proteaseninhibitor-Cocktail (Fa.Sigma)
Geräte:	Schüttler (Fa. Infors); 1l Fermenter (Fa. New Brunswick Scientific, Co.); Magnetrührer (Fa. IKAMAG RCT); 1ml Ni <sup>++</sup> Sepharose <sup>TM</sup> Säule (Fa. Amersham)

*E.coli* Bakterien Stamm Rosetta<sup>TM</sup> (Novagen) wurden mit den Plasmiden p250, p940 oder p1141 (siehe 2.2.7) transformiert und auf LB Agar Platten [mit Ampicillin (100µg/ml) und Chloramphenicol (34µg/ml)] ausplattiert. Mit einer Bakterienkolonie wurden 25ml TB Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert (Vorkultur). Mit der Vorkultur wurden

1,5 Liter TB Mediumn, welches 100µg/ml Ampicillin, 34µg/ml Chloramphenicol und 1% Glukose enthielt angeimpft.

Die Bakterien wurden unter Schütteln kultiviert bis ein  $A_{600}$  Wert von 1,5-2 erreicht wurde. Anschließend wurde die Proteinsynthese mit Isopropyl-β-D-thiogalactopiranosid (IPTG, 1mM Endkonzentration) drei Stunden lang bei 37°C induziert.

Die Kultur wurde anschließend bei 4225 x g abzentrifugiert und in Puffer A in Anwesenheit eines Proteaseninhibitor-Cocktails (1ml pro 20g bakterielles Pellet) resuspendiert.

Die zytosolischen Proteine wurden durch dreimaliges Frieren-Tauen des Bakterienpellets freigesetzt. Anschließend wurde die im Lysat vorhandene bakterielle, chromosomale DNS durch Ultraschall geschert, wodurch die Viskosität spürbar abnahm.

Danach wurde das Lysat eine Stunde bei 123342 x g und 4°C abzentrifugiert und mit einem 0,45µm Filter filtriert. Das filtrierte Material wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,7ml/min auf eine 1ml Ni<sup>++</sup> Sepharose<sup>TM</sup> Säule (Nickel Säule) aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 5ml imidazolhaltigem Puffer A (50mM) gewaschen.

Die Elution des Proteins erfolgte an einer Chromatographie-Anlage mittels eines isochratischen Imidazol Gradienten (Flussrate: 0,7ml/min), der durch die Mischung von Puffer A und B entstand. Dabei wurde 1ml der Fraktionen gesammelt.

Von jeder Fraktion wurden 10µl auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach einer Coomassie-Färbung (siehe 2.2.5.2) diese identifiziert, in denen das Protein eluierte. Anschließend wurden die Fraktionen, bei denen die größte Proteinmenge auftrat, vereinigt und mit Puffer A zu einer Imidazol Endkonzentration von 30mM verdünnt. Das verdünnte Lysat diente als Ausgangsmaterial für eine zweite Aufreinigung, die genauso erfolgte wie die erste. Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden auch durch Coomassie-Färbung analysiert.

Die besten Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

#### 2.2.2.2 Immunisierung von Mäusen

Als Antigene für die Gewinnung monoklonaler Antikörper dienten gereinigte Core (KSPV p447 und BVDV ncp7) und NS5B Proteine. Jeweils 3 weibliche, 6 Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden mit rCore (KSPV/BVDV) oder mit rNS5B intraperitoneal inokuliert. Pro Tier und Immunisierung wurden 40µg rCore bzw. 25µg rNS5B in 100µl PBS und 100µl inkomplettem freundlichem Adjuvans gelöst. Die Immunisierungen erfolgten an Tag 0 („*Priming*“), 14, 28 und 49 („*Boost*“), am Tag 0 und 25 wurde den Tieren Blut entnommen.

### 2.2.2.3 Gewinnung und Ausplattierung von „Feeder“-Zellen

Das klonale Wachstum einzelner, frisch fusionierter Hybridome ist meist unzureichend.

Die Hybridome sind empfindlich gegenüber Zelltoxinen und benötigen u.a. Wachstumsfaktoren wie IL-6 und Spurenelemente wie Selen. Das Wachstum kann durch den Einsatz von „Feeder“-Zellen, z.B. Fibroblasten und Makrophagen unterstützt werden, wenn die fusionierten Zellen mit diesen kokultiviert werden.

Als „Feeder“-Zellen wurden Peritoneal-Exsudat-Zellen von Balb/c Mäusen einen Tag vor der Fusion gewonnen.

Die Euthanasie erfolgte nach der Betäubung mit CO<sub>2</sub> durch cervikale Dislokation. Die Mäuse wurden in 70% Ethanol getaucht und auf Styropor fixiert. Nach der Desinfektion wurde die Haut von Xyphoid bis Inguinalregion gespalten und die abdominale Muskelschicht freipräpariert, ohne die Bauchhöhle zu eröffnen. Fünf ml Hapes-Medium wurden unter das Peritoneum injiziert. Der Bauch wurde leicht massiert, um die Flüssigkeit zu verteilen, bevor sie mit einer 1ml Spritze abgesaugt wurde. Die Zellen wurden in HAT Medium aufgenommen und auf 14 Mikrotiterplatten (100µl Zellsuspension/Vertiefung) verteilt.

### 2.2.2.4 Gewinnung der Splenozyten (Milzzellen)

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch cervikale Dislokation nach Betäubung mit CO<sub>2</sub>. Zur Entnahme der Milz wurden die Mäuse auf dem Rücken fixiert, nach Desinfektion mit 70% Ethanol wurde die Haut vom Xyphoid bis zur Inguinalregion durchtrennt und die Bauchmuskulatur freipräpariert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Milz steril entnommen und in eine Petrischale mit 10ml Hapes-Medium gegeben. Das noch anhaftende Bindegewebe wurde entfernt und die Milzkapsel an einem Pol eröffnet. Die Milzpulpa wurde vorsichtig durch die zuvor genannte Öffnung herausgespült. Hierzu wurde die Kanüle einer mit Hapes-Medium gefüllten 10ml Spritze am entgegengesetzten Pol der Milz durch die Kapsel gestochen und mit geringem Druck gespült. Der Vorgang wurde bis zu einer deutlichen Entfärbung der Milz wiederholt. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach kurzer Zeit sedimentierten die größeren Gewebestücke und der zellhaltige Überstand wurde in ein neues 50ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Die Splenozyten wurden bei 300 x g für 5min zentrifugiert und zweimal mit Hapes-Medium gewaschen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Alliquot 1:10 mit Türk's-Färbelösung versetzt und in einer Zählkammer nach *Neubauer* (siehe 2.2.2.5) unter einem Umkehrmikroskop ausgezählt.

#### 2.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Lösungen:                      Trypanblau-Färbelösung (Fa. Cambrex)  
                                      Türk's-Färbelösung (Fa. Merck)

Geräte:                         *Neubauer* Zählkammer (Fa. Assistent)

Zellen aus einer Suspension wurden 1:10 in Trypanblau-Färbelösung (Myelom Zellen) oder Türk's-Färbelösung (Leukozyten) verdünnt und in einer Zählkammer nach *Neubauer* unter einem Invertmikroskop ausgezählt. Die Auszählung berücksichtigte 4 große Quadrate der Kammer (Diagonale). Gezählt wurden nur lebende Zellen ohne sichtbare Blaufärbung. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl (Zellen/ml) ermittelt.

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 4 \times V \times 1000/3.2$$

$n$  = Zellen in 4 Großquadraten

$V$  = Verdünnungsfaktor

#### 2.2.2.6 Fusion von Splenozyten und Myelomzellen

Zur Fusion wurde die Myelomzelllinie Sp2/0 verwendet. Diese wurden im Verhältnis 1:3 zu den Splenozyten gegeben. Die Zellen wurden bei 300 x g für 4min pelletiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde dem Pellet über einen Zeitraum von einer Minute unter leichtem Schwenken in einem 37°C Wasserbad 1ml PEG 1500 Lösung zugegeben. Danach gab man zur Verdünnung des PEG zunächst 1ml HEPES-Medium über einen Zeitraum von 60s, hinzu 3ml HEPES-Medium innerhalb von 90s und 10ml HEPES-Medium über 2min. Die fusionierten Zellen wurden bei 300 x g für 5min pelletiert, in 145ml HAT-Medium resuspendiert und auf 14 Mikrotiterplatten mit „Feeder“ Zellen (100 µl/Vertiefung) verteilt. Die Platten wurden 9 bis 10 Tage im Brutschrank inkubiert, bis das erste Screening stattfand.

### 2.2.2.7 Selektion von Hybridomzellen

Die bekannteste Methode für die Selektion von Hybridomzellen ist die Verwendung von Myelomzelllinien, denen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) fehlt. Bei Kultivierung dieser Zellen in HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin, und Thymidin) blockiert Aminopterin die Biosynthese von Nukleotiden. Hybridomzellen produzieren HGPRT und können, wenn das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin supplementiert ist, auf einem alternativen Weg Nukleotide synthetisieren (Harlow und Lane 1998).

Zur Selektion wurden die fusionierten Zellen in HAT-Medium kultiviert. Im Abstand von 2 bis 3 Tagen wurden die Platten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf das Wachstum von Zellkolonien kontrolliert, um den geeigneten Zeitpunkt für die Untersuchung der gewachsenen Hybridomzellkolonien auf die Produktion von Antikörpern zu ermitteln. Nach ca. 9 Tage Selektion wurde von HAT-Medium auf HT-Medium umgestellt und das erste Screening durchgeführt.

### 2.2.2.8 ELISA zum Screening von Hybridom Überständen

Antikörper:	Maus Präimmunserum Maus Immunserum Ziege anti-Maus IgG Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Fa. Dianova)
Protein:	Nickel-Säule gereinigte KSPV bzw. BVDV Core Proteine und KSPV NS5B Protein
Blockierungslösung:	Milchpulver 4% in PBS+Tween 20 (0.1%)
Medium:	HAT Medium
Lösungen:	„Coating“ Puffer (0,1 M Na-Bicarbonat, pH 9,5; 70ml 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> und 30ml 0,1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) PBS + Tween 20 (0.1%) TMB-Puffer (100 mM Na-Acetat) TMB-Substrat-Stock (10 mg TMB (Tetramethylbenzidine; Fa.AppliChem) in 4 ml DMSO) TMB-Substrat (9 ml TMB-Puffer + 1 ml TMB-Substrat-Stock + 1,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )

Stopplösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz. 1:4 verdünnt in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>)

Geräte: ELISA-Reader Spectra II (Fa. SLT)  
TSP-Platten („*Transferable Surface Plate*“; Fa. Renner)  
96 „*Well*“ Zellkultur Mikrotiterplatte (Fa. Nunc)  
Mehrkanalpipetten (Fa. Biohit)

Die optimale Proteinkonzentration für den ELISA Test wurde mit Hilfe eines negativen Serums (Präimmenserum einer Maus) bzw. eines positiven Serums (Serum der immunisierten Maus) bestimmt.

Hierfür wurde das entsprechende gereinigte Protein (Proteinkonzentration 1µg/µl bei den Core-Proteinen; 0,5µg/µl beim NS5B Protein) 1:500, 1:1000, 1:2500 und 1:4000 in „*Coating*“ Puffer verdünnt. In einem Doppelansatz wurden von jeder Verdünnung 100µl auf die Vertiefungen einer 96 „*Well*“ Platte verteilt. Diese wurde mit einer „*TSP*“-Platte abgedeckt und 1h bei 37°C inkubiert. Bei den „*TSP*“-Platten handelt es sich um Platten mit 96 Projektionen, deren Flächen mit Protein beschichtet werden und die wie ein Deckel auf eine Mikrotiterplatte passen. Nach der Inkubation wurden sowohl die 96 „*Well*“ Platten als auch die „*TSP*“-Platten dreimal gewaschen. Danach wurden pro „*Well*“ 100µl einer 4%igen Milchpulverlösung zugegeben und beide Platten 1h bei 37°C inkubiert, bevor sie mit PBS-Tween 20 (0,1%) gewaschen wurden. Danach verdünnte man das positive und negative Serum jeweils 1:100 in HAT Medium und pipettierte 100µl davon zu jeder Proteinverdünnung. Die Platten wurden wiederum 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden beide Platten, wie oben beschrieben, gewaschen und die „*TSP*“-Platte auf eine Platte mit „*U*“ förmigen Vertiefungen transferiert, in der bereits 50µl Ziege anti-Maus IgG Meerrettich-Peroxidase konjugierter Antikörper vorlagen, der 1:5000 in PBS-Tween 20 (0,1%) verdünnt wurde. Anschließend wurde die „*TSP*“-Platte gewaschen und auf eine 96 „*Well*“ Mikrotiterplatte transferiert, in der 100µl TMB-Substrat vorgelegt waren. 15 bis 20 min nach Inkubation mit dem Substrat im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl sog. Stopplösung gestoppt. Im *ELISA-Reader* wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 430nm gemessen (Referenzwellenlänge 620nm).

Die optimale Proteinverdünnung war für die Core-Proteine 1:1000 und für das NS5B 1:500. Bei dieser Proteinkonzentration blieb die OD des positiven Serums noch konstant und unterschied sich von der des negativen Serums um einen Faktor 30. Als „*cut off*“ wurde ein OD Wert von 0,1 gewählt, bei dem das positive Serum hoch verdünnt war (1:4000), aber noch ein um Faktor 10 stärkeres Signal zeigte.

#### 2.2.2.9 Screening von Hybridomzellen

Das erste Screening fand statt, nachdem die Klone etwa 30% des Bodens der Vertiefungen bedeckten, was nach etwa 9-12 Tagen der Fall war. Dazu wurden 100µl Medium aus jeder Vertiefung abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Das abgenommene Medium wurde mit Hilfe des indirekten ELISAs auf die Produktion spezifischer Antikörper untersucht. Hierfür wurde der Test wie bereits beschrieben durchgeführt, wobei Hybridom Überstände als Erstantikörper dienten.

Die Vertiefungen, deren Überstände eine  $OD \geq 0.1$  erreichten, wurden vorläufig als positiv bewertet, d.h. solange bis das Ergebnis in einem zweiten Screening bestätigt werden konnte.

#### 2.2.2.10 Klonierung positiver Hybridome

Die Monoklonalität der Zellkolonien wurde durch mehrfache Reklonierung gewährleistet, wobei die „*limited-dilution*“- Methode angewandt wurde. 96 „Well“-Platten wurden mit 100µl Hybridom Medium je Vertiefung beschickt. Zellen aus den als positiv identifizierten Vertiefungen wurden vorsichtig resuspendiert und 100µl der Zellsuspension in die erste Vertiefung A1 überführt. Ausgehend von der ersten Vertiefung wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in den Vertiefungen A1 bis H1 durchgeführt. Danach wurden je 100µl Hybridom-Medium in die vorgenannten Vertiefungen zugegeben. Ausgehend von der ersten Reihe wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe über zwölf Reihen mit einer Mehrkanalpipette hergestellt. Abschließend wurden weitere 100µl Hybridom-Medium in jede Vertiefung pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 10 bis 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur Identifikation positiver Klone wurde der ELISA analog zum Screening verwendet. Die Hybridome wurden erneut rekloniert und von drei Subklonen jedes Hybridoms wurden drei Replikas eingefroren (ca. 10<sup>6</sup> Zellen/ml).

#### 2.2.2.11 Produktion von mAbs

Klone, die stabil Antikörper gegen das entsprechende Protein produzierten, wurden auf Kulturschalen mit 25cm Durchmesser expandiert. Der Kulturüberstand von den Hybridomen wurde abgenommen, 10min bei 4500rpm geklärt und der zellfreie Überstand bei -20°C eingefroren.

2.2.2.12 *Isotypisierung der mAks mit einem kommerziellen vorgefertigten Test (ImmunoPure<sup>®</sup> Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (HRP/ABTS))*

Dieses Kit ermöglicht eine schnelle und sensitive Bestimmung der Subtypen und Isotypen muriner, monoklonaler Antikörper (IgA, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, und IgG<sub>3</sub>) sowie der leichten Ketten (kappa und lambda), wobei der Nachweis auf einem ELISA-Format mit fertig verdünnten Reagenzien basiert. Der „assay“ wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.13 *Bestimmung der Epitope der anti Core-Protein mAks*

Bakterien:	<i>E.coli</i> Stamm Rosetta <sup>™</sup> (Novagen)
Plasmide:	KSPV Core: p250; pCore 6; pCore 8; pCore 11; pCore 14 BVDV Core: p940; pCore 26; pCore 27; pCore 28
Medium:	LB (100µg/ml Ampicillin, 34µg/ml Chloramphenicol)

Die Bakterien *E.coli* Stamm Rosetta<sup>™</sup> wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und auf LB Platten ausgestrichen. Mit einer Bakterienkolonie wurden 2ml LB Medium angeimpft und die Bakterienkultur bei 37°C inkubiert. Wenn eine OD von ~0,6-1 erreicht wurde, wurden die Kulturen halbiert und eine Hälfte mit IPTG 1mM 30min induziert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation abgeerntet und die Pellets von induzierten und nicht induzierten Kulturen mit SDS-PAGE (siehe 2.2.5.1) aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Western Blot (siehe 2.2.5.3), bei dem die Überstände der anti Core mAks: GRS-C1; -C2; -C3; -C4; -C5; -C6; -C7 und -C8 als Primärantikörper verwendet wurden.

2.2.3 *Kolokalisierungsstudien*

2.2.3.1 *Kolokalisierung von Struktur- bzw. Nichtstrukturproteinen mit dem ER*

Zellen:	SK-6
Virus:	KSPV Stamm Alfort <sub>tü</sub>
Antikörper:Primärantikörper (1:5):	mAks anti Core GRS-C3; anti E1 GRS-E1-8E2; anti E <sup>ms</sup> 24/16; anti E2 a18; anti

	NS5B GRS-Pol-3; anti PDI (1:250) (Fa.Sigma)
Sekundärantikörper (1:500):	Cy3 markierter Ziege anti Maus (Fa.Dianova); FITC markierter Ziege anti Kaninchen (Fa.Dianova)
Materialien:	Glas-Deckgläschen rund, 12mm Ø (Fa. MAGV)
Lösungen:	3% Paraformaldehyd in PBS; 3% Paraformaldehyd in PBS + 0,1% Triton X- 100; 0,1% Fisch Haut Gelatine (FHG) (Fa. Sigma-Aldrich) in PBS; PBS; Waschpuffer: PBS + 0,1 % Tween 20
Mikroskop:	DMI 6000 CS Trino (Fa. Leica)
Verarbeitungssoftware:	TCS SP-5 (Fa. Leica)

Die Zellen wurden infiziert, wie bereits beschrieben fixiert und permeabilisiert (siehe 2.2.1.4.2). Anschließend wurden die Zellen 1h bei 37°C mit Hybridom Überstand und dem anti PDI Serum inkubiert, die in 0,1 Prozent FHG verdünnt waren. Dann wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit dem Cy3 gekoppelten anti Maus mAk bzw. dem FITC gekoppelten anti Kaninchen Sekundärantikörper 1h bei 37°C inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Die Präparate wurden, wie bereits erwähnt, vorbereitet und unter dem konfokalen Lasermikroskop bei einer 1575X Vergrößerung (Objektiv 63X; Okular 25X) beurteilt.

### 2.2.3.2 Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Mitochondrien

Zellen:	SK-6
Virus:	KSPV Stamm Alfort <sub>tü</sub>
Antikörper:	Primärantikörper: anti Core-Protein mAk GRS-C1 (1:5) Sekundärantikörper: FITC gekoppelter anti Maus (1:200) (Fa. Dianova)
Lösungen:	Waschlösung: PBS + 0,1% Tween 20;
Antikörperverdünnungslösung:	0,1% Fisch Haut Gelatine (FHG) (Fa. Sigma-Aldrich)

Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, infiziert (siehe 2.2.1.4.2) und die Mitochondrien angefärbt (siehe 2.2.3.2.1). Anschließend wurden die Zellen mit dem anti Core-Protein mAk 1h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1h bei 37°C). Dann wurden die Zellrasen erneut gewaschen und die Präparate mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert (siehe 2.2.3.1).

#### 2.2.3.2.1 Färbung von Mitochondrien

Zellen:	SK-6
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Lösungen:	Fixierungslösung (3% PFA in Medium verdünnt); Permeabilisierungslösung (3% PFA in PBS verdünnt + 0,1% Triton X-100)
Chemikalien:	MitoTracker (Fa. Invitrogen)

Nachdem MitoTracker den Zellen in einer Endkonzentration von 250nM zugegeben wurde, wurden diese 40min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen und 15min bei 37°C fixiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10min mit Permeabilisierungslösung bei 4°C inkubiert, bevor sie ein letztes mal mit PBS gewaschen wurden.

#### 2.2.3.3 Kolokalisierung des Core-Proteins mit „lipid droplets“

Der Nachweis des Cores erfolgte, wie bei der Kolokalisierung des Core-Proteins mit dem ER (siehe 2.2.3.1), jedoch wurde der Sekundärantikörper mit FITC gekoppelt. Danach wurden die „lipid droplets“ angefärbt (siehe 2.2.3.3.1) und die Präparate mittels konfokaler Lasermikroskopie beurteilt (siehe 2.2.3.1).

##### 2.2.3.3.1 Färbung der „lipid droplets“ mit „Red Oil O“

Lösungen:	60% Isopropanol; 6% „Red Oil O“ (Fa. Sigma-Aldrich) in 60%igem Isopropanol (durch 0,45µm Filter filtriert)
-----------	---

Bei „*Red Oil O*“ handelt es sich, um einen rot-fluoreszierenden Farbstoff, der sich an die Lipide der „*lipid droplets*“ anlagert.

Fixierte Zellen wurden kurz mit 60% Isopropanol gewaschen und 2min mit sechs prozentigem „*Red Oil O*“ bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit 60% Isopropanol und danach mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

#### 2.2.3.4 Kolokalisierung des Core-Proteins mit „*P-Bodies*“

Zusätzlich benötigte Reagenzien zum Nachweis von „*P-Bodies*“

Antikörper: Primärantikörper: Humanserum (1:200) (von Dr. Donald B. Bloch, Harvard Medical School bereitgestellt)

Sekundärantikörper: FITC gekoppelter anti Human Antispezies (1:500) (Fa. Dianova)

Zuerst erfolgte der Nachweis des Core-Proteins in infizierten Zellen (siehe 2.2.3.1). Anschließend wurde der Zellrasen 1h bei 37°C mit dem Serum eines Humanpatienten inkubiert, das das in den „*P-Bodies*“ auftretende Protein Ge-1 erkennt (Yu et al., 2005). Dann wurden die Zellen dreimal gewaschen und mit dem Sekundärantikörper eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen und die Präparate für die konfokale Lasermikroskopie vorbereitet (siehe 2.2.3.1).

#### 2.2.3.5 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS3

Zusätzlich benötigte Reagenzien zum Nachweis von NS3

Antikörper: Alexa 488 markierter anti NS3 mAk Code 4 (0,5µg pro Ansatz)

Nachdem das Core-Protein in infizierten Zellen markiert wurde (siehe 2.2.3.1), wurden die Zellen mit dem direkt markierten anti NS3 mAk (siehe 2.2.3.5.1) 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Präparate 3x gewaschen und mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht (siehe 2.2.3.1).

#### 2.2.3.5.1 Direkte Markierung der mAks mit dem „Zenon<sup>®</sup> Mouse Labeling Kit“ (Fa. Pierce)

Mit diesem System können Antikörper markiert werden, indem das mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelte Fab Fragment an das Fc Fragment, des zu markierenden Antikörpers bindet. Dies hat den Vorteil in einem Präparat mehrere Proteine mit murinen mAks nachweisen zu können und außerdem wird auf diese Weise eine Kreuzreaktion vermieden.

1µg der gereinigten mAks Code 4 und GRS-C1 wurde mit Alexa 488 bzw. Alexa 647 direkt markiert. Die Markierung erfolgte grundsätzlich nach den Angaben des Herstellers.

Hierfür wurde der gereinigte mAk zuerst mit 5µl des entsprechenden konjugierten Fab Fragments 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5µl des „Zenon<sup>®</sup> blocking reagent“ zugegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die konjugierten Antikörper mußten innerhalb der nächsten 5min verwendet werden.

##### 2.2.3.5.1.1 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Lösungen:	Puffer A (1M Tris-HCl, pH 8,0)
	Puffer B (100mM Tris-HCl, pH 8,0)
	Puffer C (10mM Tris-HCl, pH 8,0)
	Puffer D (50mM Glycin, pH 3,0)
Geräte:	Pumpe: Varioperpex <sup>R</sup> II Pump (Fa. LKB Bromma)
Materialien:	HiTrap 1ml Protein G Säule (Fa. Amersham Bios)
	Dialyseschlauch 7,000MWCO (Fa. Pierce)

Vor der direkten Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen wurden die mAks Code 4 und GRS-C1 affinitätschromatographisch über Protein G Sepharose gereinigt. Dieses Protein bindet besonders stark an das Fc Fragment muriner Immunglobuline.

Der Hybridom Überstand wurde durch Zentrifugation bzw. Filtration vorgeklärt und Puffer A zugegeben (Endkonzentration 100mM).

Die Säule wurde mit 5ml Puffer A äquilibriert und die mAk-Lösung in einen geschlossenen Kreislauf für ca. 16 Stunden über die Säule gepumpt (Flussrate 1ml/min). Dann wurde die Säule zweimal hintereinander gewaschen, zuerst mit 10ml Puffer B und danach mit 10ml Puffer C. Die Elution der adsorbierten mAks erfolgte mit 10ml Elutionspuffer (Puffer D). Elutionsfraktionen von ca. 1ml wurden aufgefangen und sofort mit 1/10 Volumen Puffer A

neutralisiert. Die Säule wurde mit 10ml Puffer A gewaschen und bis zur Wiederverwendung in 20%-iger Ethanol-Lösung bei 4°C gelagert.

Von jeder Fraktion wurden 10µl durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.5.1) und die Proteine mit Coomassie Blau gefärbt (siehe 2.2.5.2). Die homogensten Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS bei 4°C 12 bis 14h. dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels eines BCA „assays“ (siehe 2.2.1.6) bestimmt.

#### 2.2.3.6 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS5B

Zusätzlich benötigte Reagenzien zum Nachweis des Core-Proteins

Antikörper: Alexa 647 markierter anti Core mAk GRS-C1 (0,5µg pro Ansatz)

Zuerst erfolgte der Nachweis des NS5B-Proteins (siehe 2.2.3.1), wobei in diesem Fall der anti Spezies Antikörper mit Cy3 gekoppelt war. Danach wurden die Zellen mit dem direkt markierten anti Core mAk (siehe 2.2.3.5.1) 1h bei 37°C inkubiert und dreimal gewaschen. Die Präparate wurden dann mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht (siehe 2.2.3.1).

#### 2.2.4 Protein-RNS Agarose Gel Bindungsassay

Lösungen: Bindungspuffer (10mM Tris-HCl, pH 7,4 + 1mM DTT + 1mM EDTA, 250mM NaCl); Transferpuffer (20mM Tris, 150mM Glycin, 20% Methanol pH 8,5)

Chemikalien: Poly-U; -A; -G Homopolymere; Poly I:C Homopolymere (Fa. Sigma-Aldrich); Ribonuklease Inhibitor: RNase Out (Fa. Invitrogen); Ribosomale RNS aus SK-6 Zellen (siehe 2.2.6.4); gereinigtes Core-Protein (siehe 2.2.2.1)

*In vitro* transkribierte RNS: vollständig und trunkierte RNS Transkripte des KSPV Gesamtklons p447 (siehe 2.2.6.13.1); transkribierte RNS des Sindbis Virus Gesamtklons pToto 57

Der hier etablierte Test ist eine Modifizierung des von Geigenmuller-Gnirke et al entwickelten „assays“ (Geigenmuller-Gnirke et al., 1993), der darauf beruht, dass positiv geladene Proteine erst nach Bindung an Nukleinsäure in der Lage sind, in ein Agarosegel zu migrieren. Die RNS (1 oder 2µg) wurde mit gereinigtem Core-Protein (15 bis 85ng) in einem

Bindungspuffer in Anwesenheit eines Ribonuklease Inhibitors (4U) 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1µl Glycerol zu der Reaktion zugegeben und das Gesamtvolumen auf ein Agarosegel (0,8%) (siehe 2.2.6.8) aufgetragen, welches bei 30mA 2h laufengelassen wurde. Die Integrität der RNS wurde unter UV Licht kontrolliert und dokumentiert. Danach wurde das Protein aus dem Agarosegel mittels eines Kapillarblots (Northern Blot) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zuletzt erfolgte der Nachweis des Core-Proteins via Western Blot (siehe 2.2.5.3).

Die folgende Tabelle faßt die RNS- bzw. Proteinmengen zusammen, die in den entsprechenden Reaktionen eingesetzt wurden.

RNS	RNS Menge	Core Protein Menge
Transkript (KSPV Gesamtklon)	1µg; 2µg	50ng
Transkripte verschiedener Länge (KSPV Gesamtklon)	1µg	50ng
Transkript von Sindbis Virus (Gesamtklon pToto57)	1µg; 2µg	50ng
Ribosomale RNS	1µg	15ng; 30ng; 85ng
Poly I:C Homopolymer	200ng	10ng; 25ng
Poly-U; -A; -G Homopolymere	1µg	50ng

## 2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.5.1 SDS-PAGE

Lösungen für das Gelsystem (Tris-Tricin):

3x Gelpuffer:	0,3M	Tris-HCl pH 8,45
	0,3%	SDS
10x Anodenpuffer:	0,2M	Tris-HCl pH 8,9
10x Kathodenpuffer:	0,1M	Tris-HCl pH 8,25
	0,1M	Tricin
	1%	SDS (w/v)
Probenpuffer:	6M	Harnstoff
	6,25mM	Tris-HCl pH 6,8
	2%	SDS
	10%	Glycerol (v/v)
	0,025%	Bromophenolblau (w/v)
	0,025%	Phenolrot (w/v)

Zur Spaltung von Disulfidbrücken wurde 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v) oder DTT (10mM) zum Probenpuffer gegeben.

Molekulargewichtsstandard:	„ <i>prestained protein marker</i> “ (Fa. Invitrogen)
Acrylamidlösung (30:1):	40% Acrylamid (w/v) (Fa. AppliChem)
Glycerin:	87% (v/v) (Stammlösung) (Fa. Sigma)
TEMED:	>99% (v/v) (Stammlösung) (Fa. Sigma)
Ammoniumpersulfat:	10mg/ml in $H_2O_{\text{bidest}}$ (Stammlösung), jeweils frisch angesetzt (Fa. Alexis)
Geräte:	Proteingelelektrophoresekammer: Eigenbau JLU Gießen; Gel Größe 6 x 8cm; Spacer 0,75 $\mu$ m

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde ein SDS-PAGE System mit Tris-Tricin-Puffer verwendet (Trenngel 8-12% Acrylamid-Endkonzentration, Sammelgel 4% Acrylamid-Endkonzentration). Die Elektrophoresen wurden mit einer vertikalen Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Proteinproben wurden vor dem Auftragen in jeweils gleichem Volumen an Probenpuffer aufgenommen und 5min bei 95°C erhitzt. Falls die Proteine reduziert werden sollten, wurde dem Probenpuffer 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol oder 10mM DTT zugemischt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60V im Sammelgel und bei 120V im Trenngel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel für Coomassie Färbung (siehe 2.2.5.2) oder Immunoblot-Analyse (siehe 2.2.5.3) weiterverwendet.

#### 2.2.5.2 Coomassie-Färbung

Lösungen:	Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassieblau, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol in $H_2O_{\text{bidest}}$ und filtriert
Entfärbelösung:	10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol in $H_2O_{\text{bidest}}$

Die Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Färbelösung für 1h inkubiert, danach mehrfach mit Entfärbelösung gewaschen und schließlich zwischen zwei Cellophanblättern getrocknet.

2.2.5.3 Immunoblot-Analyse von Proteinen (Western Blot)

Lösungen:	Transferpuffer:	10x Puffer (480 mM Tris-HCl, 390 mM Glycin in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> gelöst)
	Blockierlösung:	5% Magermilchpulver (Fa. Frema)
	Waschpuffer:	PBS+ 0.1% Tween 20
Material:	Nitrozellulosemembran:	„pure nitrocellulose“ (Fa. Pall)
Antikörper:	Primärantikörper:	mAks GRS-C1, -C2, -C3, -C4, -C5 und -C6; mAks GRS-Pol-1, -Pol-2, -Pol-3, -Pol-4, -Pol-5 und -Pol-6 (Überstand 1:5); mAk anti PentaHis (Fa. Quiagen); mAk anti Myc
	Sekundärantikörper:	Meerrettich gekoppelter Ziege anti-Maus IgG
Geräte:	Transfer Apparatur (Eigenbau JLU Gießen); Mini Protean (Fa. Biorad) Horizontaler Schüttler (Fa. Edmund Bühler)	
Reagenzien:	Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN <sup>TM</sup> ; Fa. Pierce) Ponceau rot (Fa. Rott)	

Mit dieser Methode können Proteine nach ihrer Trennung durch SDS-PAGE (siehe 2.2.5.1), nachgewiesen werden.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Sammelgel verworfen und die im Trenngel aufgetrennten Proteine in einer Transfer Apparatur bei 14V für 12h oder 70V für 1h bei 4°C auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Wenn verschiedene mAks mit demselben Protein getestet werden sollten, erfolgte nach dem Transfer die Färbung der transferierten Proteine mit dem Farbstoff Ponceau rot, um die Spuren zu markieren und anschließend einzeln auszuschneiden.

Alle folgenden Inkubations- bzw. Waschschrte wurden manuell durchgeführt:

- 1.- Blockierung: 60min bei Raumtemperatur oder 12h bei 4°C
- 2.- Waschen 3x: 5min (jeweils)
- 3.- Erster Antikörper: 60min bei Raumtemperatur
- 4.- Waschen 3x: 10min
- 5.- Zweiter Antikörper: 50min bei Raumtemperatur
- 6.- Waschen 3x: 10min

Anschließend wurde die Membran mit 0,7ml „*Oxidizing Reagent*“ und 0,7ml „*Enhanced luminol Reagent*“ des Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN<sup>TM</sup>) für ca. 1min inkubiert. Schließlich erfolgte eine Autoluminographie für ca. 15s, 60s und 5min mit Biomax oder Biomax light Film (Fa. Kodak).

#### 2.2.5.4 Gewinnung von Virionen aus dem Überstand infizierter Zellkulturen

Material: Überstand aus mit Pestivirus infizierten Zellen  
Rotor SW 60Ti  
Geräte: Beckman L8-70 Ultrazentrifuge

Der Überstand infizierter Zellkulturen wurde per Zentrifugation (300 x g) geklärt und anschließend wurden die Virionen bei 123 000 x g und 4°C für 1h aufkonzentriert.

#### 2.2.5.5 Präparation von Lysaten aus KSPV infizierten Zellen zur Western Blot Analyse

SK-6 Zellen wurden so umgesetzt, dass nach 24h eine Konfluenz von ca. 95 Prozent erreicht wurde. Die Zellen wurden in Suspension mit dem KSPV Alfort<sub>ti</sub> unter Verwendung einer MOI zwischen 0,1 und 1 infiziert. Nach 24h wurde der Zellkulturüberstand verworfen und die Zellen einer 10cm Format Platte in 2ml Protein Auftragspuffer (siehe 2.2.5.1) aufgenommen.

#### 2.2.5.6 Präparation von Lysaten aus mit *ncp7* NS5A-B transfizierten Zellen zur Western Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden zuerst mit dem Vaccinia Virus MVA-T7pol 1h vor der Transfektion infiziert. Dieses Virus kodiert für die T7 RNA-Polymerase, die für die gesteigerte Transkription des Gens von NS5A-B im Plasmid pCITE-5A-B-myc notwendig ist, da das NS5A-B Gen in diesem Vektor unter der Kontrolle des T7 Promotors transkribiert wird. Nach 24h wurden die Zellen in Protein Auftragspuffer lysiert bzw. aufgenommen. Ein „*myc*“ Tag, am C-Terminus des NS5B-Proteins ermöglicht die Detektion des exprimierten Proteins mit dem entsprechenden mAk im Western Blot.

Die Lysate, deren Herstellung hier beschrieben wurde, sind von Dr. Norbert Tautz (Institut für Virologie, JLU, Gießen) bereitgestellt worden.

## 2.2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.6.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium:	10g/l	Trypton
	5g/l	Hefeextrakt
	10g/l	NaCl
	mit 1N NaOH auf pH 7,5 einstellen	
Substanzen:	Agar-Agar (Fa. DIFCO); Ampicillin (Fa. Fluka)	
Geräte:	Schüttler (Fa. Infors)	

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5%iger Agar zugesetzt. Alle Medien wurden autoklaviert. Durch den Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum Medium konnte eine Selektion von plasmidhaltigen Bakterien mit dem entsprechenden AB-Resistenzgen erreicht werden. Die Bakterien wurden 12-14h in LB Medium auf einem Schüttler bei 185rpm und 37°C kultiviert. Auch hier erfolgte zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien der Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum LB-Medium.

### 2.2.6.2 Plasmidisolierung

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

#### Minipräparation (Macherey & Nagel)

Lösung P1:	50mM Tris-HCl, pH 8,0
Lösung P1/RNase:	Lösung P1 0,1mg/ml RNase A
Lösung P2:	0,2M NaOH 1% SDS
Lösung P3:	2,55M Kalium-Acetat, pH 5,5
Geräte:	Tischzentrifuge 5414C (Fa. Eppendorf)

Die Präparationen kleinerer DNS-Mengen (bis 10µg) wurde durch alkalische Lyse (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Eine 3ml Bakterienkultur wurde über Nacht inkubiert. 1,5ml der

Kulturen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Tischzentrifuge mit ca. 10000 x g 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Sediment in 200µl der Lösung P1/RNase resuspendiert. Dann wurden 200µl der Lösung P2 hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 200µl der Lösung P3 zugegeben, die Suspension wurde gemischt und nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNS wurde mit 500µl Isopropanol präzipitiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNS wurde in 50µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

#### Midipräparation (Macherey & Nagel)

Lösungen P1-P3 wie für Minipräparation beschrieben

Puffer N2:            100mM            Tris  
                          900mM            KCl  
                          15 % Ethanol  
                          mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 6,3 einstellen

Puffer N3:            100mM            Tris  
                          1150mM           KCl  
                          15 % Ethanol  
                          mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 6,3 einstellen

Puffer N5:            100mM            Tris  
                          1000mM           KCl  
                          15 % Ethanol  
                          mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 8,5 einstellen

Materialien:        Säulen Nukleobond AX 100 (Fa. Macherey & Nagel)

Geräte:              Laborfuge 400R (Fa. Heraeus)

Zur Präparation größerer DNS-Mengen (bis 100µg) aus 50ml Übernachtskulturen wurden Nukleobond AX 100-Säulen der Firma Macherey & Nagel verwendet. Die Bakterien wurden in „Bluecaps“ für 10min bei 3939 x g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 5ml der Lösung P1/RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 5ml der Lösung P2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 5ml der Lösung P3 hinzugegeben und der Ansatz erneut vorsichtig durch Invertieren gemischt. Während der folgenden 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, kam es zur

Präzipitation der bakteriellen Proteine, sowie der chromosomalen DNS. In der Zwischenzeit wurde eine Nukleobond AX 100-Säule mit 3ml der Lösung N2 äquibriert. Das präzipitierte Material wurde durch Filtration entfernt und die klare, plasmidhaltige Phase auf die äquibrierte Säule gegeben. Hiernach wurde die Säule zweimal mit jeweils 10ml der Lösung N3 gewaschen und die an die Säule gebundene Plasmid-DNS durch Zugabe von 3ml der Lösung N5 eluiert. Jeweils 1ml Eluat wurde mit 700µl Isopropanol präzipitiert und die pelletierte DNS anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNS wurde in 100µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert.

### 2.2.6.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Bakterien:	<i>E.coli</i> K12-Stamm HB101; <i>E.coli</i> Stamm Rosetta <sup>TM</sup> (Fa. Novagen)	
Medien:	TFB I:	30mM KOAc 100mM RbCl 10mM CaCl <sub>2</sub> 50mM MnCl <sub>2</sub> 15 % Glycerol mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und steril- filtrieren
	TFB II:	10mM MOPS 75mM CaCL <sub>2</sub> 10mM RbCl 15 % Glycerol mit KOH auf pH 6,5 einstellen und steril filtrieren

Um *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNS effektiv zu transformieren, müssen sie zuerst kompetent gemacht werden. Dazu wurden 250ml LB-Medium mit 1:100 einer Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5- 0,6 erreicht war. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (5min bei 3939 x g, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 100ml eisgekühltem TFB I-Medium aufgenommen, resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (5min bei 3939 x g, 4°C) das Pellet in 10ml eiskaltem TFB II resuspendiert, für 1h auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und bei -70°C eingefroren und gelagert. Zur Transformation wurden

pro Ansatz 50µl kompetente Bakterien mit etwa 50ng Plasmid-DNS oder 5-7µl Ligationsansatz für 1h auf Eis inkubiert.

Nach einem Hitzeschock für 90s bei 37°C wurden dem Transformationsansatz nach 3-4min auf Eis 450µl LB Medium zugegeben. Das Ganze wurde dann 30min unter Schütteln bei 37°C inkubiert und schließlich auf LB-Agarplatten (LB/Amp oder LB/Chloramph) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für 12 bis 18h inkubiert; einzelne Kolonien wurden zum Animpfen von Kulturen für Mini- oder Midipräparationen (siehe 2.2.6.2) verwendet.

#### 2.2.6.4 Isolierung von Gesamt-RNS durch RNeasy

Zellen:	SK-6
Kit:	RNeasy-Mini-Kit (Fa. Qiagen)
Lösungen:	PBS, 70% Ethanol, H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (RNase frei, Fa. Roth)
Chemikalien:	β-Mercaptoethanol (Fa. Fluka)
Geräte:	Tischzentrifuge Biofuge pico (Fa. Heraeus)

Die RNS wurde aus Zellen einer 10cm-Format Platte gewonnen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 600µl Lysis-Puffer RLT+1% β-ME 2min bei Raumtemperatur lysiert. Das Gesamtlisat wurde auf eine QiaShredder Säule gegeben und 1min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Lysat wurde 1:1 mit 70% Ethanol versetzt und durch Pipettieren gemischt. Mit dem gut vermischten Lysat wurde eine RNeasy-Säule beladen, 15s bei 8000 x g zentrifugiert und das Lysat verworfen. Anschließend wurde einmal mit 700µl Waschpuffer RW1 und zweimal mit 500µl Waschpuffer RPE gewaschen. Zum Trocknen wurde die RNeasy-Säule erneut 2min bei 10000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 30µl RNase freiem H<sub>2</sub>O beladen, 2min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 8000 x g 1min zentrifugiert. Abschließend konnte die RNS photometrisch quantifiziert werden (siehe 2.2.6.7).

#### 2.2.6.5 Phenol/Chloroform Extraktion von DNS

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

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion dient zur weitgehenden Entfernung von kontaminierenden Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Proteine reichern sich hierbei in der sog. Interphase an.

Zur Nukleinsäurelösung wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform -Lösung (1:1) gegeben, der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend zur Verbesserung der Phasentrennung für ca.5min in einer Tischzentrifuge bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die Nukleinsäuren und konnte vorsichtig in ein zweites Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend wurde sie mit Ethanol bzw. Isopropanol präzipitiert (siehe 2.2.6.6).

#### 2.2.6.6 Ethanolpräzipitation von DNS/RNS und Isopropanolpräzipitation von DNS

Lösungen: 100% Ethanol (Fa. Fluka); 70% (Ethanol (Fa. Fluka);  
3M Na-Acetatlösung (pH 5,2) (Fa.Merck); Isopropanol (Fa.  
Fluka)  
Geräte: Tischzentrifuge Biofuge Pico (Fa. Heraeus)

Um Nukleinsäuren aus einer Lösung auszufällen, wurden der nukleinsäurehaltigen Lösung 2,5 Volumen eiskaltes 100%iges Ethanol und 1/10 Volumen 3M Na-Acetatlösung, pH 5,2 zugesetzt (0,3M Endkonzentration). Das Salz unterstützt die Zerstörung der Hydrathülle der Nukleinsäure und erleichtert die Fällung. Die Präzipitation erfolgte für ca. 2h bei -20°C. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation (10000 x g, 20min, 4°C) pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Nach Lufttrocknung wurde die DNS oder die RNS in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

Für die Isopropanolpräzipitation der DNS wurde der nukleinsäurehaltigen Lösung das 0,7-fache Volumen Isopropanol und das 0,1fache Volumen Na-Acetatlösung, pH 5,2 zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und zur Präzipitation und Pelletierung der DNS bei 4°C für 15min bei 10000 x g zentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

#### 2.2.6.7 Quantifizierung von DNS/RNS-Proben

Geräte: Spektrophotometer GeneQuant II (Fa. Pharmacia)

Um den DNS- oder RNS-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurde die Absorption eines Alliquots in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer gemessen. Hierzu wurde die DNS-Lösung bzw. die RNS-



### 2.2.6.9 Dephosphorylierung von DNS

Die Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten wurde durchgeführt, um eine unerwünschte Selbstligation von DNS-Fragmenten mit glatten oder kompatiblen Enden zu verhindern. Für die Reaktion wurde etwa eine Einheit des Enzyms alkalische Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP)(Fa. Roche) pro µg DNS eingesetzt und für 1 bis 2h bei 37°C inkubiert.

Die auf diese Weise behandelte DNS wurde anschließend einer Phenolisierung (siehe 2.2.6.5) und Ethanolpräzipitation (siehe 2.2.6.6) unterzogen. Die DNS wurde nach der Fällung in 25µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.6.10 Aufreinigung und Ligation von DNS-Fragmenten

Material:	Ultrafree®-DA-Säulen (Fa. Millipore)
Geräte:	Tischzentrifuge 5415C (Fa. Eppendorf)
Enzyme:	T4 DNA-Ligase (Fa. MBI-Fermentas); Restriktionsendonukleasen (Fa. New England BioLabs; Fa. Takara); Alkalische Phosphatase (CIAP) (Fa. Boehringer); T4 Polynukleotidkinase (Fa. New England BioLabs)
Substanz:	ATP (100mM)

Die Aufreinigung der DNS aus Agarose erfolgte Filtration methodisch (Ultrafree®-DA). Diese Methode ist geeignet um DNS, die 100-10000 Basenpaare umfasst, aus Agarosegelen für Klonierungszwecke oder für die Sequenzierung zu extrahieren. Zur Aufreinigung wird das DNS-haltige Agarosegelstück ausgeschnitten und in eine Säule („Gel Nebulizer“) überführt. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 5000 x g, bei der feste Gelbestandteile zurückgehalten werden, befindet sich die extrahierte DNS im Agarosegelpuffer-haltigen Filtrat und kann direkt weiter verwendet werden.

Die Ligation von DNS-Fragmenten, z. B. Einfügen von DNS-Fragmenten in Vektorplasmide, erfolgte mit T4 DNA-Ligase. T4 DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3'OH mit der 5' PO<sub>4</sub>-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNS durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch. Um ligierbare Enden zu erhalten, mussten zuvor beide Ligationspartner mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gleicher Spaltspezifität behandelt werden. Damit eine intramolekulare Religation eines linearisierten

Vektorplasmids verhindert wurde, musste der Vektor zusätzlich durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert werden (siehe 2.2.6.9). Eine Religation kann stattfinden, wenn das Plasmid nur von einem Restriktionsenzym gespalten wurde, d. h. selbstkomplementäre 3'- und 5'-Enden entstanden sind. Der andere Ligationspartner muss entsprechend phosphorylierte Enden aufweisen, damit die Ligation erfolgen kann. Eine Phosphorylierung kann durch T4 Polynukleotidkinase mit ATP als Phosphatgruppendonor katalysiert werden. Ligationen wurden in einem Volumen von 10-15µl in 1x Ligationspuffer und mit 1U T4 DNS-Ligase angesetzt. Die Menge der Ligationspartner wurde über den Vergleich der Bandenintensitäten auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel bestimmt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert betrug in etwa 1:3. Die Ligation fand bei 25°C über Nacht statt.

#### 2.2.6.11 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Enzyme:	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Fa. New England BioLabs) <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (Fa. Stratagene)
Geräte:	DNA Thermal Cycler 2400 (Fa. Perkin Elmer) Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen, selektiven Amplifikation von DNS, wobei selbst sehr geringe DNS-Mengen stark vervielfältigt werden können. Das Prinzip beruht auf der Bindung zweier Oligonukleotide, die zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNS komplementär sind, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen. Das als Plusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNS, während das als Minusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach Aufschmelzen des DNS-Doppelstranges durch Erhitzen lagern sich beide Oligonukleotide bei Absenken der Reaktionstemperatur an die DNS an („*Annealing*“). Im nächsten Schritt dienen sie der hitzebeständigen DNA-Polymerase als Start für die DNS-Synthese („*Elongation*“).

Durchführung:

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

PCR-Puffer (10x)	5µl
dNTPs [10mM]	2,5µl
<i>Plusstrang-primer</i> [100pmol/µl]	0,5µl
<i>Minusstrang-primer</i> [100pmol/µl]	0,5µl
DNS-„ <i>template</i> “ [50ng/µl]	1-2µl
DNS-Polymerase [2,5 U/µl]	1µl
H <sub>2</sub> O	ad 50µl

Die Inkubation der Ansätze erfolgt in einem DNS-Thermal-Cycler 2400 von Perkin Elmer®, wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah (Standardbeispiel):

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

Nachdem die Erfolgskontrolle durch das Auftrennen von 1µl Reaktionsansatz im DNS-Agarosegel (siehe 2.2.6.8) durchgeführt worden war, wurden die PCR-Fragmente der Hälfte des Ansatzes (25µl) mit Ethanol präzipitiert und anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten. Für die Ligation in einen Plasmidvektor wurde der Plasmidvektor ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen geschnitten.

2.2.6.12 *Ortsgerichtete Mutagenese mittels „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis“ und Deletions-PCR*

Substanzen: „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis“ Kit (Fa. Stratagene)

Enzyme: *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. New England BioLabs)

*Pfu*-DNA-Polymerase (Fa. Stratagene)

*DpnI* (Fa. New Enland BioLabs)

Geräte: DNA Thermal Cycler 2400 (Fa. Perkin Elmer)

Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)

Die Erzeugung einzelner Basenaustausche erfolgte weitgehend gemäß den Angaben des „QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis“ Kits. Bei dieser Methode dient ein doppelsträngiges Plasmid, in das die Mutation eingefügt werden soll, als Matrize. Für den gezielten Austausch bestimmter Basen in der Matrize wurden Oligonukleotide benötigt, welche die gewünschten Basenaustausche in ihrer Sequenz tragen und jeweils an den „sense“ und den „antisense“ Strang der DNS-Matrize binden. Mit Hilfe eines „Thermal Cyclers“ wird die Plasmid-DNS denaturiert; die Bindung der Oligonukleotide an die DNS und eine anschließende Primerextension wird durch das Enzym „Pfu-DNA-Polymerase“ (besitzt eine „proofreading“ Aktivität) vermittelt. Nach 12-16 Elongationsschritten, bei denen im Unterschied zur PCR lediglich die Ausgangs-DNS als Matrize diente, wurde die methylierte Ausgangs-DNS durch *DpnI* abgebaut, während die mutierte, neu synthetisierte, nicht methylierte DNS erhalten blieb. Die neu synthetisierte DNS ist wie die Ausgangs-DNS doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche („nicks“) auf. Erst nach Transformation der neu synthetisierten DNS in Bakterien erfolgte die „Reparatur“ dieser „nicks“ durch Ligation.

Ein „QuickChange<sup>TM</sup>“-Standardansatz von 50µl wies folgende Zusammensetzung auf (circa. 50ng „template“):

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

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

	Anzahl	Dauer	Temperatur
<b>Denaturierung</b>	1x	2min	94°C
<b>Denaturierung</b>	12-20x	30s	94°C
<b>„Annealing“</b>		1-1,5min	53-60°C (variabel)
<b>„Elongation“</b>		2min/kb	73°C

Im Anschluss an die Mutagenese-Reaktion wurde die Ausgangs-DNS durch Zugabe von 5U *DpnI* und Inkubation für 1h bei 37°C abgebaut. Für die anschließende Transformation der mutierten DNS in Bakterien wurden 1µl des *DpnI*-verdauten Reaktionsansatzes und 50µl kompetenter *E. coli* HB101 verwendet (siehe 2.2.6.3).

Mit dieser Methode können auch DNS Fragmente eines Konstruktes gezielt deletiert werden (Deletions-PCR). Die PCR-Reaktion erfolgt auf gleiche Weise wie bei der ortsgerichteten Mutagenese, dabei wird der ganze Vektor amplifiziert, jedoch ohne das zwischen den Primern liegende DNS Fragment. Hierfür werden die Primer so ausgewählt, dass sie die zu deletierende Sequenz flankieren.

#### 2.2.6.13 *In vitro* Transkription

Enzym: Sp6 RNA-Polymerase (Fa. Takara)

Für die *in vitro* Transkription mit Sp6 RNS-Polymerase wurden 2µg Plasmid-DNS durch einen Restriktionsverdau linearisiert, anschließend über eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.6.5) gereinigt und mit Ethanol gefällt (siehe 2.2.6.6). Nachdem das getrocknete DNS-Pellet in 10-15µl H<sub>2</sub>O (RNase frei) aufgenommen worden war, setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

Sp6 Pol-Puffer (10x)	1 µl
DTT [0,1M]	1 µl
DNS-Matrize [1µg/µl ]	1 µl
„human ribonuclease inhibitor“ [40U/µl ]	1 µl
rNTPs [10mM]	1 µl
H <sub>2</sub> O	4 µl
<u>Sp6 RNA-Pol [50U/µl]</u>	<u>1 µl</u>
Gesamtvolumen	10 µl

Die Transkription erfolgte für 1-2h bei 37°C. Anschließend wurde die Qualität der *in vitro* Transkripte über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert, bevor die transkribierte RNS mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.6.5) gereinigt und mit Ethanol gefällt wurde (siehe 2.2.6.6).

### 2.2.6.13.1 Herstellung von Transkripten verschiedener Länge

Plasmid-DNS des KSPV Gesamtklons p447 wurde mit jeweils einem von fünf Restriktionsenzymen linearisiert und diente nach Ethanolpräzipitation (siehe 2.2.6.6) als Matrize einer *in vitro* Transkription mit der Sp6 RNA-Polymerase (siehe 2.2.6.13).

Transkript	Restriktionsenzym	Länge des Transkripts (nt)
1	Nsi I	10 490
2	Bgl II	3945
3	EcoR I	5560
4	NgoM IV	8338
5	Sbf I	1511

### 2.2.6.14 Sequenzierung der DNS durch „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer

Substanzen: „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTP<sup>TM</sup>“ (Fa. GE Healthcare)  
 Geräte: DNS Thermal Cycler 2400 (Fa. Perkin Elmer)  
 Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)

Für die Technik des „Cycle Sequencing“ wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTP<sup>TM</sup>“ von GE Healthcare verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wurde als PCR durchgeführt; da allerdings nur ein Oligonukleotid eingesetzt wurde, erfolgte keine exponentielle, sondern nur eine lineare Amplifikation der DNS-Fragmente. Während der sich anschließenden Elektrophorese von unterschiedlich großen DNS-Molekülen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff, mit welchem das Oligonukleotid markiert war, mittels Laser angeregt und detektiert. Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNS aus Mini- oder Midipräparationen verwendet.

Für eine Sequenzierungsreaktion wurde eine DNS-Menge von 200 ng/kb Plasmidgröße und 2 pMol eines Fluoreszenzfarbstoff (IR 800)-markierten Oligonukleotids eingesetzt. Dieser Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 25µl aufgefüllt und anschließend auf vier PCR Reaktionsgefäße verteilt. Je Reaktion wurden jeweils 2µl der verschiedenen Didesoxynukleotidgemische des Kits dazugegeben. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
<b>Denaturierung</b>	1x	2min	95°C
<b>Denaturierung</b>	30x	15s	95°C
„Annealing“		20s	50°C
„Elongation“		30s	70°C
„Elongation“	1x	5min	70°C

Nachdem die PCR abgeschlossen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 4µl Stop-Puffer beendet und auf 4°C gekühlt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Reaktionen zur Denaturierung für 2min auf 72°C erhitzt. Von den Reaktionsansätzen wurde jeweils 1,5µl auf das Sequenzgel aufgetragen.

### 2.2.6.15 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Automatische Sequenzierung mit dem LI-COR 4000 L Sequenziergerät:

Elektrophoresepuffer

10x „Long-Run“-Puffer:	162,0g Tris
	27,5g Borsäure
	9,3g EDTA-Na <sub>2</sub>
	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auf 1 l auffüllen
„langes Gel“ (4 %, 66cm):	32ml Sequagel XR
	8ml Sequagel-Puffer
	2ml „Long Run“-Puffer
	15ml H <sub>2</sub> O bidest.
	8g Harnstoff
	400µl APS (10% in H <sub>2</sub> O)
	20µl TEMED
„kurzes Gel“ (6 %, 40cm):	30ml Sequagel XR
	7,5ml Sequagel-Puffer
	300µl APS (10% in H <sub>2</sub> O)
	400µl DMSO

Geräte: Sequenzgelelektrophoreseapparaturen (Fa. LI-COR)  
Sequenziergerät LI-COR 4000 L (Fa. LI-COR)

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

Auftrennung von etwa 500 Basen. Da die Detektion der Sequenz bei der automatischen Sequenzierung schon während des Laufs erfolgte, wurde das Gel nach dem Lauf verworfen.

Unmittelbar vor dem Gießen wurden TEMED und 10%iges Ammoniumpersulfat zu den Polyacrylamidlösungen (Sequagel XR) gegeben.

Zur Herstellung der Gele wurden „Spacer“ zwischen die Glasplatten gelegt, die Platten in dafür vorgesehene Schienen eingespannt und auf eine entsprechende Apparatur gelegt, die ein horizontales Gießen des Gels ermöglichte. Die Polymerisation erfolgte für mindestens 1h, anschließend wurde das Gel in das Sequenziergerät eingespannt und ein Vorlauf unter folgenden Bedingungen gestartet:

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

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

2.2.7 Klonierungen

2.2.7.1 Synthetische Oligonukleotide

Oligo	Nukleotidsequenz	Länge, Restriktions- schnittstelle*	+/- Orientierung
core 46	GCAACTGGTTACCCATAATG	20nt	+
core 64	CGGGATCCATGGAGTTGAATCATTTT	26nt Bam H I	+
core 87	GAAGATAGCCCCTAGGGAGCATGAGAAG	28nt	+
core 237	TTCTCGAGCTAATTATGGTACAGGC	25nt Xho I	-
core 238	TTCTCGAGCTACCCTTTGACTTTGC	25nt Xho I	-
core 240	TTCTCGAGTCAAGGAGGCTTGGTCTTG	27nt Xho I	-
core 243	ATGCATCACCATCACCATCACTAG	24nt	+
core 244	TTCTCGAGTCACTCTCTTGGGGCTATCTTC	30nt Xho I	-
core 246	TTCTCGAGTCAGCTGTCCTTCTCATGC	27nt Xho I	-
core 275	CATGAGAAGGACTGCAAGACCAAGCCTC	28nt	+
core 276	GAGGCTTGGTCTTGCAGTCCTTCTCATG	28nt	-
core 277	TCCGACACAAAAGATGAAGGGGTG	24nt	+
core 278	TTTATTTTTGTGTGGTATAAGCC	24nt	-
core 279	TTTTTCTTTACCTGATACTTGACTCC	27nt	-
core 280	CTTGGTCTTACTGTCTTTCTCTGAC	25nt	-
core b 241s	TCCGACACAAAAGATGAAGG	20nt	+
core b 243-	CTCTAGTTTCTTGCGCGAC	19nt	-
CST 304	AACTCGAGTCACACCCCCCTTCCTATCAGG	30nt Xho I	-
CST 305	AGTAACTGGGTGATACAAGAAG	22nt	+
7HISrev	ATGGTGATGGTGATGGTGATGGC	23nt	+
BamHIpGEX6P	GGATCCCAGGGGCCCTGGAACAGAAC	27nt	-

\* - Die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen

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

CSF1	CTGCTGTACATGGCACATGGAG	22nt	+
IR-GST-3'	CAGGGCTGGCAAGCCACGTTTG	25nt	+
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	17nt	+

2.2.7.2 Klonierung des Gens des KSPV Core-Proteins (p250)

Das Fragment des KSPV Alfort<sub>ii</sub> N<sup>pro</sup>-Core (Methionin<sup>1</sup> bis Lysin<sup>249</sup>) mit sechs Histidinen am C-Terminus des Core-Proteins wurde aus dem Plasmid p46b mit den Restriktionsenzymen *Sac II* und *Xho I* isoliert, über ein Agarosegel gereinigt (siehe 2.2.6.10) und in das Plasmid p239 ligiert, das genauso behandelt wurde. Auf diese Weise entstand das Plasmid p250, in dem das Fragment N<sup>pro</sup>-Core (Methionin<sup>1</sup> bis Lysin<sup>249</sup>) und dessen sechs C-terminale Histidine am C-Terminus der Glutathion-S-Transferase vorliegen (Heimann et al., 2006).

2.2.7.2.1 Generierung der am 3'-Ende verkürzten Formen des KSPV Core-Protein Gens (pCore 5, pCore 6, pCore 8, pCore 11, pCore 14)

Das Fragment von Methionin<sup>1</sup> (N<sup>pro</sup>) bis Asparagin<sup>236</sup> in der Core-Protein Sequenz wurde aus dem Plasmid p250 mit den Oligonukleotiden core 64 (Plusstrang) und core 237 (Minusstrang) per PCR mit der *Taq* DNA Polymerase erzeugt und in den pGEM-T (Fa. Promega) ligiert (pCore 1). Die DNS von Minipräparationen verschiedener Klone wurde mit dem Primer M13 sequenziert (siehe 2.2.7.1). Der pGEM-T Vektor verfügt über einen Thymin-Überhang, so dass PCR-Produkte, die durch die *Taq* DNA-Polymerase synthetisiert wurden, mit ihrem Adenin-Überhang ohne weitere Modifikationen einligiert werden können. Aus dem pCore 1 wurde das Fragment über Restriktionsverdau mit den Enzymen *BamH I* und *Xho I* herausgeschnitten und in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen prokaryotischen Expressionsvektor pGEX6.P-1 (Fa. Amersham) ligiert (pCore 5).

Mit derselben Strategie wurden die folgenden Konstrukte generiert:

Oligonukleotide	Fragment*	Vorklon	Expressionskonstrukt
core 64/ core 238	N <sup>pro</sup> -Core (bis Gly <sup>226</sup> )	pCore 2	pCore 6
core 64/ core 240	N <sup>pro</sup> -Core (bis Pro <sup>205</sup> )	pCore 4	pCore 8
core 64/ core 246	N <sup>pro</sup> -Core (bis Ser <sup>200</sup> )	pCore 13	pCore 14
core 64/ core 244	N <sup>pro</sup> -Core (bis Glu <sup>195</sup> )	pCore 9	pCore 11

\* (Gly)- Glycin; (Pro)- Prolin; (Ser)- Serin; (Glu)- Glutaminsäure

### 2.2.7.3 Generierung eines KSPV Gesamtklons mit einem Cystein an der Aminosäureposition 200 des Core-Proteins (pCore29)

Mit dem Vorklon p832#1 (Rümenapf, unpubliziert) als Matrize wurde eine ortgerichtete Mutagenese (siehe 2.2.6.12) mit den Oligonukleotiden core 275 (Plusstrang) bzw. core 276 (Minusstrang) durchgeführt (pCore 25). Dabei sollte das Serin<sup>200</sup> in der Aminosäuresequenz des Cores durch ein Cystein ersetzt werden. Das mutierte Plasmid pCore 25 wurde mittels Sequenzierung mit dem Primer CSF1 auf seine Richtigkeit überprüft. Anschließend wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Xho I* und *Sda I* geschnitten und das gewünschte Fragment aus einem Agarosegel isoliert (siehe 2.2.6.10), bevor es in den KSPV Gesamtklon p447 eingebaut wurde, wo es die entsprechende Originalsequenz ersetzte (pCore 29).

### 2.2.7.4 Klonierung des Gens vom BVDV Core-Protein (p940)

Mit der cDNS des BVDV Gesamtklons ncp7 als Matrize, wurde mit dem Plusstrang Primer core b241s und dem Minusstrang Primer core b243- das Gen des Core-Proteins per PCR mit der *pfu*-DNA-Polymerase isoliert. Das KSPV Core-Protein Gen im Konstrukt p250 wurde durch dieses PCR Produkt ersetzt, nachdem es zuvor mit Hilfe einer Deletions-PCR (siehe 2.2.6.12) unter Verwendung des Plusstrang Primers core 46 und des Minusstrang Primers core 243 entfernt wurde. Im resultierenden Konstrukt p940 verfügt das Core-Protein C-terminal über sechs Histidine und schließt sich direkt an das KSPV N<sup>pro</sup> an.

#### 2.2.7.4.1 Generierung der am 3'-Ende verkürzten Formen des BVDV Core-Protein Gens (pCore 24, pCore 26, pCore 27, pCore 28)

Das Plasmid p940 diente als Matrize für eine Deletions-PCR (siehe 2.2.6.12) mit dem Plusstrang Primer core 277 und dem Minusstrang Primer BamHIpGEX6P, wobei die Sequenz des N<sup>pro</sup> deletiert wurde (pCore 24). Die resultierenden Plasmide wurden mit dem Primer IR-GST-3' sequenziert. Mit dem Plasmid pCore 24 als Matrize wurden dann folgende Konstrukte mittels Deletions-PCR generiert, die mit dem Primer IR-GST-3' via Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft wurden.

Oligonukleotide	Genfragment von Core <sup>*</sup>	Expressionskonstrukt
core 243/ core 278	Core (Ser <sup>169</sup> Lys <sup>242</sup> )	pCore 26
core 243/ core 279	Core (Ser <sup>169</sup> bis Lys <sup>224</sup> )	pCore 27
core 243/ core 280	Core (Ser <sup>169</sup> bis Lys <sup>206</sup> )	pCore 28

<sup>\*</sup>(Lys)- Lysin

#### 2.2.7.5 Klonierung des KSPV NS5B-Protein Gens (p1141)

Das NS5B Fragment von Serin<sup>3305</sup> bis Valin<sup>4022</sup>, wurde aus dem KSPV Gesamtklon p447 mit dem Plusstrang Primer CST 305, dem Minusstrang Primer CST 304 und der *Pfu*-DNA-Polymerase per PCR isoliert. Nachdem das Produkt mit *Xho I* verdaut und gereinigt wurde (siehe 2.2.6.10), konnte es in das Plasmid pMH3 (Rümenapf, nicht publiziert) ligiert werden. pMH3 wurde vor der Ligation zunächst einer Deletions-PCR mit der *Pfu* DNA-Polymerase und dem Primer Paar core 87/7HISrev unterzogen und anschließend ebenfalls mit *Xho I* verdaut und gereinigt (siehe 2.2.6.10). Das aus dieser Klonierung entstehende Konstrukt enthält das KSPV NS5B Protein mit sieben N-terminalen Histidinen (p1141).

### 3 Ergebnisse

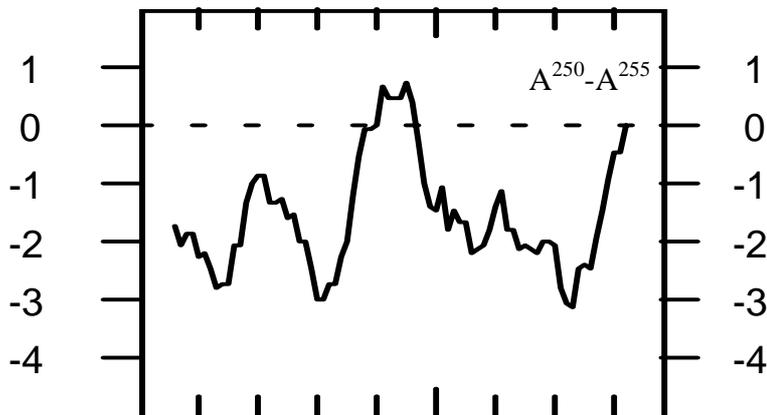
#### 3.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung des Core-Proteins vom Virus der klassischen Schweinepest

Das Core-Protein von Pestiviren ist ein positiv geladenes Protein von 86 Aminosäuren, das sich am Aufbau des Viruspartikels beteiligt. Das Core-Protein wird durch verschiedene proteolytische Schritte aus dem Polyprotein freigesetzt. Der N-Terminus, beginnend mit der Aminosäure Serin<sup>169</sup>, wird durch die Autoprotease N<sup>pro</sup> generiert, der C-Terminus aus einer Kombination von Signalase und Signalpeptidase (Stark et al., 1993; Rügenapf et al., 1998; Heimann et al., 2006). Hierin zeigt sich eine auffällige Übereinstimmung mit der Biosynthese des Core-Proteins vom Hepatitis C Virus. Während eine Reihe von Eigenschaften für das Core-Protein von HCV beschrieben wurde (Apoptoseinduktion, Onkogen) ist über die Funktion des Core-Proteins des Pestivirus so gut wie nichts bekannt (McLauchlan 2000). Ursache für die geringe Kenntnis war unter anderem das Fehlen geeigneter serologischer Reagenzien. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich ein polyklonales Antiserum verfügbar, das das Core-Protein aber auch N<sup>pro</sup> erkannte (Stark et al., 1993). Dieses Serum erlaubte zwar den Nachweis des Core-Proteins im Western Blot, eignete sich aber nicht für Untersuchungen über die zelluläre Lokalisation. Für die Charakterisierung des pestiviralen Core-Proteins, insbesondere der intrazellulären Lokalisation, wurde die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gegen das Core-Protein vom Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) sowie des Virus der bovinen Virusdiarrhöe (BVDV) angestrebt.

##### 3.1.1 Klonierung

Eine wichtige Voraussetzung für die Gewinnung spezifischer Antisera sowie monoklonaler Antikörper ist die Verfügbarkeit ausreichender Mengen möglichst homogenen Antigens. Dies empfiehlt sich einerseits für die Immunisierung, andererseits erleichtert es die Identifizierung der Hybridome, die die gewünschten Antikörper produzieren. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Core-Protein in *E.coli* Zellen als lösliches Protein erzeugt werden kann. Der N-Terminus des Core Proteins (Serin<sup>169</sup>) wird durch die virale Autoprotease N<sup>pro</sup> in einem autokatalytischen Prozess generiert. Da N<sup>pro</sup> diese Aktivität auch nach der Expression in Bakterien zeigt, war es von Vorteil N<sup>pro</sup> und Core gemeinsam als Proteinvorläufer exprimieren zu lassen, da auf diese Weise der authentische N-Terminus des Core-Proteins erzeugt werden kann. Zur geplanten Aufreinigung des Core-Proteins wurde die hydrophobe

Aminosäurefolge ALLAWA<sup>255</sup> am C-Terminus entfernt, so dass die zu exprimierende Sequenz keine ausgedehnte hydrophobe Sequenz besitzt (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Hydrophobizitätsverteilung im Core-Protein von KSP.

Die Aminosäuresequenz des Core-Proteins vom KSPV Alfort<sub>iii</sub>, innerhalb der bekannten Grenzen von Serin<sup>169</sup> bis Alanin<sup>255</sup>, wurde mit Hilfe des Kyte und Doolittle Algorithmus auf die Verteilung hydrophober und hydrophiler Bereiche untersucht. Am C-Terminus befindet sich der Rest der Signalsequenz von Alanin<sup>250</sup> bis Alanin<sup>255</sup>.

Positive Werte, die „>1“ sind, deuten auf Hydrophobizität hin, während Bereiche, deren Werte unter „0“ liegen, hydrophil sind.

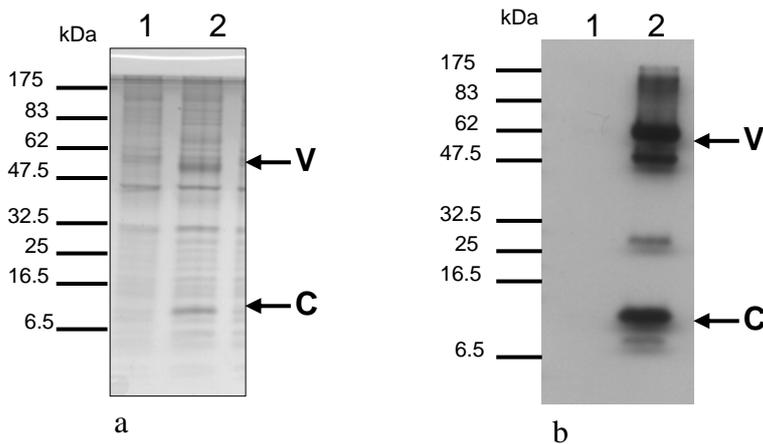
An den C- Terminus wurde ein Hexahistidin Peptid angefügt. Diese als His-Tag bezeichnete Struktur weist eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallionen auf, besonders zu Nickel, Kobalt und Zink. Dieser Effekt wird genutzt, um His-Tag tragende Proteine an immobilisierte Ni<sup>++</sup> Ionen („*immobilized metal affinity chromatography*“, IMAC) zu binden. Die Bindung kann durch hohe Konzentrationen von Imidazol aufgehoben werden, was auch zur Verdrängung bereits gebundener His-Tags führt. Vorläufige Untersuchungen ergaben, dass in Bakterien exprimiertes N<sup>pro</sup>-Core-6His zu etwa 90% in N<sup>pro</sup> und Core-6His gespalten wird, was die Reinigung von Core-Protein durch IMAC erlaubte. Problematisch war die Bindung des ungespaltenen N<sup>pro</sup>-Core-6His Proteins an die Ni<sup>++</sup> Matrix, das ebenfalls aufgereinigt wurde. Um die nachfolgende Abtrennung des unerwünschten Vorläuferproteins zu ermöglichen, wurde ein Fragment der Glutathion S-Transferase (GST) an das N-terminale Ende von N<sup>pro</sup> fusioniert. GST hat eine hohe Affinität zu Glutathion und erlaubt die Affinitätsreinigung durch immobilisiertes Glutathion. Durch eine Kombination der Affinitätsreinigungen unter Verwendung von Glutathion Sepharose und Ni<sup>++</sup> Sepharose sollte es gelingen, weitgehend reines Core-Protein zu erzeugen. Die N<sup>pro</sup> kodierende Sequenz von KSPV Alfort<sub>iii</sub> (Meyers et al., 1989) wurde, ausgehend von klonierter DNS, mittels PCR amplifiziert und zunächst in das Expressionsplasmid pET11a ligiert. Durch PCR Mutagenese wurde ein His-Tag an das Ende der Core kodierenden Sequenz fusioniert. Die N<sup>pro</sup>-Core-6His

kodierende Sequenz wurde wiederum mittels PCR amplifiziert und in das GST kodierende Plasmid pGEX6P-1 ligiert. Das resultierende Plasmid (p250) wurde zur Expression des Proteins in den *E.coli* Stamm Rosetta DE3 transformiert. Die Proteinexpression mit diesem *E.coli* Stamm bietet zwei Vorteile. Einerseits fehlen diesem Stamm die Proteasen Lon und ompT, andererseits besitzt er ein Plasmid, das seltene tRNS Spezies kodiert. Zwar ist der genetische Code zwischen Pro- und Eukaryonten weitgehend gleich, es gibt jedoch Unterschiede in der Verwendung von Kodons und damit einhergehend der Häufigkeit von tRNSs. Die Unterrepräsentation bestimmter tRNSs in *E.coli* kann die Synthese eukaryonter Proteine erheblich einschränken und damit die produzierte Menge an gewünschtem Protein reduzieren.

### 3.1.2 Expression

Die Expression von N<sup>pro</sup>-Core-6His wurde zunächst im kleinen Maßstab untersucht. Dazu wurden 2ml Medium mit einer Kolonie von Core exprimierenden Zellen (*E.coli* Stamm Rosetta) angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,8 kultiviert. Die Kultur wurde in zwei Hälften geteilt und eine davon durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Nach einer Stunde wurden induzierte und nicht induzierte Bakterien durch Zentrifugation geerntet, die pelletierten Zellen lysiert und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Zur Sichtbarmachung der Expressionsprodukte wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (Abbildung 2a).

Im Lysat induzierter Kulturen treten zwei neue Proteinbanden von 14kDa und 70kDa auf. Die kleinere Bande entspricht dem erwarteten Laufverhalten des Core-Proteins, die größere Bande stellt vermutlich den ungespaltenen GST-N<sup>pro</sup>-Core-6His Vorläufer dar. Die eindeutige Identifizierung des Expressionsproduktes erfolgte mittels Western Blot Analyse. Mit Hilfe von anti-Penta Histidin Antikörpern können Proteine, die einen His-Tag tragen, nachgewiesen werden. Sowohl das 14kDa als auch das 70kDa Protein wurden von den anti Penta-His Antikörpern erkannt. Somit handelt es sich ziemlich sicher um die Proteine Core und GST-N<sup>pro</sup>-Core (Abbildung 2b).



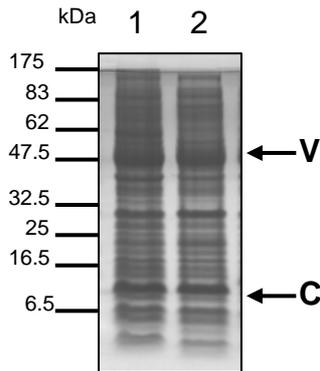
**Abbildung 2.** Expression und Western Blot Analyse des bakteriellen KSPV Core-Proteins.

Mit dem Plasmid p250 transformierte *E.coli* Stamm Rosetta<sup>TM</sup> Bakterien wurden mit 1mM IPTG induziert (2) oder nicht induziert (1). Die Zellen wurden geerntet, durch SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie Blau gefärbt (a). Dieselben Lysate wurden mit einem anti Penta-His mAk in Western Blot analysiert (b).

(V)-GST-N<sup>pro</sup>-Core Vorläufer; (C)-Core

Um die für die Herstellung monoklonaler Antikörper benötigte Menge an Core-6His Protein zu erhalten, wurde das Volumen der Bakterienkultur erheblich vergrößert (1,5 Liter). Nach Induktion mit 1mM IPTG bei einer OD von 1,0 wurde die Kultur bei 30°C für 2 Stunden mit hoher Aeration bebrütet. Zur Ernte wurden die Bakterien vom Kulturmedium durch Zentrifugation abgetrennt, dabei lag der Anteil der Bakterienmasse an der Gesamtkultur typischerweise bei 2% (Abtropfgewicht).

Das nach der Zentrifugation entstandene Pellet wurde in 300mM NaCl, 50mM NaHPO<sub>4</sub> pH 7,4 Puffer resuspendiert und das nichtionische Detergenz Triton X-100 (ad 1%), sowie ein Cocktail verschiedener Proteaseinhibitoren zugegeben. Zur Aufschließung der Bakterien und zur Gewinnung der zytosolischen Fraktion wurde die Bakteriensuspension dreimal bei -70°C eingefroren und aufgetaut. Durch die mechanische Zerstörung und die membranolytische Wirkung von Triton X-100 gelangt das vom *E.coli* Stamm in geringer Menge im Zytoplasma exprimierte Lysozym (LysS) an die aus Murein bestehende äußere Bakterienwand und beschleunigt somit die Lyse. Nach Sonifikation zur Verringerung der Viskosität wurden unlösliche zelluläre Bestandteile durch Ultrazentrifugation bei ca. 100000 x g für 1h abgetrennt. Die Untersuchungen der Lysate durch SDS-PAGE und Proteinfärbung vor und nach Ultrazentrifugation zeigten, dass das Core-Protein in fast unveränderter Menge in beiden Lysaten enthalten war. Folglich handelt es sich um ein lösliches Protein (Abbildung 3).



**Abbildung 3.** Kontrolle der Löslichkeit von bakteriellem KSPV Core-Protein.

Induzierte GST-N<sup>pro</sup>-Core-6His exprimierende *E. coli* Zellen wurden nach der Lyse für 1h bei 123342 x g zentrifugiert und der lösliche Überstand auf die Anwesenheit von Core-Protein untersucht. Aliquots von Lysat (1) und löslicher Fraktion (2) wurden in SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie Blau angefärbt. Die Pfeile zeigen, dass sowohl der Vorläufer (V) als auch das Core-Protein (C) weitgehend löslich bleiben.

### 3.1.3 Reinigung

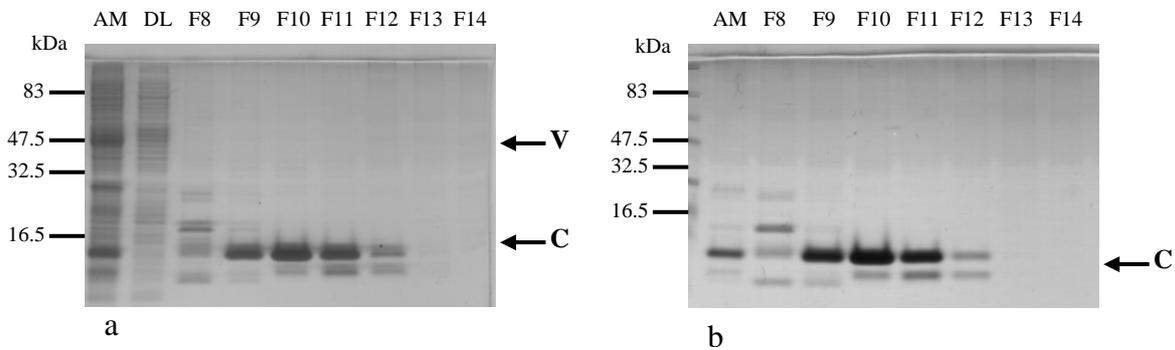
Zur Reinigung wurde das bakterielle Lysat nach Zugabe von Imidazol (ad 40mM) filtriert, um ausgefallenes Material, das zur Verstopfung der Säule führen kann, zu entfernen. Dann wurde eine HisTrap Chromatographiesäule mit dem Filtrat beladen und an eine Chromatographieanlage angeschlossen, an der die Elution des Proteins mittels eines Imidazol Gradienten von 50mM bis 500mM erfolgte. Von Ausgangsmaterial, Durchlauf und jeder Fraktion wurden vergleichbare Mengen in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Färbung analysiert (Abbildung 4a).

Beim Vergleich vom Ausgangsmaterial mit dem Durchlauf ist erkennbar, dass die Bande des gespaltenen Core-Proteins (14kDa) beim Durchlauf nicht auftritt. Das bedeutet, dass das Protein vollständig an die Ni<sup>++</sup> Säule gebunden hat.

Der größte Anteil an Core-Protein wurde bei einer Imidazolkonzentration von 200 bis 300mM eluiert, bei der die Bande des GST-N<sup>pro</sup>-Core-6His Vorläufers kaum zu erkennen war. In diesen Fraktionen war das rekombinante Core das Hauptprotein und bereits sehr homogen. Allerdings war stets ein kleineres Protein (~ 7kDa) zu erkennen, das als proteolytisches Abbauprodukt vom Core identifiziert werden konnte. Zur weiteren Aufreinigung des gereinigten Core-Proteins, wurden die Fraktionen 9 bis 12 vereinigt und durch Zugabe von Lysis Puffer die Imidazolkonzentration auf 50mM reduziert. Mit diesem Material wurde die Ni<sup>++</sup> Säule erneut beladen und die Aufreinigung erfolgte, wie oben beschrieben. Der Reinigungserfolg wurde wiederum durch SDS-PAGE in gleicher Weise analysiert. Es zeigte

sich, dass die Homogenität des Core-Proteins weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 4b).

Die Core haltigen Fraktionen 9 bis 11 wurden wiederum vereinigt und eine Gesamtmenge von 0,4mg Protein in 3ml wurde durch einen „BCA-Assay“ bestimmt.



**Abbildung 4.** IMAC Aufreinigung des Core-Proteins von KSPV.

Der Überstand (AM) von Lysaten aus Core exprimierenden Zellen wurde nach Zentrifugation (1h bei 123342 x g) einer Ni<sup>++</sup> Affinitätsreinigung unterworfen. Nach der Elution mit einem linearen Imidazolgradienten (50mM-500mM in Phosphat Puffer: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10mM Imidazol, pH 7,5), wurden Aliquots von Ausgangsmaterial (AM), Durchlauf (DL) und Fraktionen (F) mittels SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie Blau gefärbt (a). Die Fraktionen 9 bis 12 (a) wurden vereinigt und die Imidazol Konzentration auf 50mM reduziert. Anschließend wurde mit dem Material die Säule erneut beladen und das Verfahren wiederholt (b). (AM)- Ausgangsmaterial; (DL)- Durchlauf; (F)- Fraktionen; (V)- GST-N<sup>pro</sup>-Core Vorläufer; (C)- gespaltenes Core

### 3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung des BVDVncp7 Core-Proteins

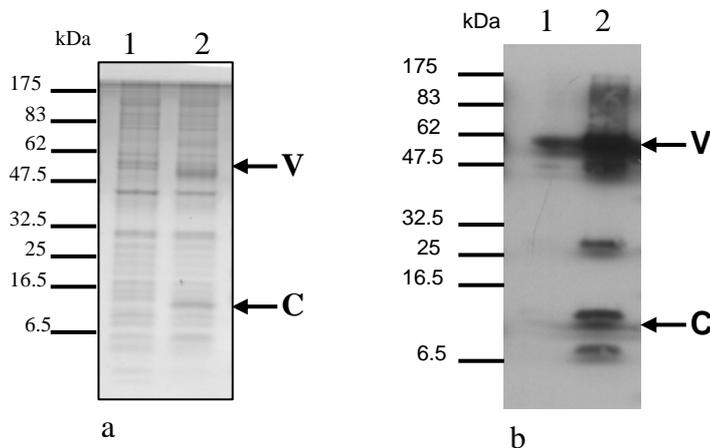
#### 3.2.1 Klonierung

Für die Klonierung bzw. Expression des BVDVncp7 Core-Proteins wurde eine ähnliche Strategie, wie bei dem KSPV Alfort<sub>ti</sub> Core angewandt. Die Sequenz des BVDVncp7 Core-Proteins, entsprechend der Aminosäuresequenz Serin<sup>169</sup> bis Glutamat<sup>251</sup>, wurde ausgehend vom Gesamtklon pncp7 (Meyers et al., 1996) durch PCR amplifiziert. In diesem Fragment war ebenfalls der hydrophobe Bereich KALLAWA<sup>258</sup>, deletiert. Anschließend wurde die Sequenz des BVDV Core Gens ins Plasmid p250 ligiert, so dass das generierte Konstrukt für GST-(N<sup>pro</sup><sub>KSPV</sub>)-(Core<sub>BVDV</sub>)-6His kodiert. Das aus dieser Klonierung hervorgehende Plasmid, p940, wurde in den *E.coli* Stamm Rosetta pLysS transformiert.

#### 3.2.2 Expression

Auch hier wurde die Expression des BVDV Core-Proteins zunächst in kleinem Maßstab getestet. In gleicher Weise wie zuvor, waren zwei Banden nach Induktion der

Proteinexpression zu erkennen (Abbildung 5a), die sich in der Western Blot Analyse als His-„Tag“ tragende Proteine bestätigen ließen (Abbildung 5b).



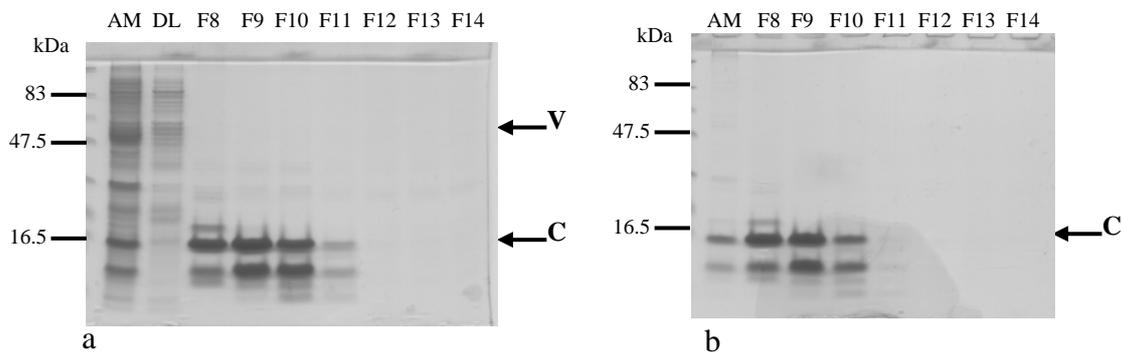
**Abbildung 5.** Expression und Western Blot Analyse des bakteriellen BVDV Core- Proteins. *E.coli* Stamm Rosetta™ Bakterien wurden mit dem Plasmid p940 transformiert und die Protein Expression mit 1mM IPTG induziert. Bakterielle Lysate von nicht induzierten (1) und induzierten (2) Kulturen wurden durch SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie Blau gefärbt (a). Die Expression des BVDV Core-Proteins in diesen Lysaten wurde mit einem anti Penta-His mAk in Western Blot analysiert (b). (V)-GST-N<sup>Pro</sup>-Core Vorläufer; (C)-Core

### 3.2.3 Reinigung

Größere Mengen an BVDV Core-Protein wurden aus 1,5 Liter Bakterienkultur produziert, die mit einer Vorkultur angeimpft wurde. Die Expressions- bzw. Reinigungsbedingungen entsprachen denen, die für das KSPV Core gewählt wurden.

Bei der Aufreinigung verhielt sich das BVDV Core-Protein wie das KSPV Core. Die Fraktionen mit dem größten Anteil an Core-Protein, 8 bis 11 wurden vereinigt. Danach erfolgte die Reduktion der Imidazol Konzentration auf 50mM und die Säule wurde schließlich erneut mit den gepoolten Fraktionen beladen (Abbildung 6a).

Durch die zweite Affinitätsreinigung konnte auch in diesem Fall die Homogenität des Präparates gesteigert werden. Die Fraktionen 8, 9 und 10 wurden vereinigt (Abbildung 6b) und die Proteinkonzentration durch einen „BCA-Assay“ bestimmt. Als Ergebnis der Reinigung konnten insgesamt 0,576mg Core-Protein in 4ml gewonnen werden.



**Abbildung 6.** IMAC Aufreinigung des Core-Proteins von BVDV.

Core exprimierende Zellen wurden lysiert und die lösliche Fraktion durch Zentrifugation gewonnen, die als Ausgangsmaterial (AM) für eine Ni<sup>++</sup> IMAC diente. Das gebundene Protein wurde mit einem linearen Imidazolgradienten (50mM-500mM Imidazol in Phosphat Puffer: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, pH 7,5) eluiert. Aliquots von Ausgangsmaterial (AM), Durchlauf (DL) und Fraktionen (F) wurden mittels SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie Blau gefärbt (a). Von der ersten Reinigung wurden die Fraktionen 8 bis 11 (a) vereinigt, die Imidazol Konzentration auf 50mM reduziert und mit diesem Material die Säule erneut beladen und das Verfahren wiederholt (b).

(AM)- Ausgangsmaterial; (DL)- Durchlauf; (F)- Fraktionen; (V)- GST-N<sup>pro</sup>-Core Vorläufer;

(C)- gespaltenes Core

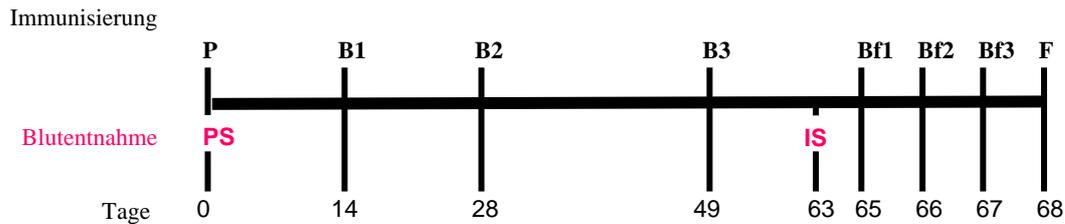
### 3.3 Präparation monoklonaler Antikörper gegen das pestivirale Core-Protein

#### 3.3.1 Immunisierung

Zur Erzeugung monoklonaler Antikörper wurden jeweils sechs weibliche, sechs Wochen alte Balb/c Mäuse mit gereinigtem KSPV oder BVDV Core-Protein immunisiert. Vor Beginn der Immunisierung wurde das Präimmenserum gewonnen, das als Negativkontrolle zur Etablierung des Screeningsystems dienen sollte. Für die als „*Priming*“ bezeichnete erste Immunisierung wurden die Mäuse mit einer Emulsion aus Core-Protein (40µg/Maus), und inkompletem Freundschens Adjuvans intraperitoneal immunisiert. Vierzehn Tage danach und im Abstand von 14 Tagen erfolgten die erste und zweite Boosterimmunisierungen auf gleiche

Weise, wie beim „*Priming*“. Nach 21 Tagen fand die dritte Boosterimmunisierung statt und nach weiteren 14 Tagen wurde Blut entnommen. Das Serum wurde mittels Western Blot Analyse mit Lysaten von induzierten bzw. nicht induzierten Core exprimierenden Bakterienkulturen getestet (Abbildung 7).

Die Maus, deren serologische Reaktion am stärksten war, wurde nach sieben Tagen dreimal, mit einem Tag Abstand, ohne Adjuvans, intraperitoneal immunisiert. Ein Tag nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen zur Fusion gewonnen.



**Abbildung 7.** Immunisierungsschema von Mäusen, die mit rCore Protein immunisiert wurden.

Von sechs weiblichen, 6 Wochen alt, Balb/c Mäusen wurde vor der ersten Immunisierung („*Priming*“) Blut entnommen um Präimmunserum zu gewinnen (**PS**). Zunächst wurden die Mäuse intraperitoneal mit einer Emulsion aus 40µg rCore Protein mit inkomplettem Freundschens Adjuvans immunisiert (*Priming*)(**P**). 14 Tage später wurden die Mäuse mit 40µg rCore Protein in inkomplettem Freundschens Adjuvans erneut intraperitoneal immunisiert (*Boost*)(**B1**) und in gleicher Weise wurde weitere 14 (**B2**) bzw. 21 Tage (**B3**) später verfahren. 14 Tage nach dem dritten Boost wurde Blut entnommen und die Seren im Western Blot getestet (**IS**). Die für die Fusion bestimmte Maus wurde dann intraperitoneal mit 40µg rCore und mit jeweils einem Tag Abstand dreimal hintereinander mit 40µg Antigen in PBS immunisiert (**Bf1**, **Bf2**, **Bf3**). Ein Tag nach dem letzten Boost erfolgte die Fusion (**F**).

### 3.3.2 Fusion von Splenozyten immunisierter Mäuse mit Myelomzellen

Für die Herstellung muriner monoklonaler Antikörper werden in der Regel Milzlymphozyten einer immunisierten Maus gewonnen. Die Lymphozyten werden mit Tumorzellen (Sp2/0 Myelomzellen), die mit der Mauslinie genetisch kompatibel sind, z.B. durch chemische Verschmelzung der Zellmembranen fusioniert. So entstehen Hybridomzellen, die einerseits Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren und andererseits in Zellkultur unbegrenzt vermehrt werden können (Abbas et al., 1997). Bei Sp2/0 Zellen handelt es sich um Tumorzellen, die mit Balb/c Maus Zellen genetisch kompatibel sind und in Zellkultur vermehrt werden können (Harlow und Lane 1998). Die fusionierten Zellen wurden in HAT (*Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin*) Medium kultiviert, was eine Selektion ermöglichte. Das in diesem Medium vorhandene Aminopterin blockiert das Enzym Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT). Dieses Enzym ist für die Biosynthese von Nucleotiden auf einem alternativen Weg notwendig, wenn das Medium mit Hypoxanthin und

Thymidin supplementiert ist. Den SP2/0 Zellen fehlt dieses Enzym, jedoch die Milzzellen besitzen es. Auf diese Weise gelingt es nur Hybridzellen, sog. Hybridomen, sich in diesem Medium zu vermehren.

### 3.3.2.1 Gewinnung von Splenozyten (Milzzellen) zur Fusion

Zunächst wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> betäubt, bevor sie für die Extraktion der Milzzellen getötet wurden. Danach wurde die Milz steril entnommen und die Milzpulpa vorsichtig herausgespült, in der sich die Lymphozyten befinden. Die Leukozyten in der gewonnenen Zellsuspension wurden mit Türks-Färbelösung gefärbt und in einer Zählkammer unter einem Umkehrmikroskop ausgezählt. Die Splenozytenzahl lag zwischen 1,2 und 2,5 x 10<sup>8</sup> Zellen pro Milz.

Insgesamt wurden fünf Fusionen durchgeführt. Davon waren zwei von mit KSPV Alfort<sub>ti</sub> Core-Protein immunisierten Mäusen und die anderen drei von den Mäusen, die mit dem BVDVncp7 Core-Protein immunisiert wurden.

### 3.3.2.2 Fusion von Splenozyten und Myelomzellen

Die Milzzellen wurden mit Sp2/0 Zellen in Verhältnis 3:1 gemischt. Durch langsame Zugabe von Polyethylenglycol 1500 (PEG-1500) erfolgte die Verschmelzung der Zellwand von aneinander klebenden Zellen (Fusion). Dann wurde Hepes Medium zugegeben, um das PEG-1500 zu verdünnen.

Direkt nach der Fusion wurden die in HAT Medium resuspendierten Zellen auf 96 „Well“ Format Mikrotiterplatten verteilt. Auf diesen Platten wurden ein Tag zuvor sog. „Feeder“ Zellen ausgesät. Als „Feeder“ dienten in diesen Fusionen murine Makrophagen, die aus der Bauchhöhle einer Maus extrahiert wurden. Diese Zellen produzieren Wachstumsfaktoren, wie z.B. Interleukin 6, welches das Wachstum von Hybridomen unterstützt. Drei Tage nach Fusion begannen die nicht fusionierten Myelomzellen zu sterben und am fünften Tag waren in der Regel kleine Zellkolonien zu erkennen, die auf teilungsfähige Hybridome zurückzuführen waren.

Die Zahl an Vertiefungen in einer 96 „Well“ Mikrotiterplatte, in denen Hybridomen wuchsen, variierte von Fusion zu Fusion und lag im Durchschnitt bei 1200/Fusion (d.h. 14 Platten).

### 3.3.3 Etablierung eines Screeningsystems zur Identifizierung positiver Hybridome

Für die Selektion Antikörper produzierender Hybridome wurde ein indirekter Core-ELISA entwickelt. Rekombinantes Core-Protein diente zum Beschichten von Platten mit 96

Projektionen („TSP“ Platten, „*Transferable Surface Plate*“), die wie ein Deckel auf eine Mikrotiterplatte passen. Diese Technik erleichtert die Waschroutine erheblich und verringert den Hintergrund, der durch unspezifische Bindung von Antikörpermolekülen entsteht. Als erstes wurde die Proteinarbeitsverdünnung für das Screening bestimmt. Dazu wurde eine Proteinverdünnung von 1:1000 genommen (zwischen 13 und 14ng Protein pro Projektion). Diese Verdünnung war die höchste, bei der die OD mit dem positiven Serum konstant blieb und sich zugleich die OD Werte zwischen positivem und negativem Serum noch deutlich unterschieden. Der nächste Schritt war es zu bestimmen, bei welchem OD Wert der untere Schwellenwert („*cut off*“) des ELISAs liegt, um Hybridome als positiv zu bewerten. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungen des positiven Serums in HAT Medium gemacht und jede Verdünnung im ELISA mit der vorher bestimmten Proteinarbeitskonzentration getestet. Als OD Wert für den „*cut off*“ wurde 0,1 genommen. So wurde ein Hybridom als potentiell positiv bezeichnet, wenn die OD seines Überstandes über 0,1 lag. Die Platten wurden zwei bis drei Tage vor der Fusion beschichtet und bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert.

### 3.3.4 „*Screening*“ von Hybridom-Überständen im ELISA, Selektion und Klonierung positiver Hybridome

Die Überstände wachsender Hybridome wurden in der Regel erstmals 9 bis 11 Tage nach der Fusion mit ELISA getestet. Um diese Zeit war mindestens 30% der Vertiefungsfläche von Hybridomzellen bedeckt. Zwei Tage danach erfolgte das zweite „*Screening*“.

Bei jedem „*Screening*“ wurde der Überstand jeder Vertiefung auf die 96 „*Well*“ Platte überführt, und die „TSP“ Platten wurden in die Überstände getaucht. Nach Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Platten mehrmals gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Peroxidase konjugierten anti Maus Antikörpern erfolgte. Nach mehrfachem Waschen wurden die Platten mit Substrat inkubiert und die OD Werte mit dem entsprechenden Filter bestimmt. Die als positiv betrachteten Hybridome wurden auf einer 24 „*Well*“ Format Platte expandiert und die Überstände anschließend mit dem entsprechenden Core-Protein und der Blockierungslösung (Milchpulver) getestet. Diese Vermehrung war von Vorteil, um zu testen, ob das Hybridom weiterhin Antikörper produziert oder nicht. Andererseits lässt sich durch das zusätzliche Testen der Überstände mit der Blockierungslösung ausschließen, ob der produzierte mAk ein im Milchpulver vorkommendes Protein erkennt.

Die positiv gebliebenen Hybridome wurden in einer neuen Vertiefung einer 24 „*Well*“ Format Platte zum späteren Einfrieren expandiert. Auf diese Weise wurden die positiven Klone vor Kontaminationen geschützt, die im Laufe der Zellkulturarbeit eventuell auftreten könnten.

Gleichzeitig wurden Hybridomzellen kloniert. Hierbei wurden in einer 96 „Well“ Platte die Zellen so verdünnt, dass in manchen Vertiefungen nur eine Zelle vorlag. Hybridome, die auf diese Einzelzellen zurückgingen, wurden via ELISA bestätigt. Dadurch wurde für jeden Klon die Monoklonalität, die Abstammung aus einer einzigen Zelle, gewährleistet. Durch die Klonierung wird auch die Stabilität des jeweiligen Hybridomes erhöht. So werden die Zellen, die Antikörper produzieren, von jenen getrennt, die keine produzieren. Diese nicht produzierenden Zellen überwachsen häufig die Antikörper produzierenden Hybridome, was rasch zum Verlust dieser führen kann.

#### 3.3.4.1 „Screening“ der Fusionen von Splenozyten aus Mäusen, die mit KSPV Core-Protein immunisiert wurden

Nach zwei Fusionen wurden zwei Hybridome isoliert, die Antikörper gegen das KSPV Core Protein produzieren. Sie wurden als GRS-C1 und GRS-C2 bezeichnet. Diese Hybridome wurden expandiert und kloniert. Zellen von jedem Klon bzw. Subklon wurden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 3.3.4.2 „Screening“ der Fusionen von Splenozyten aus Mäusen, die mit BVDV Core-Protein immunisiert wurden

Bei drei Fusionen wurden sechs Hybridome isoliert, die Antikörper gegen das BVDV Core-Protein produzieren. Die Hybridome wurden als: GRS-C3, GRS-C4, GRS-C5, GRS-C6, GRS-C7 und GRS-C8 bezeichnet.

Jeder von diesen Hybridomen wurde expandiert und kloniert. Von jedem Klon bzw. Subklon, wurden Zellen zur Sicherung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 3.3.5 Isotypisierung der gewonnenen monoklonalen Antikörper

Bei mAk, die als Werkzeuge in der Laborarbeit eingesetzt werden, ist es wichtig zu wissen, zu welchem Isotyp sie gehören. Das liegt daran, dass sich die Isotypen in bestimmten Eigenschaften unterscheiden, die für ihre Anwendung relevant sind. Antikörper des IgG Isotypen stellen Monomere dar und sind für die meisten „assays“ gebräuchlicher als die der anderen Isotypen. Andererseits hängt es von dem Isotyp des Antikörpers ab mit welchem Ligand, Protein A oder G, eine Reinigung durchgeführt werden kann. Der Subtyp der hergestellten Antikörper wurde mit einem kommerziellen ELISA Test bestimmt. Alle gegen das Core Protein hergestellte mAk gehören zu dem Isotyp IgG mit einer kappa leichten Kette.

Die mAk GRS-C3 und -C6 gehören zum Subtyp IgG2b, während die übrigen Antikörper zu dem IgG1 Subtyp gehören (Tabelle 4).

Name mAk	Antigen	Ig Isotyp/Subtyp
GRS-C1	KSPV Core	IgG1 $\kappa^*$
GRS-C2		IgG1 $\kappa$
GRS-C3	BVDV Core	IgG2b $\kappa$
GRS-C4		IgG1 $\kappa$
GRS-C5		IgG1 $\kappa$
GRS-C6		IgG2b $\kappa$
GRS-C7		IgG1 $\kappa$
GRS-C8		IgG1 $\kappa$

\*kappa leichte Kette

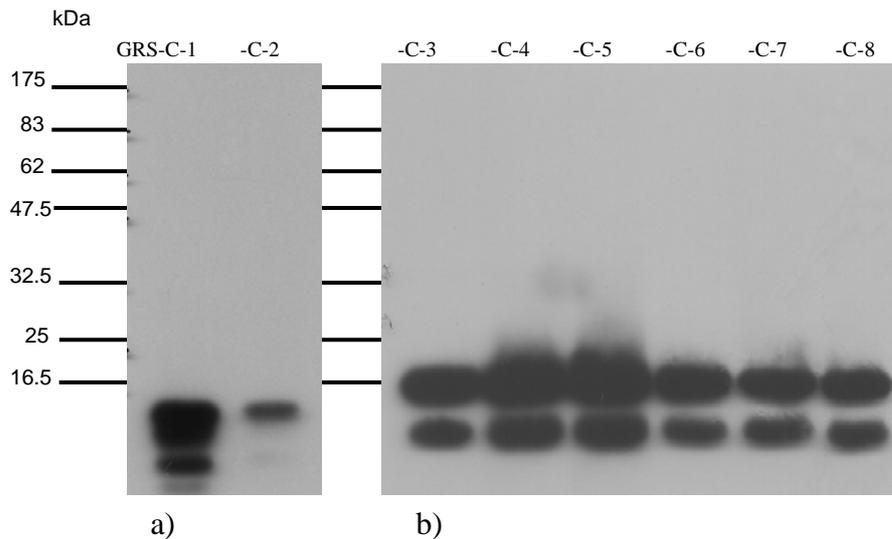
**Tabelle 4.** Immunglobulin Isotypen der gegen das pestivirale Core Protein hergestellten mAks.

### 3.4 Charakterisierung der anti Core-Protein mAks

#### 3.4.1 Reaktion der mAks im Western Blot mit gereinigtem bakteriellen Core-Protein

Die Reaktivität der, gegen das Core-Protein hergestellten, mAks wurde im Western Blot mit dem gereinigten Protein getestet, gegen das sie erzeugt wurden. So wurden die mAk GRS-C1 und GRS-C2 mit dem KSPV Core-Protein und die mAk GRS-C3, GRS-C4, GRS-C5, GRS-C6, GRS-C7 und GRS-C8 mit dem BVDV Core-Protein getestet.

Hierfür wurden 100ng Core<sub>KSPV</sub> oder 200ng Core<sub>BVDV</sub> in der SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und in Streifen geschnitten. Die Streifen wurden dann mit verdünntem Überstand der entsprechenden Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Streifen mit Peroxidase-gekoppelten anti Spezies Antikörper inkubiert. Schließlich wurden die Streifen erneut gewaschen und mit einem lumineszierenden Substrat inkubiert, um die Signale auf dem Röntgenfilm sichtbar zu machen. Alle mAks erkannten das entsprechende Protein in der Western Blot Analyse (Abbildung 8).



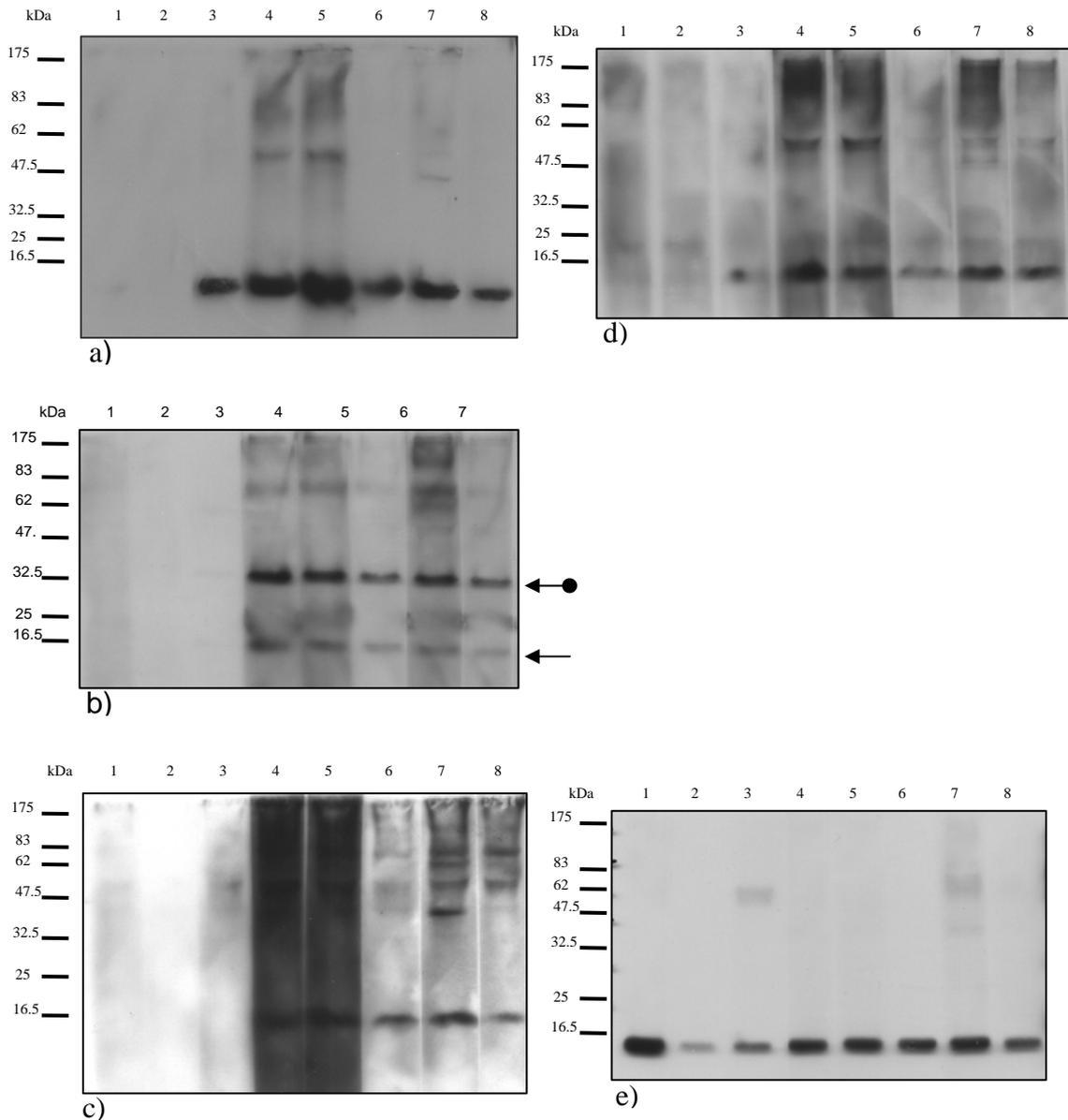
**Abbildung 8.** Reaktivität der anti Core mAk in Western Blot Analyse mit gereinigten Core Proteinen.

100ng gereinigtes KSPV Core (a) bzw. 200ng BVDV Core wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die mAks GRS-C1 und -C2 wurden mit dem KSPV Core (a), und die mAks GRS-C3, -C4, -C5, -C6, -C7 und -C8 mit dem BVDV Core (b) getestet.

#### 3.4.2 Nachweis des Core-Proteins in Virionen von Pestiviren verschiedener Spezies im Western Blot mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern

Zur Bestimmung der Reaktivität der mAks mit Core-Protein verschiedener Pestivirusspezies wurden Virionen von 13 Pestivirusisolaten im Western Blot analysiert.

Die Virionen wurden aus Überständen infizierter Kulturen gewonnen, durch Ultrazentrifugation konzentriert und mit SDS-PAGE analysiert. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde jedes Isolat mit jedem mAk im Western Blot analysiert. Bei allen hier getesteten Pestivirus Stämmen bzw. Isolaten konnte ein Protein in der Größe des Core-Proteins, ca. 14kDa, nachgewiesen werden (Abbildung 9).



**Abbildung 9.** Beispiele des Core-Protein Nachweises in Virionen von Pestiviren verschiedener Spezies durch Western Blot mit den anti Core mAks.

BVDV Typ 1 Stamm Osloss (a), BVDV Typ 2 Stamm 890 (b), BDV-1a Stamm BD-31 (c) und Giraffe (d) wurden in MDBK Zellen vermehrt, während die Erzeugung von KSPV Stamm Alfort (e) in SK-6 Zellen erfolgte. Die im Überstand vorhandenen Virionen wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit den anti Core-Protein mAks GRS-C1, -C2, -C3, -C4, -C5, -C6, -C7 und -C8 via Western Blot nachgewiesen. Zusätzlich zu dem Core-Protein, ist bei dem BVDV Typ 2 Stamm 890 (b) eine Bande von ungefähr 32kDa erkennbar. 1.- GRS-C1; 2.- GRS-C2; 3.- GRS-C3; 4.- GRS-C4; 5.- GRS-C5; 6.- GRS-C6; 7.-GRS-C7; 8.- GRS-C8. ← Core-Protein; ● Produkt von 32kDa.

Zusätzlich zu dem Core-Protein erkannten die monoklonalen Antikörper ein Produkt von ca. 30kDa bei dem Stamm 890.

Nicht jeder mAk erkannte das Core-Protein eines jeden Stammes bzw. Isolats (Tabelle 7).

Spezies	BVDV-1							BVDV-2		BDV		KSPV	Giraffe
	a	b		c	d	e	f	a	b	1a	2		
Stamm/ Isolat	C86	N.Y	Osloss	519	721	S10	11468	890	Gi-4	BD31	AZ79	Alfort <sub>tü</sub>	
mAk-GRS-C-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
mAk-GRS-C-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
mAk-GRS-C-3	+	+	+	+	+	-	+	(+)	+	-	-	+	+
mAk-GRS-C-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mAk-GRS-C-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mAk-GRS-C-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mAk-GRS-C-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mAk-GRS-C-8	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+

**Tabelle 7.** Reaktionsspektrum der anti Core mAks in der Western Blot Analyse von Virionen verschiedener Pestiviruspezies.

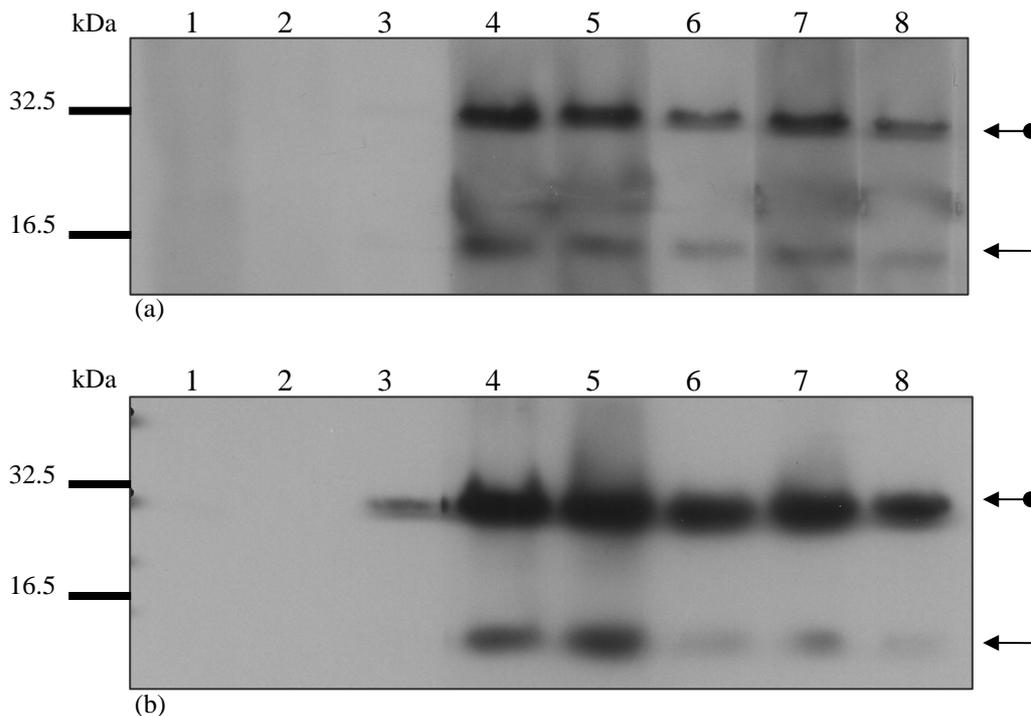
Kulturzellen, MDBK oder SK-6, wurden infiziert und die Virionen aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation gewonnen. Anschließend wurden die Proteine auf SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Überstand von anti Core-Protein mAks: GRS-C1; -C2; -C3; -C4; -C5; -C6; -C7 und -C8 wurde mit den transferierten Proteinen inkubiert und die Detektion erfolgte mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Chemiluminiszenz.

+ positive Reaktion; - negative Reaktion; (+) fragliche Reaktion

Die mAk GRS-C1 und GRS-C2 erkannten nur das KSPV Alfort<sub>tü</sub> Core-Protein gegen das sie hergestellt worden waren. Dagegen erkannten die mAk GRS-C4, -C5, -C6, -C7, und -C8 das Core-Protein aller getesteten Pestiviren. Der mAk GRS-C3 erkannte das Core-Protein von BVDV-1e S10, BDV-1a BD31 und BDV-2 AZ79 nicht.

Die Intensität des Signals variierte je nach Antikörper, so war das Signal vom GRS-C3 gegen BDV-1a BD31 und BDV-2 AZ79 und Giraffe Virus schwächer als das von den anderen Antikörpern. Der mAk GRS-C8 erkannte das BVDV-1f 11468 weniger stark als die anderen mAks.

Bei dem BVDV-2a Stamm 890 und dem BVDV-2b Isolat Giessen-4 wurde zusätzlich zu der Core-Protein Bande, eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 30kDa nachgewiesen, deren Herkunft nicht bekannt ist (Abbildung 10).



**Abbildung 10.** Nachweis eines Core Protein höheren Molekulargewichts mittels Western Blot Analyse von Virionen von BVDV-2 Pestiviren.

MDBK Zellen wurden mit dem BVDV Typ 2 Stamm 890 (a) und Isolat Giessen 4 (b) infiziert. Die Virionen werden durch Zentrifugation aufkonzentriert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose Membran wurde Überstand der anti Core mAk Hybridome: GRS-C1 (1); -C2 (2); -C3 (3); -C4 (4); -C5 (5); -C6 (6); -C7 (7) und -C8 (8) im Western Blot getestet. Zusätzlich zum Core-Protein Monomer ist ein Protein in der Größe von 32kDa erkennbar. (1) GRS-C1; (2) GRS-C2; (3) GRS-C3; (4) GRS-C4; (5) GRS-C5; (6) GRS-C6; (7) GRS-C7; (8) GRS-C8; ←● 32kDa Produkt; ← Core Monomer.

### 3.4.3 Epitop Lokalisierung der anti Core-Protein mAks

Zur Identifizierung der Epitope der jeweiligen mAks, wurden am C-Terminus verkürzte Formen beider Core-Proteine zur prokaryotischen Expression generiert. Mit Lysaten von induzierten Bakterienkulturen wurden die mAks mit den verkürzten Formen des entsprechenden Proteins im Western Blot getestet.

#### 3.4.3.1 Epitop Lokalisierung von mAk GRS-C1 und GRS-C2

Zur Lokalisierung der von den mAks GRS-C1 und GRS-C2 erkannten Epitope, dienten Verkürzungen des Konstrukts p250 (GST-N<sup>pro</sup>-Core).

N<sup>pro</sup>-Core Gen Fragmente mit C-Termini an Positionen (Aminosäure Position ist bezogen auf das Polyprotein des KSPV Gesamtklons p447): Asparagin<sup>236</sup>, Glycin<sup>226</sup>, Prolin<sup>205</sup>, Serin<sup>200</sup> und Glutamat<sup>195</sup> wurden mittels PCR amplifiziert und in das Expressionsplasmid pGEX6P-1 kloniert. Verschiedene Klone wurden durch Sequenzierung verifiziert, bevor sie für die Proteinexpression verwendet wurden.

Diese Konstrukte wurden wiederum in *E.coli* Zellen (Stamm Rosetta) exprimiert und die Reaktivität der mAks GRS-C1 und -C2 mit den verkürzten Core-Proteinen im Western Blot untersucht. Beide Antikörper erkennen die Konstrukte: Serin<sup>169</sup>-Asparagin<sup>236</sup>, Serin<sup>169</sup>-Glycin<sup>226</sup>, Serin<sup>169</sup>-Prolin<sup>205</sup> und Serin<sup>169</sup>-Serin<sup>200</sup>, aber nicht das Konstrukt Serin<sup>169</sup>-Glutamat<sup>195</sup> (Tabelle 8).

Konstrukt	Exprimierte Sequenz von Core	mAk	
		GRS-C1	GRS-C2
p250 KSPV Core bis Lys <sup>249</sup>	S <sup>169</sup> DDGASGSKDKKPPDRMNGKGLKIAPREHEKDSKTKPPD ATIVVEGVKYYQIKKKGKVKGKNTQDGLYHNKNKPPESRK KLEK <sup>249</sup> 6-His	+	+
pCore 5	S <sup>169</sup> DDGASGSKDKKPPDRMNGKGLKIAPREHEKDSKTKPPD ATIVVEGVKYYQIKKKGKVKGKNTQDGLYHN <sup>236</sup>	+	+
pCore 6	S <sup>169</sup> DDGASGSKDKKPPDRMNGKGLKIAPREHEKDSKTKPPD ATIVVEGVKYYQIKKKGKVKG <sup>226</sup>	+	+
pCore 8	S <sup>169</sup> DDGASGSKDKKPPDRMNGKGLKIAPREHEKDSKTKPP <sup>205</sup>	+	+
pCore 14	S <sup>169</sup> DDGASGSKDKKPPDRMNGKGLKIAPREHEKDS <sup>200</sup>	+	+
pCore 11	S <sup>169</sup> DDGASGSKDKKPPDRMNGKGLKIAPRE <sup>195</sup>	-	-

**Tabelle 8.** Eingrenzung des Bereichs vom KSPV Core-Protein, in dem die mAks GRS-C1 und GRS-C2 binden. Überstand der anti Core mAks GRS-C1 und -C2 wurde im Western Blot mit Lysaten von induzierten *E.coli* Rosetta<sup>TM</sup> Bakterien getestet, die mit den Plasmiden p250, pCore 5, pCore 6, pCore 8, pCore 14 und pCore 11 transformiert wurden. Die angegebene Position der Aminosäurereste bezieht sich auf den KSPV Gesamtklon p447. (+) Positive Reaktion; (-) Negative Reaktion

### 3.4.3.2 Epitop Lokalisierung der mAks GRS-C3, GRS-C4, GRS-C5, GRS-C6, GRS-C7 und GRS-C8

In gleicher Weise, wie zuvor beschrieben, erfolgte die Eingrenzung der Epitope des BVDV Core-Proteins. Allerdings wurde für diese Konstrukte eine andere Klonierungsstrategie gewählt.

In den vorherigen Experimenten mit den verkürzten Formen des KSPV Core-Proteins wurde festgestellt, dass diese nach der Spaltung von N<sup>pro</sup> ziemlich instabil waren und schnell abgebaut wurden. Aus diesem Grund wurde die Generierung eines für GST-Core<sub>BVDV</sub>-6His kodierenden Konstruktes angestrebt. Das Plasmid p940 (GST-N<sup>pro</sup>-Core-6His), diente als „Template“ für eine Deletions-PCR. Von den verwendeten Primern band einer an das 3' Ende des Gens vom GST-Protein und der andere an das 5' Ende des Core-Protein Gens. Die entgegengesetzte Orientierung der Primer ermöglichte es, die Gesamtsequenz des Plasmids ohne das N<sup>pro</sup> Gen zu amplifizieren. Nach Religation des PCR Produktes entstand folgendes Konstrukt: GST-Core<sub>BVDV</sub>-6His, das als „Template“ für weitere PCRs diente, in denen das Core-Protein am C-Terminus weiter verkürzt wurde. Für diese Verkürzungen wurde eine ähnliche Strategie angewendet, dabei band einer der Primer an das 5' Ende der Hexahistidin

Nukleotidsequenz und drei Primer banden an verschiedenen Stellen des 3' Endes vom Core-Protein Gen. Auf diese Weise wurden drei Konstrukte hergestellt, die für das BVDV Core-Protein von Serin<sup>169</sup> bis Lysin<sup>242</sup>, von Serin<sup>169</sup> bis Lysin<sup>224</sup> und von Serin<sup>169</sup> bis Lysin<sup>206</sup> kodierte. Die gewonnenen Plasmide wurden sequenziert und jeweils ein richtiger Klon eines jeden Konstruktes in *E.coli* Zellen (Stamm Rosetta) exprimiert. Anschließend wurden die Überstände der mAks GRS-C3, -C4, -C5, -C6, -C7 und -C8 mit Lysaten nicht induzierter und induzierter Bakterienkulturen eines jeden Konstruktes im Western Blot getestet.

Alle mAks erkannten das Core-Protein Konstrukt Serin<sup>169</sup> bis Lysin<sup>242</sup>, während das Konstrukt von Serin<sup>169</sup> bis Lysin<sup>224</sup> von den mAks GRS-C5, -C6, und -C7, jedoch nicht von den mAks GRS-C3, -C4 und -C8 erkannt wurde. Die Verkürzung Serin<sup>169</sup> bis Lysin<sup>206</sup> wurde von keinem dieser mAks erkannt (Tabelle 9).

Konstrukt	Exprimierte Sequenz von Core	mAk					
		GRS-C3	GRS-C4	GRS-C5	GRS-C6	GRS-C7	GRS-C8
p940 Sequenz BVDV Core bis Glu <sup>251</sup>	S <sup>169</sup> DTKDEGVVRKKQKPPDRLEKG RMKITPKSEKDSKTKPPDATIVVD GVKYQVKKKGGKVKSKNTQDGLY HNKNKPQESRKKLE <sup>251</sup> 6 His	+	+	+	+	+	+
pCore 26	S <sup>169</sup> DTKDEGVVRKKQKPPDRLEKG RMKITPKSEKDSKTKPPDATIVVD GVKYQVKKKGGKVKSKNTQDGLY HNKNK <sup>242</sup> 6 His	+	+	+	+	+	+
pCore 27	S <sup>169</sup> DTKDEGVVRKKQKPPDRLEKG RMKITPKSEKDSKTKPPDATIVVD GVKYQVKKK <sup>224</sup> 6 His	-	-	+	+	+	-
pCore 28	S <sup>169</sup> DTKDEGVVRKKQKPPDRLEKG RMKITPKSEKDSKTK <sup>206</sup> 6 His	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 9.** Eingrenzung des Bereichs vom BVDV Core-Protein, in dem die mAks GRS-C3, -C4, -C5, -C6, -C7 und -C8 binden.

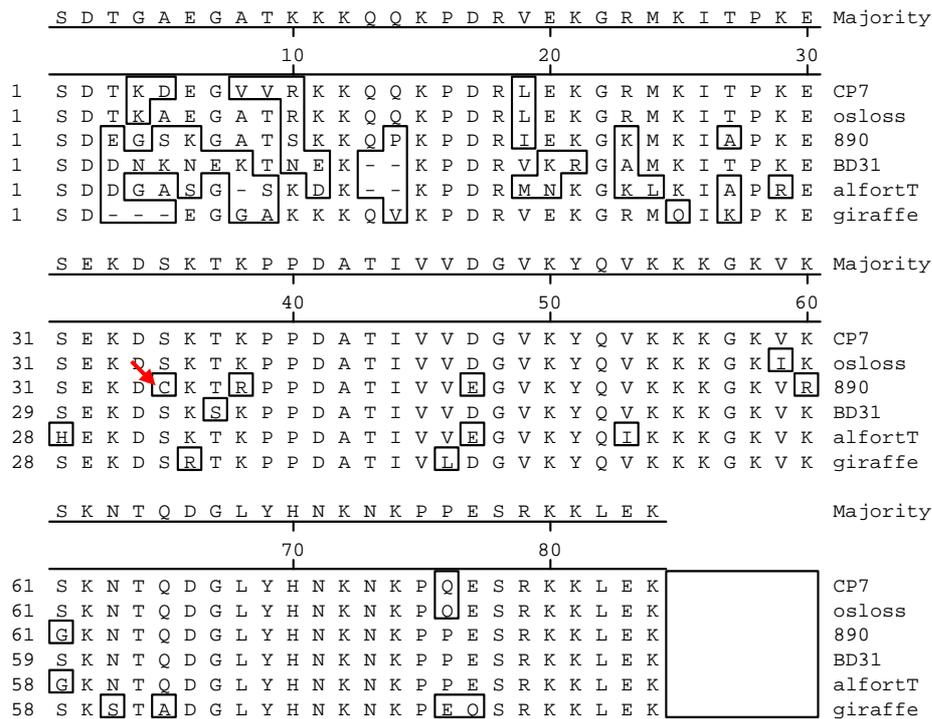
Überstand von den Hybridomen: GRS-C3; -C4; -C5; -C6; -C7 und -C8 wurde im Western Blot mit Lysaten von induzierten Bakterien getestet, die mit den Plasmiden p940; pCore 26; pCore 27 und pCore 28 transformiert wurden. Die angegebene Position der Aminosäurereste bezieht sich auf den BVDV Gesamtklon ncp7.

(+) positive Reaktion; (-) negative Reaktion

### 3.5 Charakterisierung des höheren Molekulargewichtproduktes des Core-Proteins vom Stamm 890 und vom Isolat Gi-4

Bei BVDV-2a Stamm 890 und BVDV-2b Isolat Giessen-4 wurde durch die mAks ein Produkt im Western Blot detektiert, dessen apparentes Molekulargewicht ca.30kDa beträgt. Ausgehend von der Größe dieses Proteins wäre es möglich, dass es sich dabei um ein Core-Protein Homodimer handelt. Diese Hypothese wurde dadurch gestützt, dass die Aminosäuresequenz des Core-Proteins des BVDV-2a Stamms 890 ein Cystein besitzt, das bei

den anderen Pestivirusstämmen fehlt. Dieser Cysteinrest könnte zur Bildung eines Core-Protein Homodimers führen (Abbildung 12).

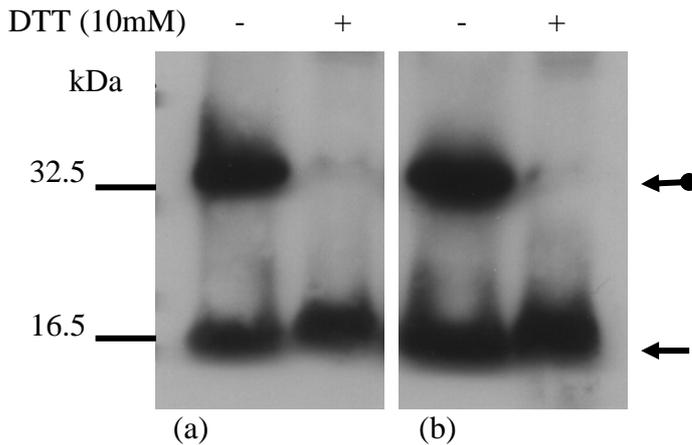


**Abbildung 12.** Darstellung des Cysteinrestes<sup>203</sup> des Core-Proteins beim BVDV Typ 2 Stamm 890.

Die Aminosäuresequenz der Core-Proteine der Pestiviren verschiedener Spezies: CP-7 (BVDV-1b); Osloss (BVDV-1b); 890 (BVDV-2a); BD31 (BDV-1a); Alfort<sub>ti</sub>(KSPV); und Giraffe wurde mit Hilfe des Programms MegAlign verglichen. Mit einem roten Pfeil wird das Cystein<sup>203</sup> in der Proteinsequenz des Stammes 890 gekennzeichnet.

### 3.5.1 Stabilität des Produktes in Anwesenheit reduzierender Reagenzien

Zunächst wurde untersucht, ob dieses 30kDa Produkt tatsächlich durch Disulfidbrücken gebildet wird. Hierfür wurden Virionen des Stammes 890 und des Isolats Giessen-4 unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Core-Protein im Western Blot mit dem mAk GRS-C4 nachgewiesen. Während unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Bande von etwa 30kDa auftrat, konnte nach der Reduktion nur eine Bande in der Größe von 14kDa nachgewiesen werden (Abbildung 13). Offensichtlich tritt bei den genannten BVDV Isolaten das Core-Protein als Monomer und Cys-Cys Homodimer auf.



**Abbildung 13.** Western Blot Analyse unter reduzierenden Bedingungen von Virionen zweier BVDV Typ 2 Pestiviren.

Virionen des BVDV Typ 2 Pestiviren Stamme 890 (a) und des BVDV Typ 2 Isolats Giessen 4 (b) wurden durch Zentrifugation aufkonzentriert. Vor der SDS-PAGE wurde ein Anteil der Probe mit 10mM DTT reduziert (+). Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose Membran wurde ein Western Blot mit dem anti Core mAk GRS-C4 durchgeführt. Nach Reduktion mit 10mM DTT ist nur die Bande eines Core Monomers zu erkennen.

(-) ohne DTT; (+) mit DTT.

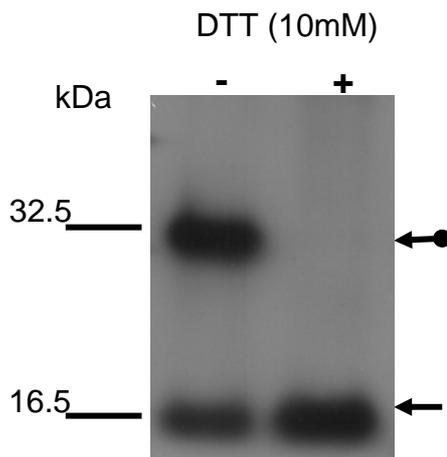
← Core Monomer  
 ←● 32kDa Produkt

### 3.5.2 Funktion der Homodimerisierung von Core

Innerhalb der Pestiviren, die im Rahmen dieser Dissertation im Western Blot untersucht wurden und deren Proteinsequenz zur Verfügung stand, konnte das Vorhandensein eines Cysteins nur bei dem BVDV-2 Stamm 890 festgestellt werden. Anstelle dieses Cysteinrestes ist beim KSPV Alfort<sub>ti</sub> ein Serin vorhanden (Abbildung 12). Es war einerseits von Interesse zu bestimmen, ob ein Cystein an der genannten Stelle in dem KSPV Stamm Alfort<sub>ti</sub> zur Bildung eines Core-Protein Homodimers führen würde, andererseits ob die Dimerisierung Auswirkung auf die Vermehrungsfähigkeit von Pestiviren hätte. Daher wurde mittels reverser Genetik im KSPV Gesamtklon p447 das Serin<sup>200</sup> durch ein Cystein ersetzt. Die „quick change“ PCR wurde in einem Vorklon durchgeführt. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide binden an derselben Stelle, aber in entgegengesetzter Orientierung und enthalten in der Mitte ihrer Sequenz die für die Mutation nötigen Basenaustausche. Auf diese Weise wird die gesamte plasmidische Sequenz amplifiziert, aber unter Einführung der gewünschten Mutation. Nach der Sequenzierung wurde das mutierte Fragment aus dem Vorklon mit Hilfe von Restriktionsenzymen isoliert und in den ebenso behandelten Gesamtklon ligiert (Klon pCore29). Das resultierende Plasmid diente als Matrize für eine *in vitro* Transkription und die gewonnene kRNS wurde dann in Zellkulturzellen elektroporiert. Mit dem Überstand von elektroporierten Zellen wurde eine Titration durchgeführt, wobei

festgestellt wurde, dass das mutierte Virus ein Titer aufwies, der dem des Wildtyps annähernd entsprach ( $1 \times 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Zum Nachweis des mutagenisierten Core-Proteins wurden Virionen aus dem Überstand von mit pCore29 infizierten SK6 Zellen konzentriert, unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das Protein wurde mit dem mAk GRS-C1 in Western Blot Analyse detektiert.

Die Mutation des Serinrestes zu einem Cystein führte zur Bildung eines Core Homodimers, das in Virionen des mutierten Virus zu finden war (Abbildung 14).



**Abbildung 14.** Bildung eines Disulfid verbrückten Core Homodimers durch Mutation Serin<sup>200</sup>-Cystein im Virus pCore29.

In der cDNS Kopie von KSPV (p447) wurde durch Mutagenese das Codon Ser<sup>200</sup> (TCA) zu Cystein (TCC) verändert (pCore29). Von der mutagenisierten cDNS wurden Transkripte erzeugt und damit mittels Elektroporation SK-6 Zellen transfiziert. Das Virus pCore 29 (Ser<sup>200</sup>-Cys) wurde in SK-6 Zellen vermehrt und Virionen aus dem Überstand durch Zentrifugation gewonnen. Ein Teil der Probe wurde mit 10mM reduziert (+), bevor die SDS-PAGE bzw. ein Western Blot mit dem anti Core mAk GRS-C4 durchgeführt wurden.

Bei der nicht reduzierten Probe trat zusätzlich zu der Bande des Core Monomers ein Produkt in der Größe eines Core Homodimers auf, das sich mit 10mM DTT vollständig zu Core Monomer reduzieren ließ. (-) ohne DTT; (+) mit DTT.

←● Core Homodimer

← Core Monomer

### 3.6 RNS bindende Aktivität des KSPV Alfort<sub>iii</sub> Core-Proteins

Es wird angenommen, dass das Core-Protein mit der viralen RNS im Virion assoziiert vorliegt. Während der hohe Grad an positiver Ladung eine Wechselwirkung des Core-Proteins mit Nukleinsäure wahrscheinlich erscheinen lässt, wurde eine solche Bindung bisher noch nicht beschrieben.

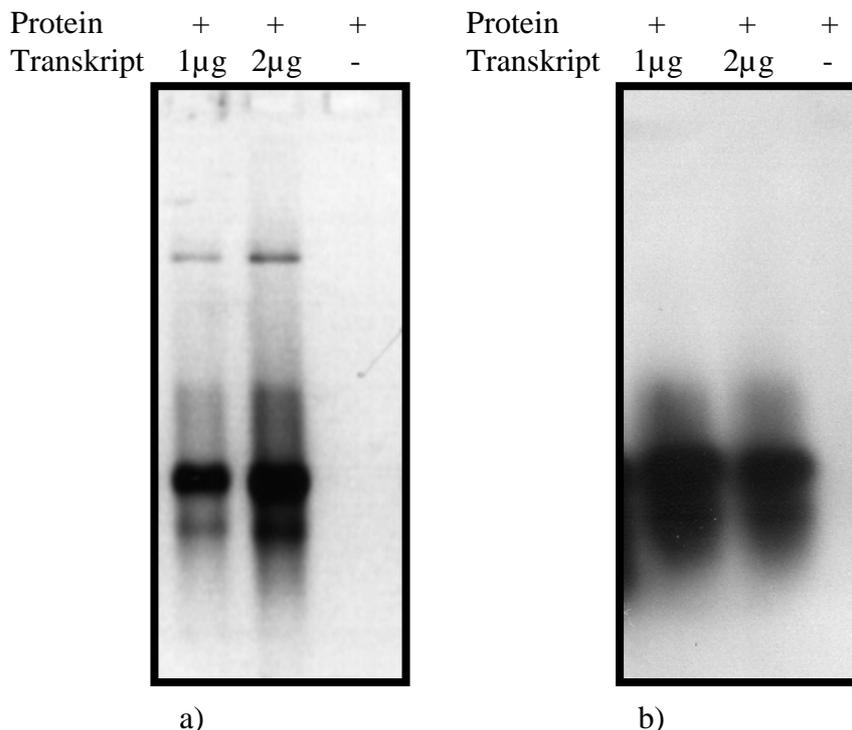
Die RNS bindende Aktivität des Cores wurde in einem Protein-RNS Bindungsassay qualitativ getestet. Dieser Test beruht darauf, dass positiv geladene Proteine in nicht denaturierenden Agarosegelen, aufgrund einer Bindung mit Nukleinsäure, in der Lage sind von Kathode zu Anode zu migrieren (Geigenmuller-Gnirke et al., 1993).

Die Assoziation des Proteins mit Nukleinsäure wird anschließend mit einem Immunoblot verifiziert. Experimentell wurde die zu testende RNS mit aufgereinigtem KSPV Core inkubiert und die Reaktion in einem Agarosegel in Anwesenheit von Ethidiumbromid aufgetrennt. Das Agarosegel wurde anschließend durch Kapillarblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das Core-Protein mit dem anti Core mAk GRS-C1 detektiert.

### 3.6.1 Bindung des Core-Proteins an pestivirale RNS

Zunächst wurde die spezifische Bindung des Core-Proteins an pestivirale RNS getestet.

Hierfür wurde vollständige cRNS des KSPV *in vitro* transkribiert und mit 50ng Core-Protein inkubiert. Während in Western Blot in den Spuren ohne RNS kein Core-Protein nachweisbar ist, komigrierte Core mit der RNS von KSPV (Abbildung 15).



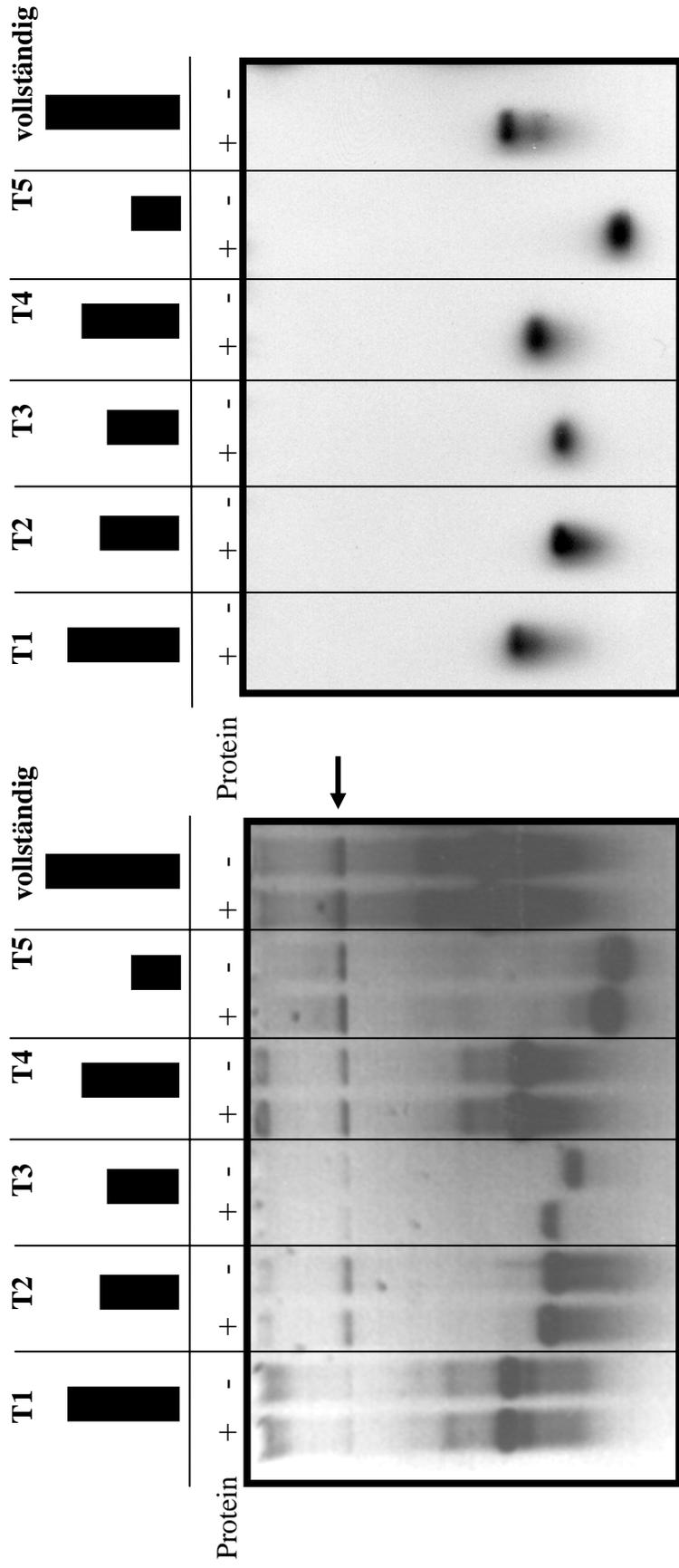
**Abbildung 15.** Bindungsaktivität des KSPV Core-Proteins an *in vitro* transkribierte RNS des KSPV Gesamtklons Alfort<sub>ti</sub> p447.

Die cRNS des KSPV Gesamtklons p447 wurde *in vitro* erzeugt und mit dem gereinigten Core-Protein inkubiert. Anschließend wurden die Proben der RNS mit bzw. ohne Protein auf einem Agarosegel laufengelassen und die RNS mit EtBr sichtbar gemacht (a). Der Nachweis von Core-Protein erfolgte durch Western Blot nach Transfer

des Agarosegels auf Nitrozellulose mit dem anti Core mAk GRS-C1 (b). Core-Protein ist nur in Verbindung mit RNS nachweisbar. (-) ohne Protein oder RNS; (+) mit Protein.

### 3.6.2 Bindung des Core-Proteins an KSPV RNS Transkripte verschiedener Länge

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob das Core-Protein nur in einen bestimmten Bereich der genomischen RNS von Pestiviren bindet. Um einen solchen Bereich zu identifizieren, wurden „run off“ Transkripte von p447 hergestellt, die 3'-terminal verkürzt waren. Für die Herstellung dieser Transkripte wurde das Plasmid p447 an fünf Stellen mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Nsi I<sub>10490</sub>, Bgl II<sub>3945</sub>, EcoR I<sub>5560</sub>, NgoMI V<sub>8338</sub>, Sbf I<sub>1511</sub>) in jeweils einzelnen Reaktionen linearisiert und mit der Sp6 RNS Polymerase transkribiert. Die fünf verschiedenen „run off“ Transkripte wurden mit gereinigtem Core-Protein inkubiert und die Bindung nach Elektrophorese und Western Blot beurteilt. In allen Fällen ließ sich eine Komigration von RNS und Core-Protein nachweisen. Eine Komigration mit DNS konnte dagegen nicht festgestellt werden (Abbildung 16).

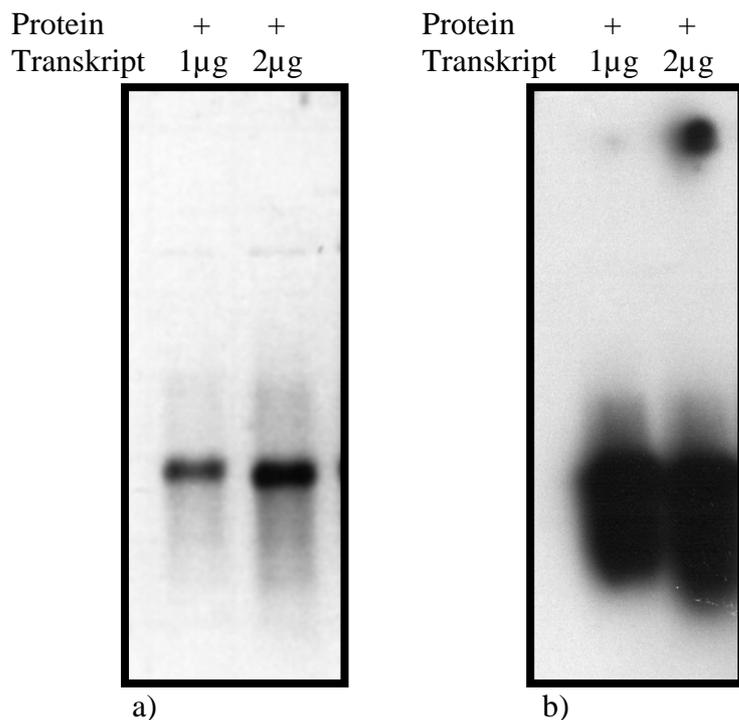


**Abbildung 16.** Bindung des KSPV Core-Proteins an *in vitro* RNS Transkripte verschiedener Länge des KSPV Alfort<sub>III</sub> p447 Gesamtklons. C-terminal trunkierte Transkripte des KSPV Alfort<sub>III</sub> Gesamtklons p447 wurden hergestellt und mit gereinigtem Core-Protein inkubiert. Dann wurden beide Proben mit (+) und ohne (-) Protein auf einem Agarosegel in Anwesenheit von EtBr aufgetrennt (a). Der Nachweis des Core-Proteins erfolgte durch Western Blot mit dem mAk GRS-C1 nachdem das Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet wurde. Eine Bindung des Core-Proteins an die RNS ist am Nachweis des Cores im Western Blot zu erkennen. (T1-T5) Transkripte 1 bis 5; (Balken verschiedener Größe) stehen für Transkripte unterschiedlicher Länge; (vollständig) Transkript des ganzen Genoms; (+) mit Protein; (-) ohne Protein; (Pfeil) Plasmid DNS, die als „Template“ für die *in vitro* Transkription diente.

### 3.6.3 Bindung des Core-Proteins an nicht pestivirale RNS

Zur Bestimmung der Bindungsspezifität war es notwendig zu untersuchen, ob das Core Protein auch an nicht pestivirale RNS bindet. Als Substrat für diese Experimente diente die genomische RNS von Sindbis Virus, sowie ribosomale RNS. Zuerst wurde cRNS ausgehend von einem Plasmid hergestellt, das eine vollständige Kopie des Sindbis Virus Genom enthält (pToto 57).

Das Core-Protein band auch die alphavirale RNS, was anhand der positiven Reaktion in der Western Blot Analyse zu erkennen ist (Abbildung 17).



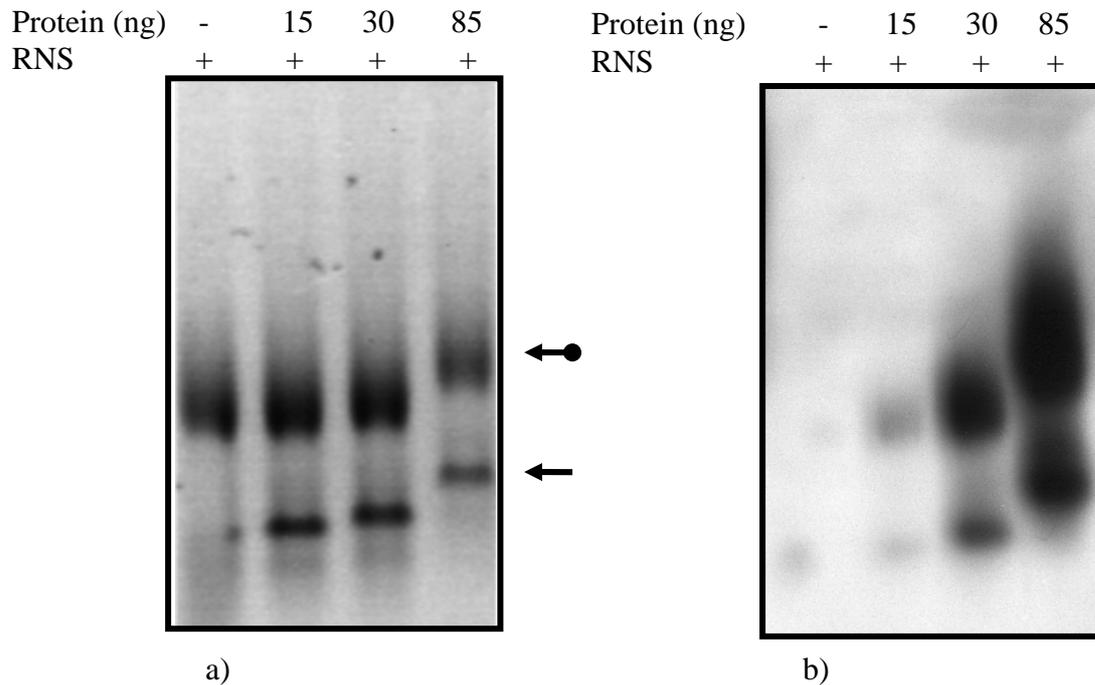
**Abbildung 17.** Bindungsaktivität des KSPV Core-Proteins an Sindbis Virus RNS.

Die RNS des Sindbis Virus Gesamtklons pToto57 wurde *in vitro* transkribiert und zwei verschiedene Mengen des Transkriptes mit gereinigtem Core-Protein inkubiert. Nachdem die Proben auf einem Agarosegel mit EtBr aufgetrennt wurden (a), erfolgte die Detektion des Core-Proteins im Western Blot mit dem mAk GRS-C1 nach dem Transfer des Agarosegels auf eine Nitrozellulosemembran (b). (+) mit Protein.

Um die Bindung von Core-Protein an ribosomale RNS zu untersuchen, wurde die gesamte RNS aus SK-6 Zellen gewonnen. Da die ribosomale RNS den höchsten Anteil der zellulären RNS darstellt (>90 Prozent) (Lodish et al., 1996), wurde die Bindung des Core-Proteins an ribosomale RNS mit der gesamten RNS aus SK-6 Zellen durchgeführt. Der Bindungsassay erfolgte mit 15ng, 30ng und 85ng von gereinigtem Core-Protein und 1 $\mu$ g RNS.

Sowohl bei der EtBr Färbung als auch bei dem Western Blot waren zwei Banden unterschiedlicher Größe zu sehen, was auf eine Bindung des Core-Proteins an diese RNS

hinweist (Abbildung 18). Ebenso wurde eine Änderung in der Mobilität der RNS („*shift*“) beobachtet, die von der eingesetzten Proteinmenge abhängig war.



**Abbildung 18.** Bindung des KSPV Core-Proteins an ribosomale RNS.

RNS wurde aus SK-6 Zellen isoliert und ohne bzw. mit verschiedenen Mengen von Core-Protein inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch in Anwesenheit von EtBr aufgetrennt (a). Nach der Nukleinsäure Färbung sind zwei Banden erkennbar, bei denen es sich wahrscheinlich um die 28S bzw. 18S ribosomale Untereinheit handelt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine vom Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran und das Core wurde mit dem mAk GRS-C1 im Western Blot detektiert (b). Das Core-Protein bindet an rRNS, deren Veränderung im Laufverhalten („*shift*“) bei Proteinmengen von 30ng und 85ng auf dem EtBr gefärbten Gel erkennbar ist. (-) ohne Protein; (+) mit RNS.

←● 28S ribosomale Untereinheit

← 18S ribosomale Untereinheit

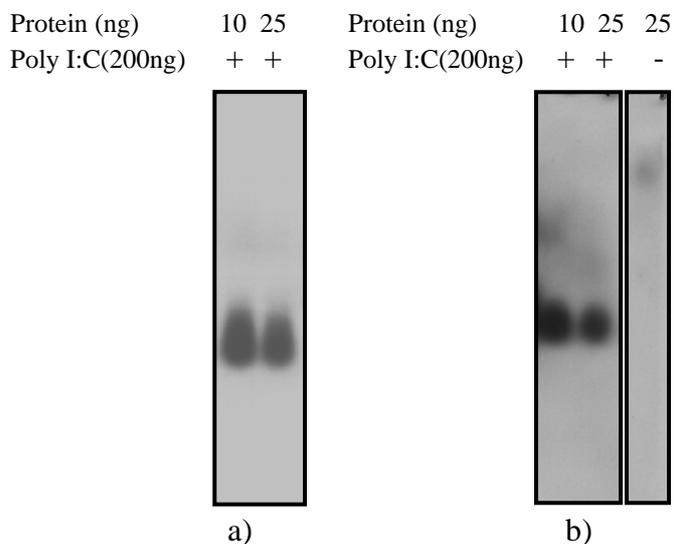
### 3.6.3.1 Bindung des Core-Proteins an RNS Homopolymere

Da offensichtlich keine besondere Spezifität für die RNS Bindung des Core-Proteins vorlag, könnte die Untersuchung der Bindung des Core-Proteins an RNS Homopolymere Hinweise darauf liefern, ob dieses Protein eine Präferenz für eine bestimmte Art RNS besitzt. Als Substrat für dieses Experiment dienten kommerzielle Poly-A, Poly-G und Poly-U Homopolymere unterschiedlicher Länge. In allen Fällen war nach Inkubation von RNS und Core-Protein eine Komigration mit der Nukleinsäure nachweisbar.

### 3.6.4 Bindung des Core-Proteins an dsRNS

Die Bindung des Core-Proteins an dsRNS wurde mit kommerziellem Poly I:C untersucht. Das Poly I:C besteht aus gepaartem Inosin und Cytosin, wodurch die RNS nur als Doppelstrang vorkommt.

200ng Poly I:C wurden mit verschiedenen Mengen von Core-Protein inkubiert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Bei der Auswertung der EtBr Färbung ist erkennbar, dass Poly I:C keine scharfe Bande formt, was auf die unterschiedliche Größe der Poly I:C Polymere zurückgeführt werden kann. Im Western Blot gleicht das Wanderungsverhalten des Core-Proteins dem des Poly I:C im Agarosegel (Abbildung 19). Offensichtlich bindet das Core-Protein auch an doppelsträngige RNS.



**Abbildung 19.** Bindung des KSPV Core-Proteins an dsRNS (poly I:C).

Zwei verschiedene Mengen an Core-Protein wurden mit der synthetischen, doppelsträngigen RNS poly I:C inkubiert und auf einem Agarosegel laufengelassen, wobei die RNS mit EtBr eingefärbt ist (a). Danach wurde das Core aus dem Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem anti Core mAk GRS-C1 im Western Blot detektiert (b). (+) mit Poly I:C; (-) ohne Poly I:C.

### 3.7 Nachweis des Core-Proteins von Pestiviren mit indirekter Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisierung des Core-Proteins in infizierten Zellen sind die hergestellten anti Core mAks ein sehr nützliches Werkzeug. Von Interesse war zu testen, wie zuverlässig das Core-Protein von Pestiviren verschiedener Spezies in indirekter Immunfluoreszenz mit diesen mAks detektiert werden kann.

Die Infektion von SK-6 Zellen erfolgte mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>iii</sub>, während MDBK Zellen mit verschiedenen BVDV bzw. BDV Stämmen/Isolaten und Giraffe Virus infiziert wurden. Die Zellen wurden auf Deckgläschen („glass coverslips“) kultiviert und nach 48 Stunden fixiert bzw. permeabilisiert. Hybridom Überstände der mAks GRS-C1, -C2, -C3, -

C4, -C5, -C6, -C7 und -C8, wurden bei der indirekten Immunfluoreszenz als primäre Antikörper eingesetzt und die gebundenen Antikörper mit einem Cy3 markierten Sekundärantikörper detektiert.

Das Core-Protein aller getesteten Stämme bzw. Isolate konnte mit diesem „Panel“ mAks in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 6).

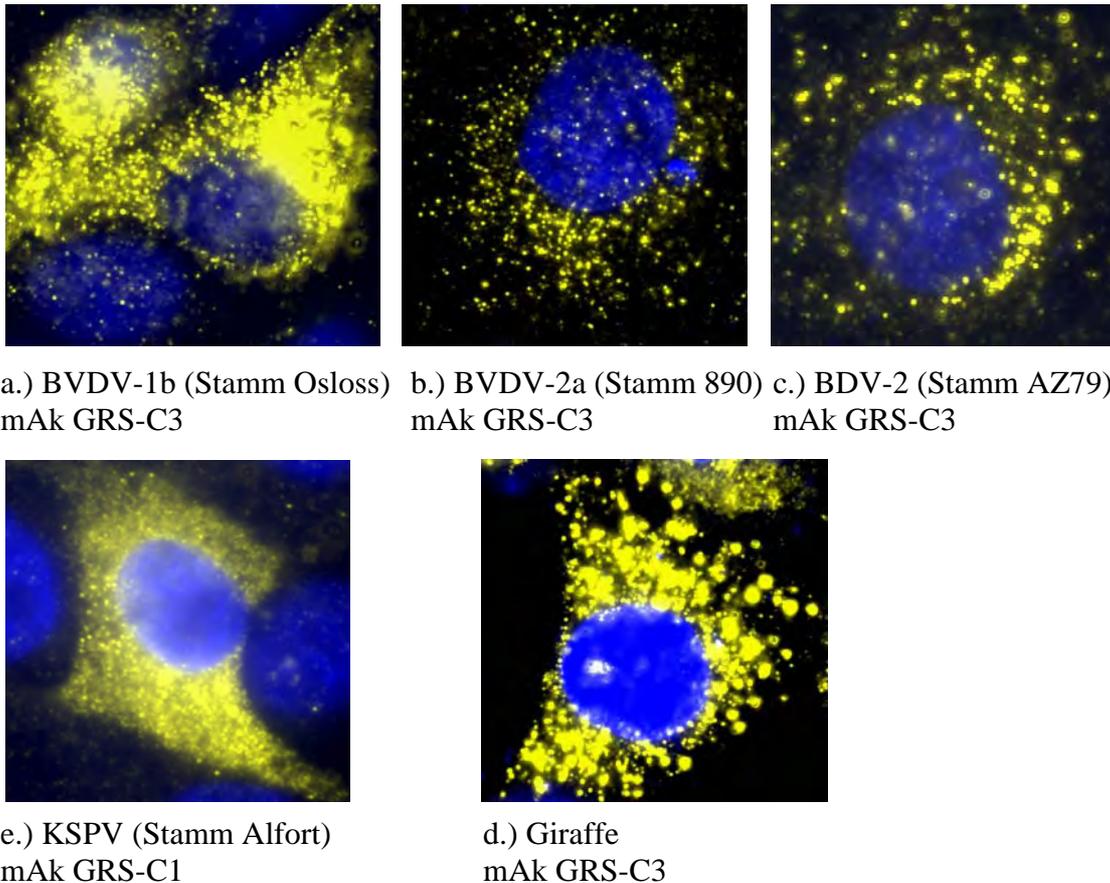
mAk	Stamm/Isolat							
	BVDV-1a c86	BVDV-1b Osloss	BVDV-2a 890	BVDV-2b Giessen-4	BDV-1a BD31	BDV-2 AZ79	Giraffe	KSPV Alfort <sub>tü</sub>
GRS-C1	-	-	-	-	-	-	-	+
GRS-C2	-	-	-	-	-	-	-	+
GRS-C3	+	+	+	+	+	+	+	NT
GRS-C4	+	+	+	+	+	+	+	NT
GRS-C5	-	+	-	+	+	+	+	NT
GRS-C6	+	-	+	+	+	+	+	NT
GRS-C7	+	+	+	+	+	+	+	NT
GRS-C8	+	+	+	-	-	-	+	NT

**Tabelle 6.** Reaktionsspektrum der gewonnenen mAks in Immunfluoreszenz.

MDBK Zellen wurden mit BVDV Typ 1 Stamm c86 und Stamm Osloss, BVDV Typ 2 Stamm 890 und Isolat Giessen-4, BDV Stamm BD31 und Isolat AZ79, sowie Giraffe infiziert, während SK-6 Zellen mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>tü</sub> infiziert wurden. Infizierte und nicht infizierte Zellen wurden dann fixiert und die Zellmembran permeabilisiert. Anschließend wurden die Überstände der Hybridome, die die anti Core mAks: GRS-C1; -C2; -C3; -C4; -C5; -C6; -C7 und -C8 produzieren, in indirekter Immunfluoreszenz getestet.

(+) positive Reaktion; (-) negative Reaktion; (NT) nicht getestet

Die Verteilung der Fluoreszenz des Core-Proteins war granulär und in einigen Zellen konnte eine diffuse Verteilung des Proteins festgestellt werden (Abbildung 20).



**Abbildung 20.** Nachweis des Core-Proteins verschiedener Pestiviren durch Immunfluoreszenz.

MDBK Zellen wurden mit BVDV Typ 1 (a) und 2 (b), BDV (c) und Giraffe (d) infiziert und mit dem mAk GRS-C-3 inkubiert. Für den Nachweis des Cores von KSPV wurden SK-6 Zellen mit KSPV Alfort<sub>iii</sub> infiziert und der mAk GRS-C1 verwendet. Gebundene Antikörper wurden durch einen mit Cy3 gekoppelten anti Spezies mAk erkannt. Zellkerne sind durch Färbung mit DAPI blau angefärbt. Bei allen Isolaten zeigte das Core ein granuliertes Muster im Zytoplasma, das auf eine zytosolische Verteilung hinweist.

Das Reaktionsspektrum der mAks war unterschiedlich und manche mAks erkannten das Core einiger Stämme in infizierten Zellen nicht. Bis auf das Core-Protein von BVDV-1a Stamm C86 und BVDV-2a Stamm 890 erkannte der mAk GRS-C5 das Core aller getesteten Pestiviren. Mit den mAk GRS-C4 und -C5 gab es bei nicht infizierten Zellen einen schwachen Hintergrund. Allerdings war das spezifische Signal in infizierten Zellen wesentlich stärker. Mit dem mAk GRS-C6 konnte das Core-Protein verschiedener Pestiviren, außer dem von BVDV-1b Osloss nachgewiesen werden. Der mAk GRS-C8 detektierte das Core aller Pestiviren außer dem von BVDV-2b Giessen-4, BDV-1a BD31 und BDV-2 AZ79.

### 3.8 Kolokalisierungsstudien des Core-Proteins in infizierten Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie

Wenn man die mikroskopische Untersuchung an ganzen Zellen durchführt, wird das Fluoreszenzlicht von Molekülen emittiert, die sich unter- oder oberhalb der Brennebene befinden. Hier wird die Erkennung der tatsächlich vorliegenden dreidimensionalen Anordnung der Moleküle erschwert. Mit dem konfokalen Lasermikroskop wird dieses Problem umgangen, da bei der konfokalen Mikroskopie nur ein bestimmter Teil der Probe mit dem Anregungslicht eines fokussierten Laserstrahls belichtet wird, der rasch über die verschiedenen Punkte in einer Brennebene der Probe bewegt wird. Die von den einzelnen Punkten ausgehenden Signale werden registriert und so entsteht das zusammengesetzte Bild. Mit Hilfe dieser Technik kann man verschiedene Proteine in einer Zelle nachweisen und deren Lokalisierung bestimmen. Hierfür werden die Proteine durch Antikörper detektiert, die mit Farbstoffen markiert sind. Die Anregung dieser Farbstoffe erfolgt durch Licht verschiedener Wellenlänge. Auf diese Weise zeigen sich die Kolokalisierungsstellen als Bereiche mit einer veränderten Farbe, da sich die Fluoreszenz beider Farbstoffe überlagert. Ist eines der Proteine mit einem rot- und das andere mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff markiert, tritt eine Kolokalisierung als gelbes Areal in Erscheinung.

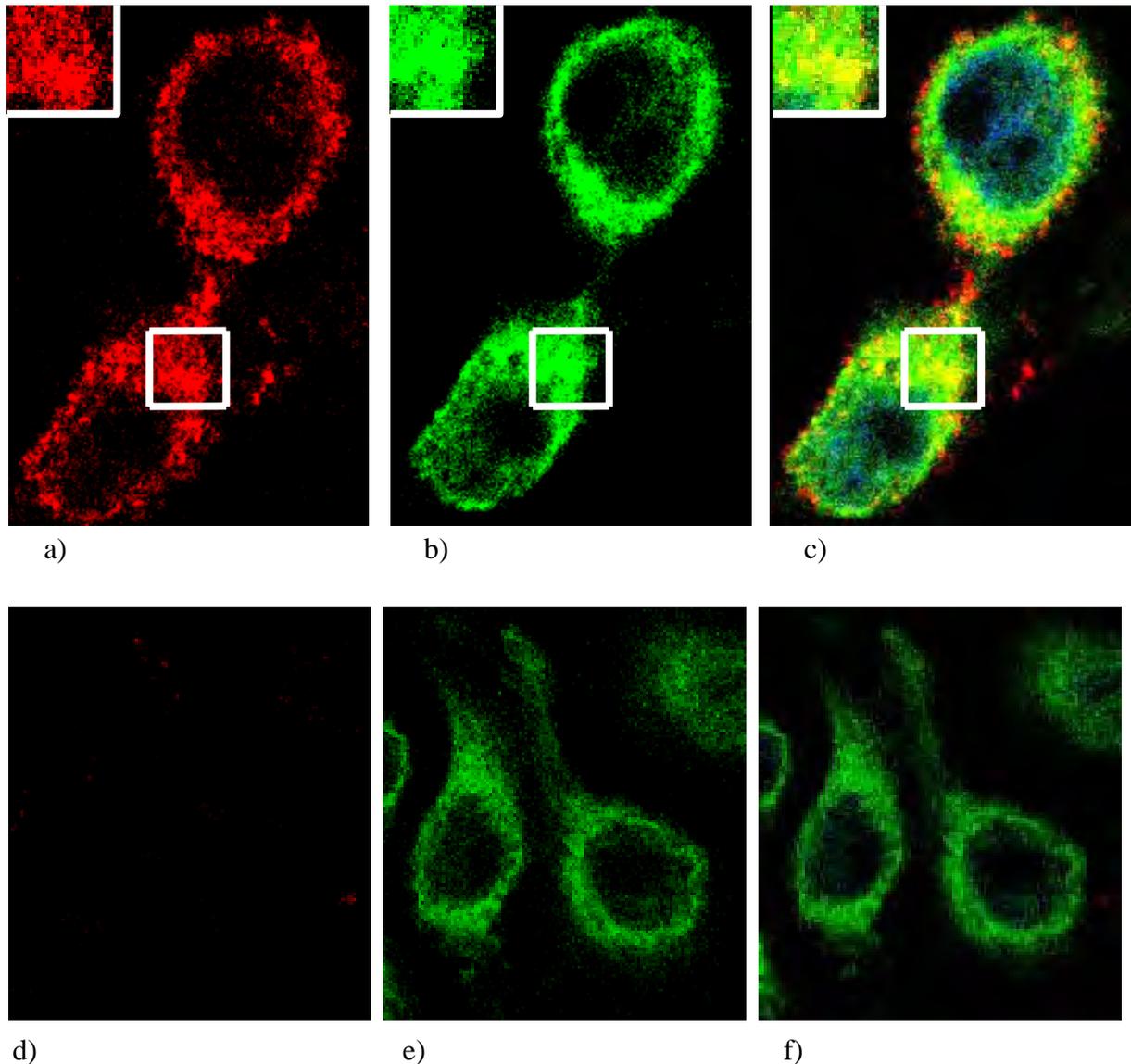
Die Kolokalisierung des Core-Proteins mit Markern verschiedener zellulärer Organellen und pestiviraler Proteine würde Hinweise darüber liefern, wie dieses Protein mit zellulären Strukturen einer infizierten Zelle wechselwirkt. Außerdem würde die intrazelluläre Lokalisierung des Core-Proteins auf den Ort des Virus „Assemblies“ hinweisen.

In dieser Arbeit wurden Kolokalisierungsuntersuchungen des Core-Proteins mit dem Endoplasmatischen Retikulum, den Mitochondrien, „*RNA-processing Bodies*“ („*P-Bodies*“), den „*lipid droplets*“ und den Nichtstrukturproteinen NS3 bzw. NS5B durchgeführt.

#### 3.8.1 Kolokalisierung vom KSPV Core-Protein mit dem ER Marker Protein-Disulfidisomerase (PDI)

Eine Kolokalisierung vom Core mit dem ER war zu erwarten, da sein C-Terminus als Signalpeptid für die Translokation von E<sup>ms</sup> dient (Heimann et al., 2006). Allerdings ist ungeklärt, ob das Core-Protein nach der Spaltung mit dem ER assoziiert bleibt. Bei der Kolokalisierung des Core-Proteins mit dem ER diente die Protein-Disulfidisomerase (PDI), welche im ER Lumen die Bildung von Disulfidbrücken katalysiert, als ER Marker (Ferrari und Söling 1999). SK-6 Zellen wurden mit dem KSPV infiziert und nach 24 Stunden fixiert und permeabilisiert. Die PDI wurde mit einem kommerziell erhältlichen polyklonalen

Kaninchen Serum nachgewiesen, während der Nachweis des Core- Proteins mit dem für KSPV spezifischen mAk GRS-C1 erfolgte. Die anti PDI Antikörper wurden mit einem FITC, der anti Core mAk mit einem Cy3 gekoppelten Antispezies mAk detektiert. Auf diese Weise wird das Core Protein rot und das PDI grün markiert. Zur Markierung der Zellkerne wurde DAPI (blau) verwendet. Die Grünfärbung des ER trat in typischer Weise perinukleär auf. Das rotgefärbte Core- Protein zeigte erneut das punktierte Muster, welches auch bereits zuvor bei den verschiedenen Isolaten festgestellt werden konnte (Abbildung 21).



**Abbildung 21.** Kolokalisierung des Core-Proteins mit dem ER.

SK-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>iii</sub> infiziert. Nach 24h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit verschiedenen Aks inkubiert und in konfokaler Laser Mikroskopie ausgewertet. a) Das Core-Protein wurde mit dem mAk GRS-C1 detektiert, der mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. b) Der ER Marker (PDI Protein) wurde mit einem polyklonalen anti PDI-Kaninchenserum detektiert und anschließend erfolgte die Markierung mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt.

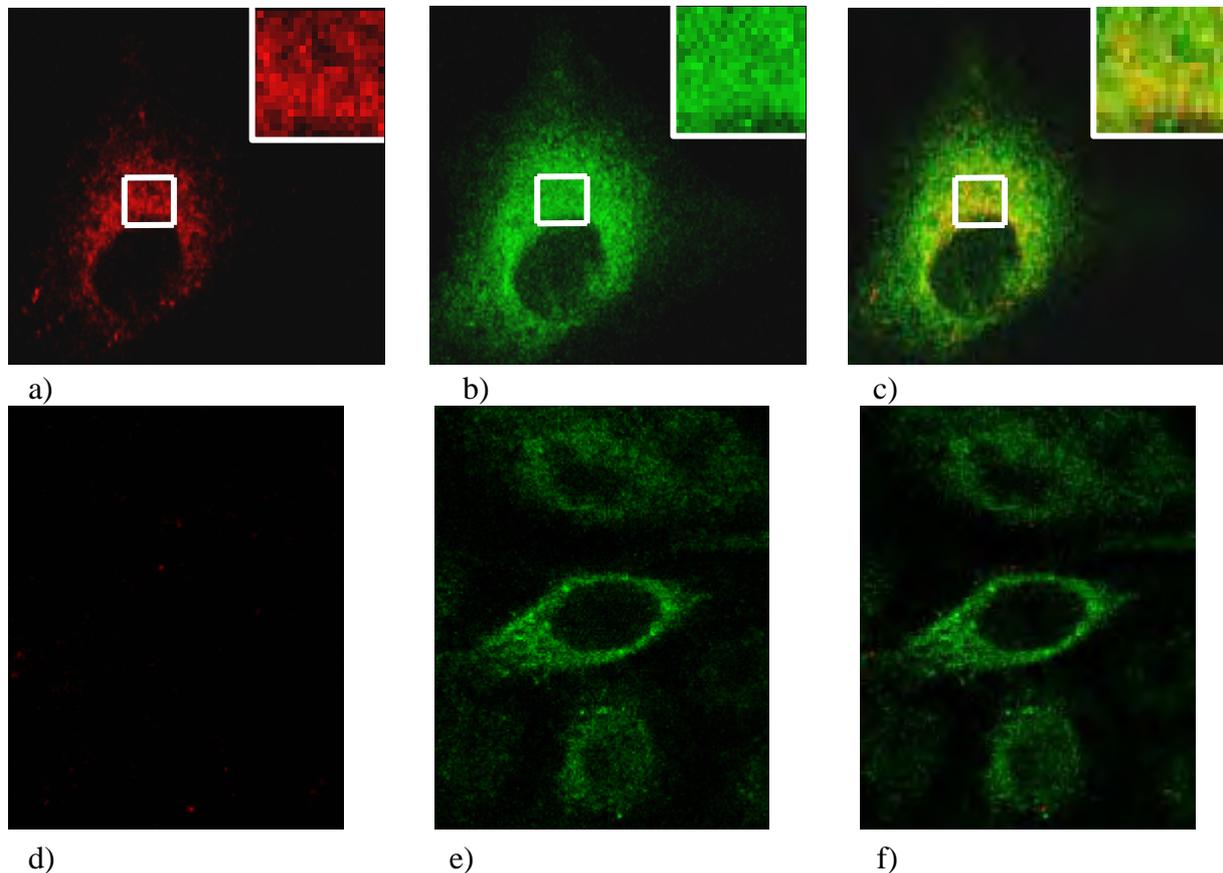
c) Nach Überlagerung ist nur ein kleiner Anteil des Core-Proteins in Assoziation mit dem ER zu sehen. Die Kolokalisierungsstellen sind gelb gefärbt. Ein Bereich, in dem die Kolokalisierung besonders deutlich ist, wurde vergrößert (Oben Links). In nicht infizierten SK-6 Zellen erfolgten die Markierungen vom Core-Protein (d) und von ER (e) wie bei den infizierten Zellen, und die resultierenden Bilder wurden überlagert (f).

Eine eindeutige Kolokalisierung des Core-Proteins mit dem ER ist als gelbes Signal zu erkennen. Allerdings findet man das Core-Protein nicht nur in Assoziation mit dem ER. Es sind auch Signale des Core-Proteins zu sehen, die nicht auf eine Kolokalisierung mit dem ER hinweisen. Daher ist davon auszugehen, dass ein Teil des Core-Proteins die Assoziation mit dem ER verliert.

### 3.8.1.1 Kolokalisierung der KSPV Strukturglykoproteine $E^{ms}$ , E1 und E2 mit PDI

Die Kolokalisierung der Strukturglykoproteine mit dem ER würde auf Kolokalisierung von diesen Proteinen mit dem Core hinweisen, dessen C-Terminus im ER bereits generiert wird.

Für dieses Experiment erfolgte die Infektion, Fixierung und Permeabilisierung von SK-6 Zellen wie für das Core-Protein beschrieben. Die PDI wurde mit dem Kaninchen Serum und die Glykoproteine mit den entsprechenden mAks detektiert. Zum Nachweis des  $E^{ms}$ , E1 und E2 wurde der murine mAk anti  $E^{ms}$  24/16 (Weiland et al., 1999), anti E1 GRS-E1 (Roman-Sosa, nicht publiziert) und anti E2  $\alpha$ 18 (Weiland et al., 1990) angewandt. Anschließend wurden die entsprechenden anti Spezies Antikörper zugegeben. Die PDI ist grün und die Glykoproteine sind rot gefärbt. Das  $E^{ms}$  kolokalisierte weitgehend mit der PDI (Abbildung 22). Es sind jedoch auch  $E^{ms}$  Signale erkennbar, die nicht mit dem ER assoziieren, denn es ist bekannt, dass das  $E^{ms}$  auch sezerniert wird.

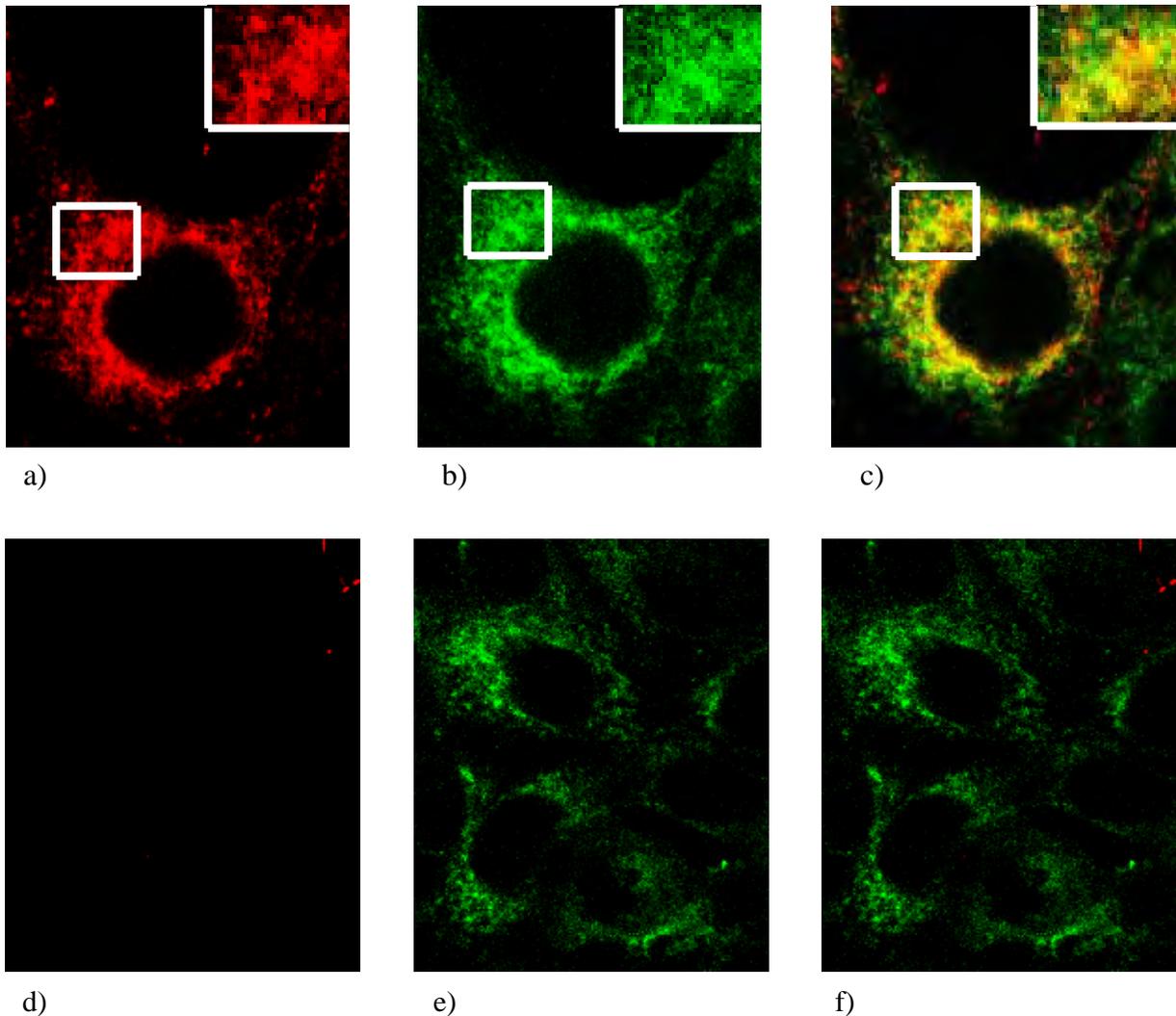


**Abbildung 22.** Kolokalisierung des Strukturproteins  $E^{ms}$  mit dem ER.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>iii</sub> in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit verschiedenen Aks inkubiert und mittels konfokaler Laser Mikroskopie untersucht. a) Das  $E^{ms}$  Protein wurde mit dem anti  $E^{ms}$  mAk 24/16 detektiert, der mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. b) Der ER Marker (PDI Protein) wurde mit einem polyklonalen anti PDI-Kaninchen Serum detektiert und anschließend erfolgte die Markierung mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper. Das ER ist in der Peripherie des Kerns zu sehen. c) Die Kolokalisierung des  $E^{ms}$  Proteins mit dem ER ist nach Überlagerung gelb bzw. orange angefärbt. In der

Vergrößerung einer Kolokalisierungsstelle (rechts oben) kann die Kolokalisierung detaillierter betrachtet werden. In nicht infizierten SK-6 Zellen wurden die Markierungen vom E<sup>ms</sup> (d) und von ER (e) wie bei den infizierten Zellen durchgeführt, und die resultierenden Bilder wurden überlagert (f)

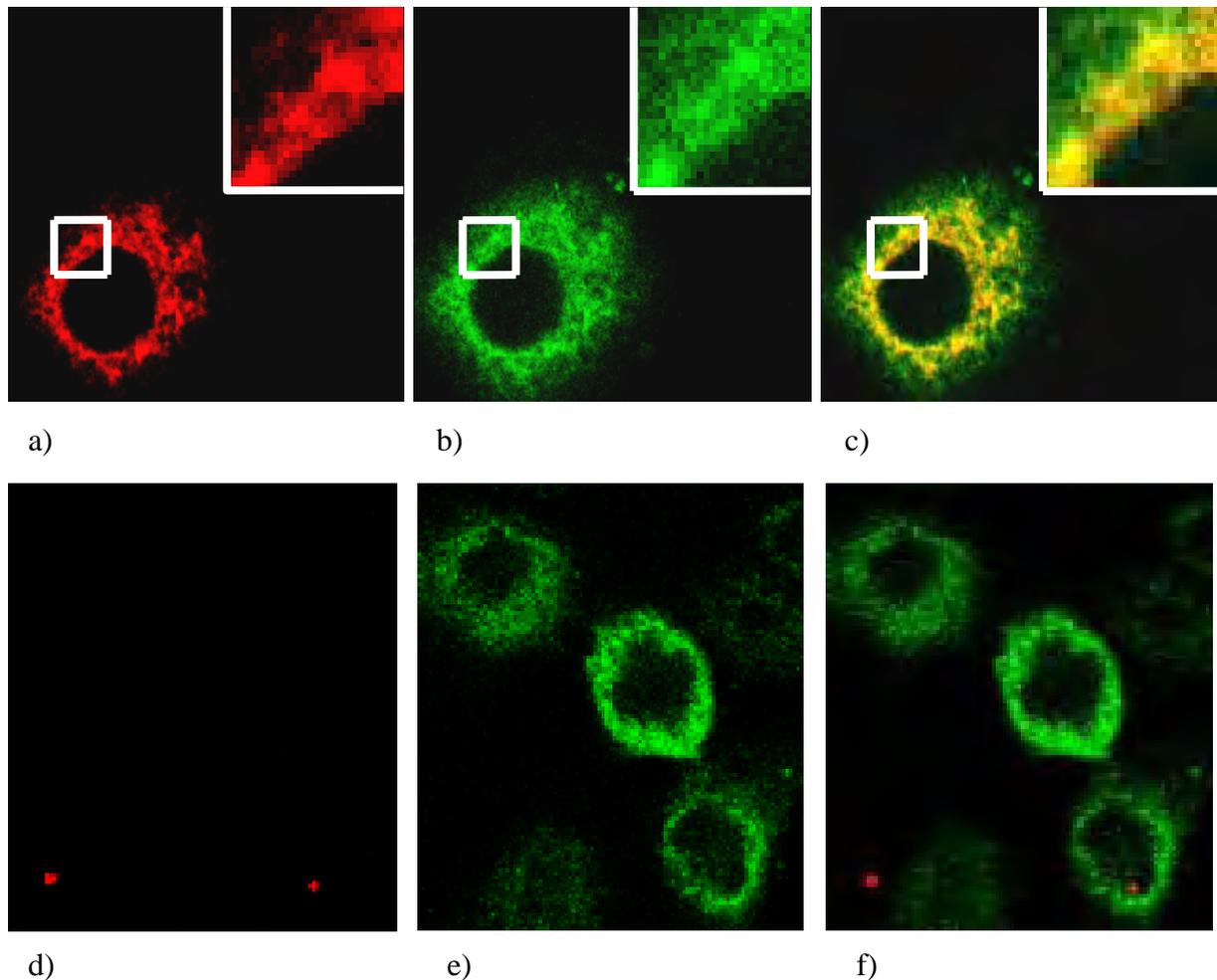
Das Strukturprotein E1 zeigt eine fast vollständige Kolokalisierung mit PDI (Abbildung 23).



**Abbildung 23.** Kolokalisierung des Strukturproteins E1 mit dem ER.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>ii</sub> in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit den entsprechenden Aks inkubiert und die Präparate mittels konfokaler Laser Mikroskopie untersucht. a) Das E1 Protein wurde mit dem mAk GRS-E1 detektiert (Roman-Sosa, nicht publiziert) der mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. b) Der ER Marker (PDI Protein) wurde mit einem polyklonalen Kaninchenserum und gebundene Antikörper mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Eine perinukleare Verteilung des ERs wurde beobachtet. c) Eine Kolokalisierung des E1 Proteins mit dem ER ist deutlich zu sehen. Sie stellt sich nach Überlagerung gelb dar. Eine Kolokalisierungsstelle wurde vergrößert (rechts oben), was eine detailliertere Darstellung ermöglicht.

Das Fluoreszenzmuster des Glykoproteins E2 ähnelte dem des E1 Proteins (Abbildung 24). Wie bei anderen Untersuchungen wurde das E2 fast nur in Assoziation mit dem ER nachgewiesen. Die für diese Lokalisierung verantwortliche Sequenz liegt im Membrananker des Proteins (Köhl et al., 2004).



**Abbildung 24.** Kolokalisierung des Strukturproteins E2 mit dem ER.

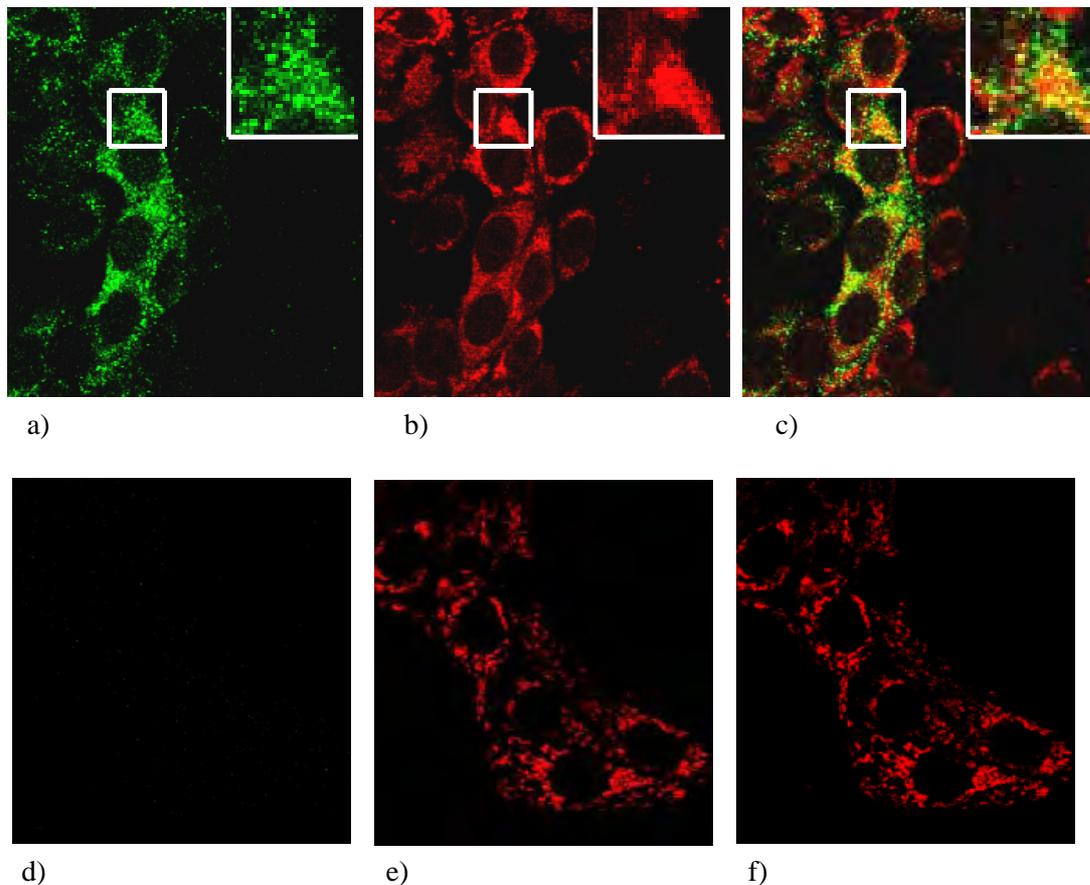
Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>ti</sub> in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit verschiedenen Aks inkubiert und die Präparate mittels Laser konfokaler Mikroskopie beurteilt. a) Das E2 Protein wurde mit dem anti E2 mAk a18 detektiert, der mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. b) Der ER Marker (PDI Protein) wurde mit einem polyklonalen Kaninchenserum detektiert, und anschließend erfolgte die Markierung mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Das ER wurde in der Peripherie des Kerns beobachtet. c) Das E2 Protein kolokalisiert ganz deutlich mit dem ER, was nach Überlagerung gelb dargestellt wird. In der Vergrößerung einer Kolokalisierungsstelle (rechts oben) kann die Kolokalisierung detaillierter betrachtet werden. In nicht infizierten SK-6 Zellen erfolgten die Markierungen vom E2 (d) und von ER (e) wie bei den infizierten Zellen, und die resultierenden Bilder wurden überlagert (f).

### 3.8.2 Kolokalisierung vom KSPV Core-Protein mit Mitochondrien

Eine Kolokalisierung mit den Mitochondrien wurde für das HCV Core-Protein beschrieben, was auf eine hydrophobe Sequenz im Protein zurückgeführt wurde (Schwer et al., 2004). Die Studien der Prozessierung des C-Terminus vom pestiviralen Core-Protein deuteten darauf hin, dass dieses Protein nicht vom zellulären Proteasom degradiert wird (Rümenapf, nicht publiziert). Eine Alternative wäre, dass der Abbau von Core-Protein Molekülen durch mitochondriale Proteasen erfolgt, wie es für nicht korrekt gefaltene Proteine beschrieben wurde (Wagner et al., 1994). Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob das pestivirale Core-Protein mit den Mitochondrien kolokalisiert.

Die Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Mitochondrien wurde in infizierten Sk-6 Zellen durchgeführt. Die Mitochondrien wurden in infizierten Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff MitoTracker rot angefärbt, bevor sie fixiert wurden. Danach erfolgte die Detektion des Core-Proteins mit dem anti Core mAk GRS-C1, der mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde.

Ein Teil des Core-Proteins kolokalisiert mit den Mitochondrien, was an manchen Stellen eindeutig erkennbar ist (Abbildung 25).



**Abbildung 25.** Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Mitochondrien.

Sk-6 Zellen wurden mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>ti</sub> für 24h infiziert. Vor der Fixierung bzw. Permeabilisierung erfolgte die Färbung der Mitochondrien mit MitoTracker.

a) Das Core-Protein wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem anti Core mAk GRS-C1 und einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. b) Die Mitochondrien wurden mit dem Marker MitoTracker rot angefärbt. c) Nach der Überlagerung der Fluoreszenzbilder sind Kolokalisierungsstellen erkennbar. In nicht infizierten SK-6 Zellen wurden die Mitochondrien angefärbt (e) und erfolgte die Markierungen vom Core-Protein (d). Die resultierenden Bilder wurden überlagert (f)

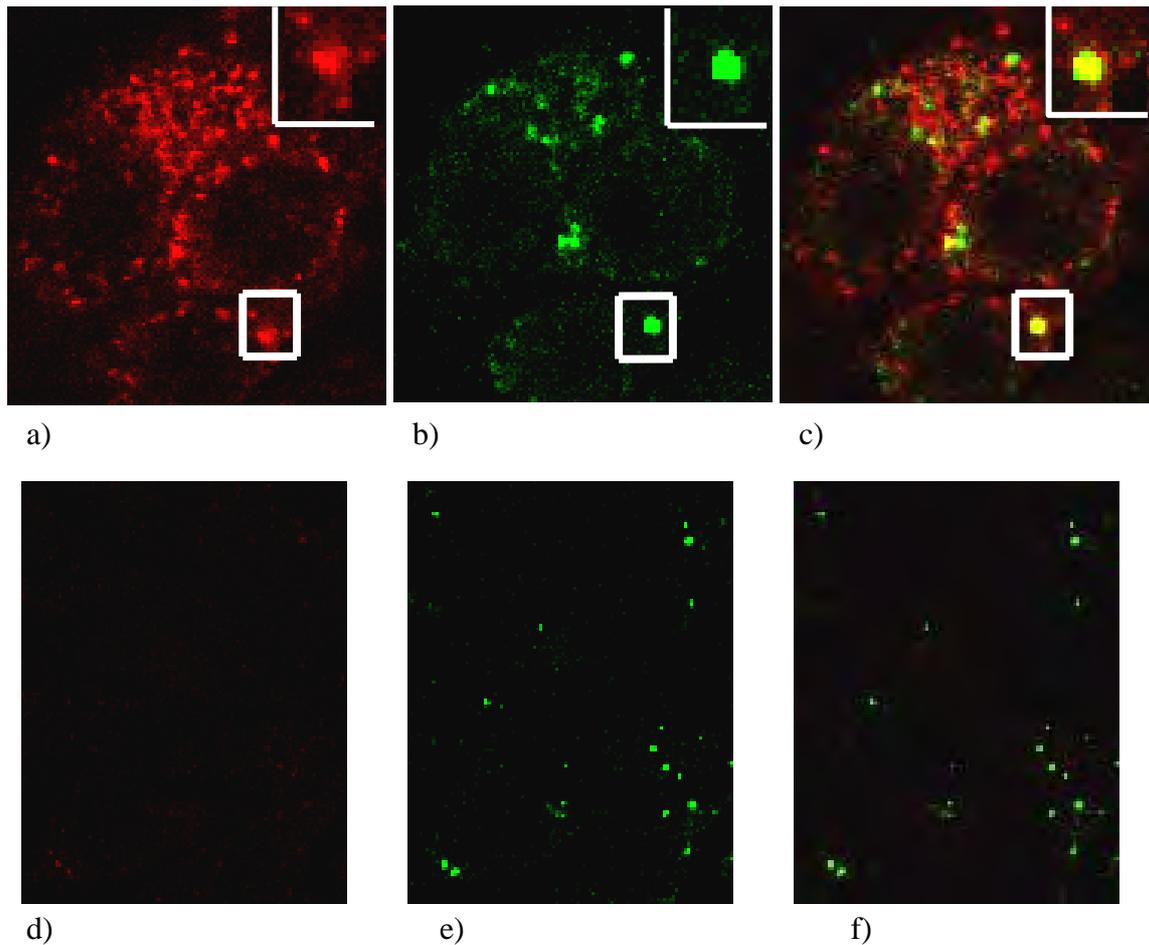
### 3.8.3 Kolokalisierung des Core-Proteins mit „RNA processing bodies (P-Bodies)“

Bei den s.g. „P-Bodies“ handelt es sich um zytosolische Strukturen, in denen mRNAs degradiert oder gelagert werden (Sheth und Parker 2003; Marx 2005). Die Kolokalisierung des Core-Proteins mit den „P-Bodies“ wurde untersucht, weil die granuläre Verteilung der „P-Bodies“ auffallend der des Core-Proteins ähnelte. Die punktförmige Morphologie der „P-Bodies“ ähnelt dem Fluoreszenzmuster des Core-Proteins. Außerdem könnte das Core aufgrund seiner RNS bindenden Aktivität mit der RNS interagieren, die sich in den „P-Bodies“ befindet.

Für die Kolokalisierung des Core-Proteins mit den „P-Bodies“ wurden diese mit einem humanen Serum detektiert, welches einen zentralen Bestandteil der „P-Bodies“, nämlich das Protein Ge-1, erkennt (Yu et al., 2005). Dieses Serum kreuzreagierte mit dem Ge-1 Protein von Rinder- und Schweinezellen, in denen sich die Pestiviren vermehren.

SK-6 Zellen wurden mit KSPV infiziert und nach 24 Stunden fixiert bzw. permeabilisiert. Dann erfolgte der Nachweis des Cores mit dem anti Core mAk und einem Cy3 gekoppelten Konjugat, während die „P-Bodies“ mit dem Serum und einem FITC gekoppelten anti Human Antikörper detektiert wurden. Auf diese Weise konnten das Core-Protein als rot fluoreszierende und die „P-Bodies“ als grün fluoreszierende Strukturen sichtbar gemacht werden.

Die Anzahl an „P-Bodies“ pro Bildschicht variierte zwischen fünf und zehn und ihre Morphologie entsprach der für Humanzellen beschriebenen. Das Core-Protein kolokalisierte teilweise mit „P-Bodies“, was als gelbe Fluoreszenz im Zytoplasma erkennbar war (Abbildung 26).



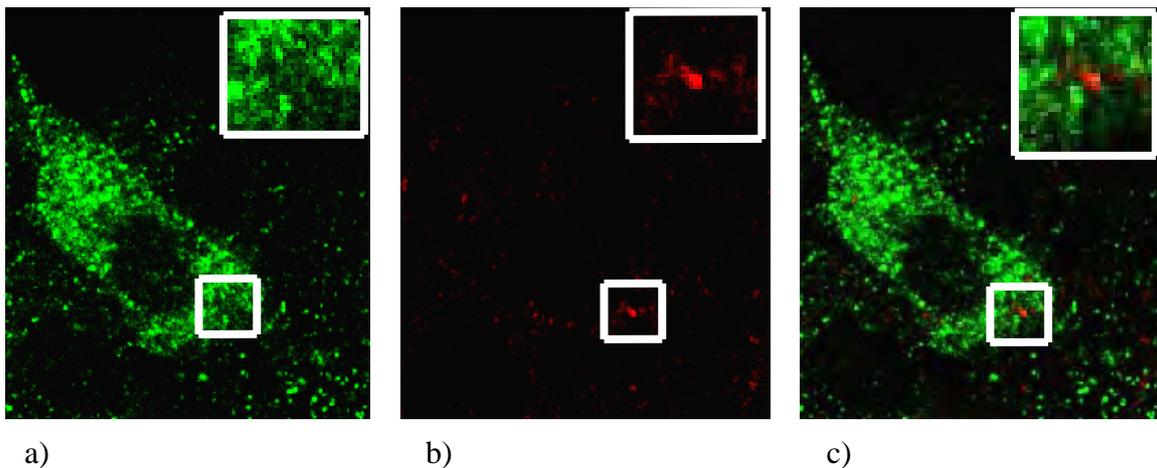
**Abbildung 26.** Kolokalisierung des Core-Proteins mit „*P-Bodies*“.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und die Präparate mittels konfokaler Laser Mikroskopie untersucht. a) Das Core-Protein wurde mit dem mAk GRS-C1 detektiert, der mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. b) Der Marker für die „*P-Bodies*“ (Ge-1 Protein) wurde mit einem Humanserum detektiert, die gebundenen Aks wurden danach mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die typisch punktförmige Verteilung der „*P-Bodies*“ ist zu erkennen. c) Nach Überlagerung sind die gelben Kolokalisierungsstellen erkennbar. In nicht infizierten SK-6 Zellen erfolgten die Markierungen des Core-Proteins (d) und der „*P-Bodies*“ (e), wie bei den infizierten Zellen. Die resultierenden Bilder wurden überlagert (f).

#### 3.8.4 Kolokalisierung des KSPV Core-Proteins mit „*lipid droplets*“ (LD)

Die Genomorganisation und der Art der Prozessierung des Polyproteins ist bei Pestiviren und dem Hepatitis C Virus (HCV) ähnlich. Auch der C-Terminus des reifen Core-Proteins beider Genera wird durch das gleiche Enzym, die Signal Peptid Peptidase, generiert (McLauchlan et al., 2000; Heimann et al., 2006). Da nach der Spaltung das HCV Core-Protein ausschließlich mit den sog. „*lipid droplets*“ (LDs) kolokalisiert (Hope und McLauchlan 2000; Rouillé et al., 2006), wird auch auf eine Kolokalisierung des pestiviralen Core-Proteins mit LDs untersucht.

LDs sind Speicher Organellen für Triacylglycerole und Cholesterol (Londos et al., 1999). Durch den Fluoreszenzfarbstoff „Red Oil O“ lassen sich diese Strukturen spezifisch anfärben. Der PFA-Fixierung von KSPV in infizierten SK-6 Zellen folgte der Core-Protein Nachweis mit mAk GRS-C1 und einem FITC konjugierten, sekundären Antikörper. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit 6%igem „Red Oil O“. Die Untersuchung der auf diese Weise markierten Zellen ergab zunächst, dass LDs in SK-6 Zellen nur in geringer Menge vorkommen. Eine Kolokalisierung von LDs (rot) und Core (grün) war in keinem Fall erkennbar (Abbildung 27).



**Abbildung 27.** Kolokalisierung des Core-Proteins mit „lipid droplets“.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>iii</sub> in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und nach der Markierung des Cores bzw. der LDs mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. a) Das Core Protein wurde mit dem mAk GRS-C1 detektiert, der mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. b) Die „lipid droplets“ wurden mit „Red Oil O“ angefärbt. c) Nach Überlagerung wurde keine Kolokalisierung des Core-Proteins mit „lipid droplets“ festgestellt.

### 3.8.5 Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Bestandteilen des Replikationskomplexes NS3 und NS5B

Die Kolokalisierung des Cores mit den Bestandteilen des Replikationskomplexes würde darauf hinweisen, dass Replikation und „Assembly“ bei Pestiviren nicht räumlich getrennt stattfinden. Als Marker des pestiviralen Replikationskomplexes wurden die Proteine NS3 bzw. NS5B ausgewählt. Das NS3 Protein unterstützt die virale Replikation durch seine Helikase Aktivität (Warrener und Collett 1995) und katalysiert zugleich die proteolytische Spaltung der anderen Nichtstrukturproteine, die den Replikationskomplex bilden, wobei das NS4A als Kofaktor benötigt wird (Xu et al., 1997; Tautz et al., 2000). Allerdings ist es nicht bekannt, ob das NS3 Protein nur in Assoziation mit der RNS-abhängigen RNS-Polymerase

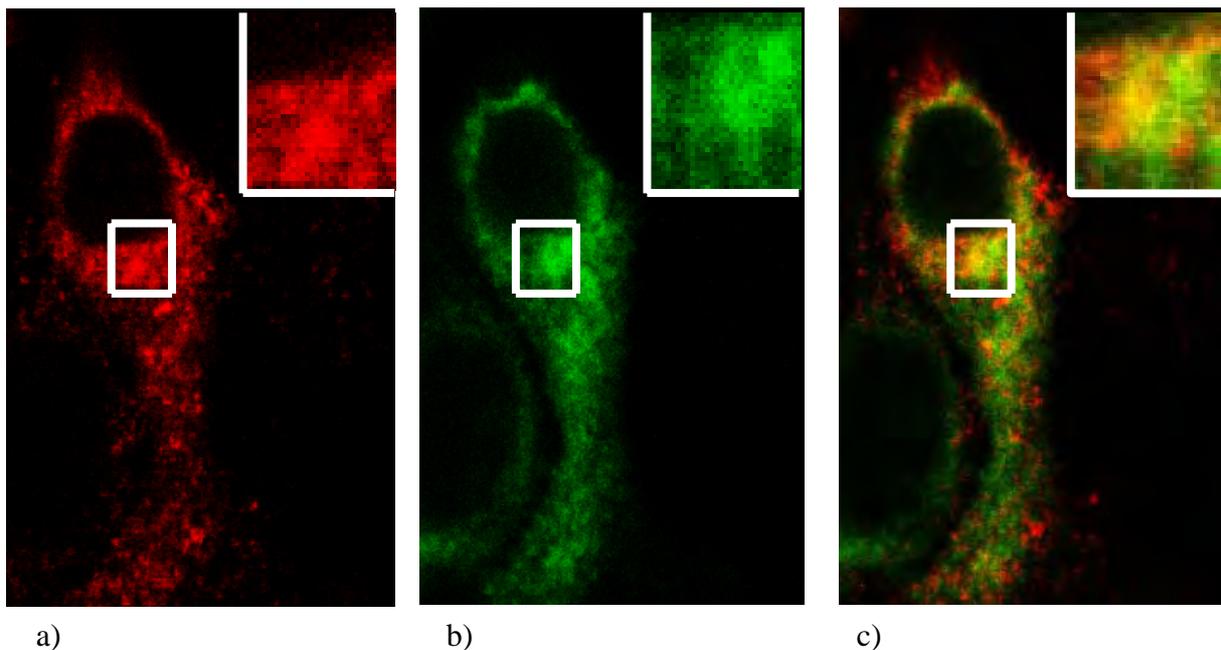
NS5B gefunden werden kann, das ausschließlich in Replikationskomplexen lokalisiert werden soll (Zhong et al., 1998).

### 3.8.5.1 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS3

Die Kolokalisierung des Cores mit dem Nichtstrukturprotein NS3 erfolgte in KSPV infizierten Sk-6 Zellen, die wie bei den zuvor beschriebenen Kolokalisierungsstudien behandelt wurden.

Der Nachweis des Cores wurde erst mit dem anti Core mAk GRS-C1 durchgeführt, der mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper detektiert wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem anti NS3 mAk Code 4 (Corapi et al., 1990), der mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (Alexa 488) direkt markiert wurde.

Das Core-Protein, rot gefärbt, ist im Zytoplasma verteilt und kolokalisiert teilweise mit dem NS3 (Abbildung 28). Da das Core jedoch nur an wenigen Stellen kolokalisiert, ist davon auszugehen, dass der größte Teil nicht mit dem NS3 assoziiert.



**Abbildung 28.** Kolokalisierung des Core Proteins mit dem NS3 Protein.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>ti</sub> in Suspension infiziert. Die Fixierung bzw. Permeabilisierung der Zellen fand nach 24 Stunden statt und die Präparate wurden durch konfokale Laser Mikroskopie analysiert. a) Das Core-Protein wurde mit dem mAk GRS-C1 detektiert, der mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. b) Das NS3 Protein wurde mit dem anti NS3 mAk Code 4 detektiert, der mit Alexa 488 direkt gekoppelt wurde. c) Nach Überlagerung kann eine Kolokalisierung des Core-Proteins mit dem NS3 als gelbes Signal erkannt werden.

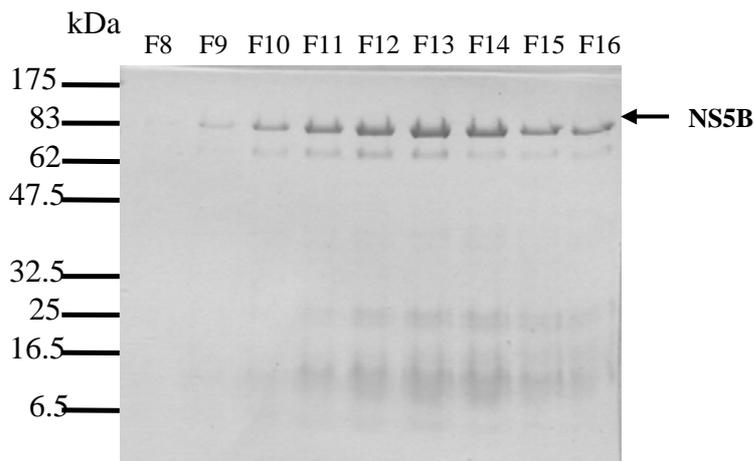
Da es nicht bekannt ist, ob NS3 nur in Assoziation mit dem Replikationskomplex zu finden ist, wurden zusätzliche Kolokalisierungsstudien des Core-Proteins mit der viralen RNS-

abhängigen RNS Polymerase NS5B durchgeführt. Da wir über keine Immunreagenzien verfügten, mit denen NS5B nachgewiesen werden konnte, wurde die Herstellung von mAks gegen dieses Protein angestrebt.

### 3.8.5.2 Herstellung von mAk gegen das NS5B Protein von KSPV

#### 3.8.5.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung des KSPV Alfort<sub>iii</sub> NS5B Proteins (RNS abhängige RNS Polymerase)

Die cDNS der RNS-abhängigen RNS Polymerase, Serin 3181 bis Valin 3998, des KSPV Stammes Alfort<sub>iii</sub> wurde in einen prokaryotischen Expressionsvektor (pET11a) kloniert und mit einem N-terminalen Hepta-His „Tag“ versehen (p1141). Das Expressionsprodukt war löslich und ließ sich in gleicher Weise, wie das Core-Protein, durch *IMAC* effektiv aufreinigen. Nach zweistufiger *IMAC* und Vereinigung der homogensten Fraktionen, 10 bis 16 (Abbildung 29), lag eine Gesamtmenge von 210µg NS5B Protein vor.



**Abbildung 29.** Coomassie Färbung einer *IMAC* Reinigung des KSPV NS5B Proteins.

Mit dem Plasmid p1141 wurden *E.coli* Bakterien transformiert und das Protein in großem Maßstab unter Induktion mit 1mM IPTG exprimiert. Die lösliche Fraktion wurde aus dem bakteriellen Lysat gewonnen, die Reinigung erfolgte über eine Nickel Säule, wobei das Protein mittels eines Imidazol Gradienten eluiert wurde. Die homogenen Fraktionen wurden vereinigt und erneut durch Ni<sup>++</sup> *IMAC* aufgereinigt. Die Fraktionen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE und Coomassie Blau Färbung analysiert und die Fraktionen 10 bis 16 vereinigt.

#### 3.8.5.2.2 Immunisierung von Mäusen und Fusion von Lymphozyten mit Myelomzellen

Drei Balb/c Mäuse wurden je mit 10µg gereinigtem NS5B am Tag 1, 14, 28 und 50 immunisiert. 15 Tagen später wurden die Seren im Western Blot getestet und die Milzzellen der Maus mit der stärksten serologischen Reaktion, mit Sp2/0 Zellen fusioniert. Für die Herstellung der NS5B mAks wurden zwei Fusionen durchgeführt.

### 3.8.5.2.3 „Screening“, Isolierung und Klonierung positiver Hybridome

In ähnlicher Weise wie zuvor wurde das „Screening“ mit NS5B beschichteten „TSP“-Platten durchgeführt. Insgesamt gelang die Isolierung von den 6 Hybridomen GRS-Pol-1, -Pol-2, -Pol-3, -Pol-4, -Pol-5 und -Pol-6, die Antikörper gegen das NS5B Protein produzieren. Diese Hybridome wurden, wie für die anti Core-Protein mAks beschrieben, kloniert.

### 3.8.5.2.5 Charakterisierung der gegen das NS5B hergestellten monoklonalen Antikörper GRS-Pol-1, -2, -3, -4, -5 und -6

#### 3.8.5.2.5.1 Bestimmung des Subtyps der anti NS5B mAks

Die von den Hybridomen, gegen das Protein NS5B, gebildeten mAks sind alle vom Subtyp IgG1 (Tabelle 5).

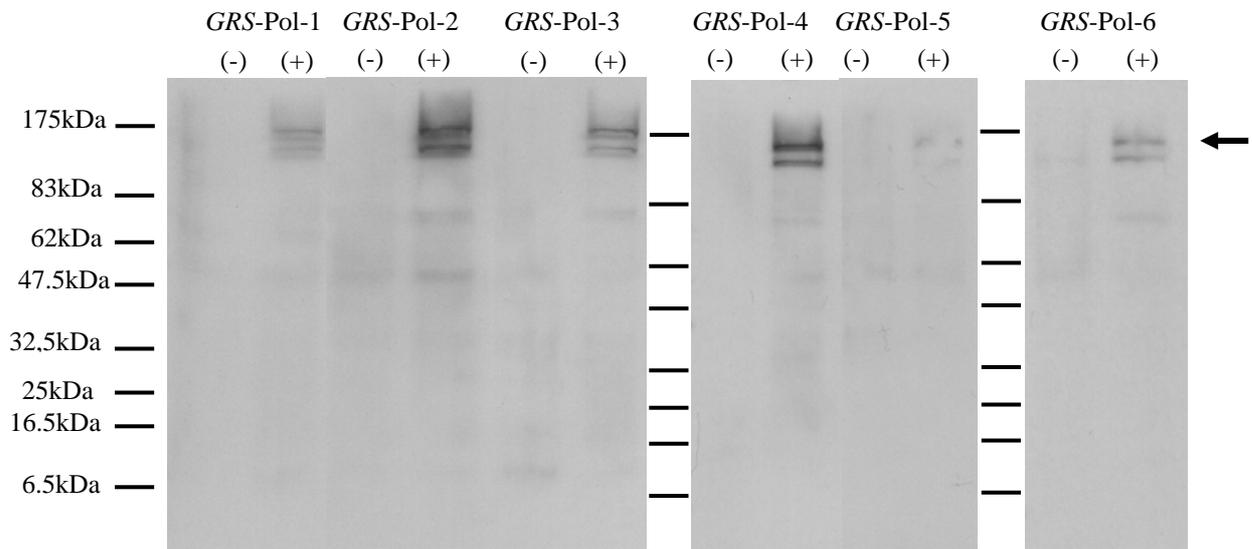
Name mAk	Ig Isotyp/Subtyp
GRS-Pol-1	IgG1 $\kappa^*$
GRS-Pol-2	IgG1 $\kappa$
GRS-Pol-3	IgG1 $\kappa$
GRS-Pol-4	IgG1 $\kappa$
GRS-Pol-5	IgG1 $\kappa$
GRS-Pol-6	IgG1 $\kappa$

\*kappa leichte Kette

**Tabelle 5.** Immunglobulin Isotypen der, gegen das KSPV NS5B Protein, hergestellten mAk.

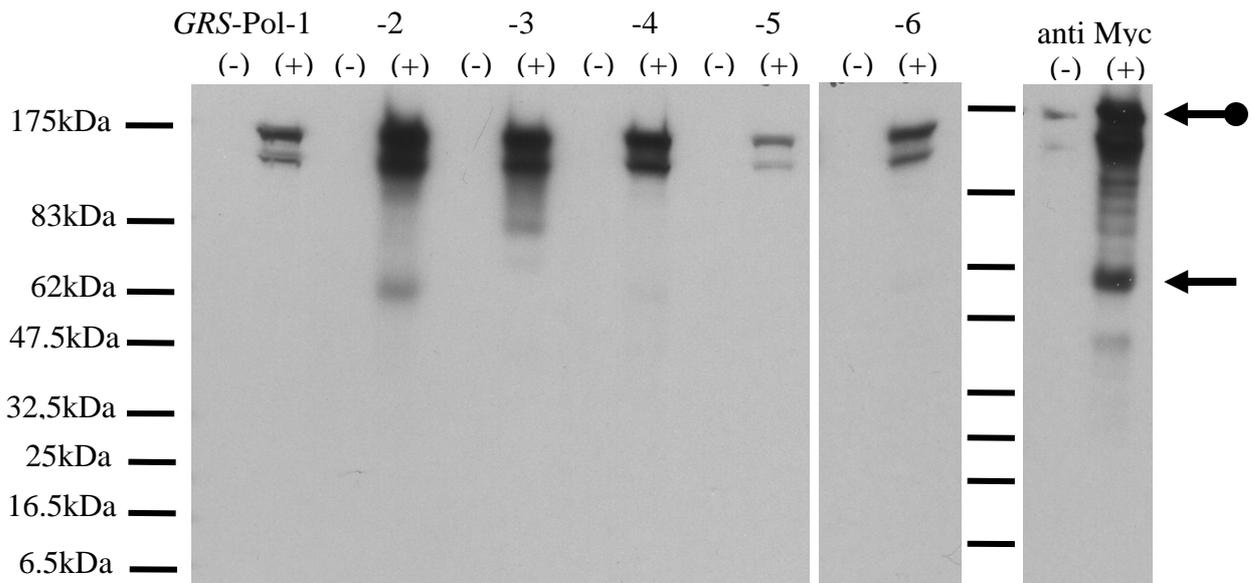
#### 3.8.5.2.5.2 Western Blot Analyse der Hybridom-Überstände mit Zelllysaten von KSPV infizierten und BVDV NS5A-B transient exprimierenden Zellen

Zur Charakterisierung der hergestellten mAks gehörte die Untersuchung, ob sie ein Protein entsprechend dem Molekulargewicht vom NS5B (80kDa) in infizierten Zellen erkennen. Der Überstand jedes Hybridoms wurde mit Lysat infizierter bzw. nicht infizierter SK-6 Zellen im Western Blot getestet. Alle mAks erkannten im Lysat infizierter Zellen ein ca. 170kDa großes Protein. Aufgrund seines Molekulargewichts könnte es sich bei diesem Protein um ein nicht gespaltenes NS5A-B Vorläuferprodukt handeln (Abbildung 30).



**Abbildung 30.** Western blot Analyse der KSPV infizierten Zellen mit den anti NS5B mAks. Sk-6 Zellen wurden mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>ti</sub> infiziert. Lysate infizierter (+) und nicht infizierter (-) Zellen wurden nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit Überstand der mAks GRS-Pol-1, -2, -3, -4, -5 und -6 inkubiert und die gebundenen Antikörper durch einen anti Maus Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemieluminiszenz visualisiert. Von allen mAks wurde ein Protein von ungefähr 175kDa in infizierten Zellen erkannt (mit Pfeil gekennzeichnet). (-)- Lysat nicht infizierter Zellen; (+)- Lysat infizierter Zellen.

Um das zu verifizieren, wurden die mAks mit Lysaten von BHK-21 Zellen, die das ncp7 NS5A-B mit einem C-terminalen Myc „Tag“ transient exprimierten, im Western Blot getestet. Dieses Experiment wurde mit diesem Konstrukt durchgeführt, da einerseits die mAks in vorläufigen Versuchen mit dem BVDV NS5B kreuzreagierten und andererseits das Konstrukt bereits zur Verfügung stand. Alle mAks erkannten das exprimierte NS5A-B, welches dem Molekulargewicht des Proteins entspricht, das in infizierten Zellen erkannt wurde. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei beiden Produkten um den NS5A-B Vorläufer handelt (Abbildung 31).



**Abbildung 31.** Nachweis des BVDV NS5B Proteins in Lysaten transfizierter BHK-21 Zellen, mit anti NS5B mAks im Western Blot.

BHK-21 Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, welches das NS5A-5B Protein von BVDV ncp7 unter Kontrolle des T7 RNS-Polymerase Promotors exprimiert.

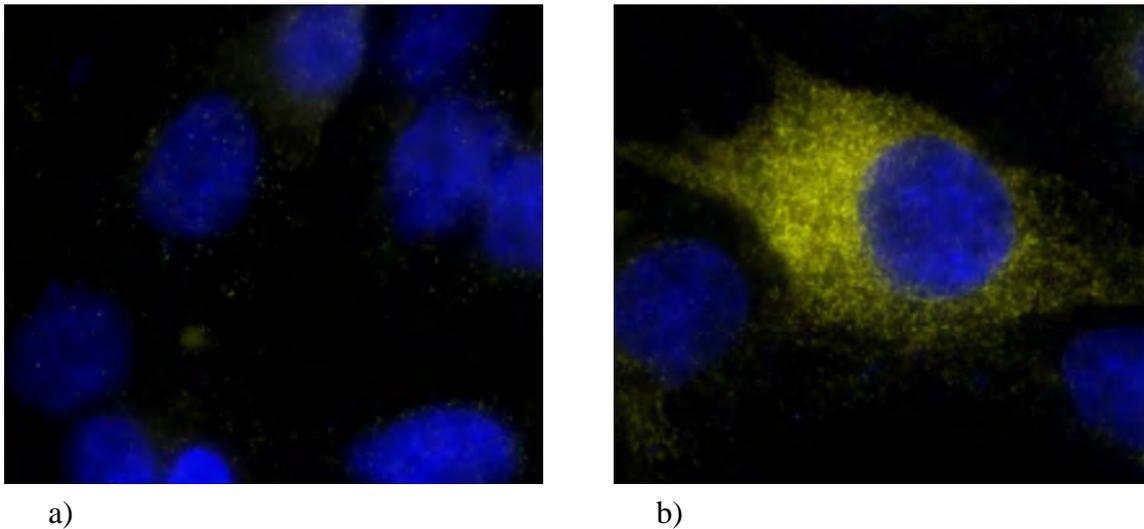
Nachdem Lysate von nicht transfizierten (-) und transfizierten (+) BHK-21 Zellen nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wurden, erfolgte die Inkubation mit Überstand der Hybridome GRS-Pol-1, -2, -3, -4, -5 und -6. Als Positivkontrolle diente der anti Myc mAk, dessen Epitop am C-Terminus des NS5B-Proteins in diesem Konstrukt vorhanden ist. Nach Inkubation mit dem anti Maus Peroxidase-gekoppelten anti Spezies Antikörper und Zugabe des Chemiluminiszenzsubstrats ist das NS5A-B, in der Größe von ungefähr 175kDa detektiert worden. Ein zusätzliches Protein von 62kDa wurde von den mAks GRS-Pol-2 und anti Myc erkannt.

←● NS5A-B

← 62kDa Produkt

### 3.8.5.2.5.3 Detektion des NS5B Proteins KSPV infizierter Zellen in indirekter Immunfluoreszenz

Die Reaktivität der hergestellten mAks wurde in indirekter Immunfluoreszenz mit SK-6 infizierten Zellen getestet. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert bzw. permeabilisiert und es erfolgte der Nachweis von NS5B mit Hybridom Überstand und einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Kerne wurden anschließend mit DAPI blau gefärbt. Von den sechs mAks erkannte nur der mAk GRS-Pol-3 das NS5B in infizierten Zellen, was als zytoplasmatische Fluoreszenz erkennbar ist (Abbildung 32).

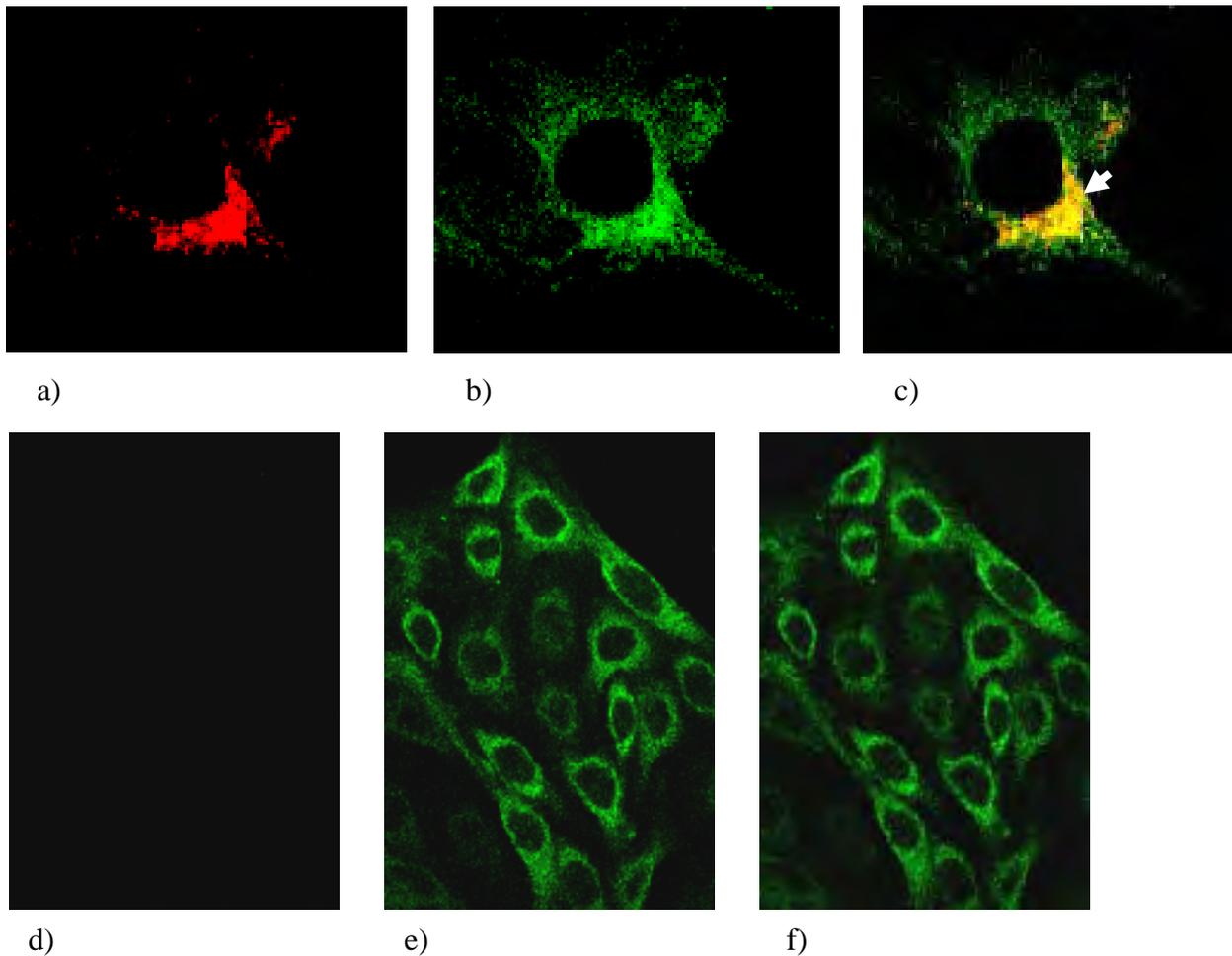


**Abbildung 32.** Nachweis des NS5B Proteins in infizierten Zellen.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>iii</sub> infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Hybridom-Überstand des mAk GRS-Pol-3 wurde als Primärantikörper in indirekter Immunfluoreszenz sowohl mit nicht infizierten Zellen (a) als auch mit infizierten (b) eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper detektiert und Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Untersuchung der Präparate erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Fluoreszenz des markierten NS5B Proteins ist bei infizierten Zellen gelb zu sehen, während die mit DAPI gefärbten Kerne blau zu erkennen sind.

### 3.8.5.3 Kolokalisierung des NS5B Proteins mit dem ER

Die Kolokalisierung des NS5B Proteins mit dem ER könnte darauf hinweisen, dass die virale Replikase mit den Strukturproteinen kolokalisiert. In infizierten Sk-6 Zellen wurde das NS5B mit dem mAk GRS-Pol-3 und einem Cy3 gekoppelten anti Maus Antikörper detektiert (rot), während die PDI (ER Marker), wie bereits beschrieben, nachgewiesen wurde (grün). Die starke zytoplasmatische Gelbfärbung deutet auf eine Lokalisierung des NS5B Proteins im ER hin. Es ist offensichtlich, dass dieses Protein in der infizierten Zelle fast nur am ER zu finden ist (Abbildung 33).



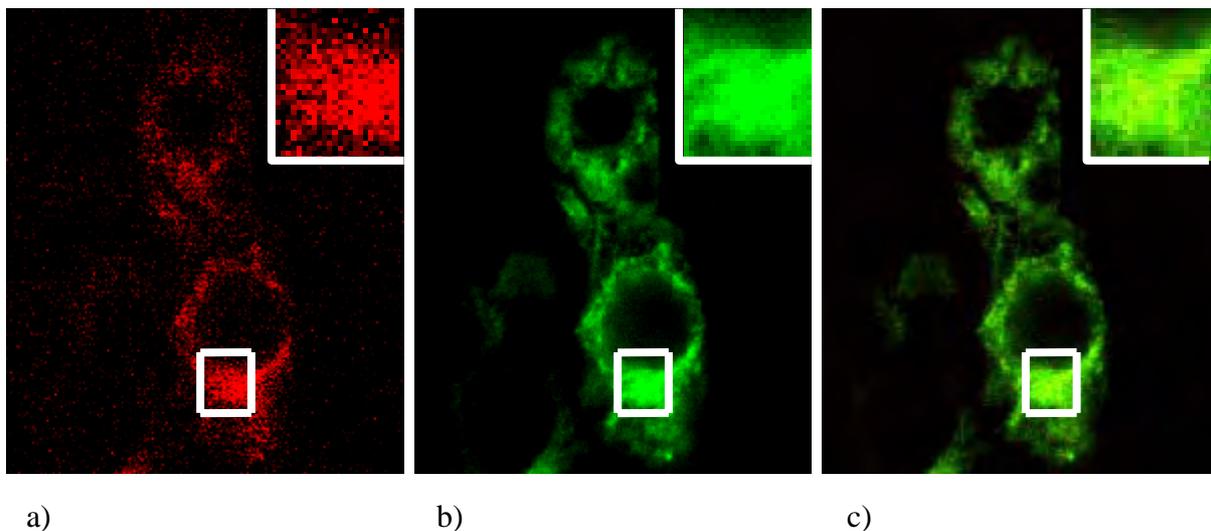
**Abbildung 33.** Kolokalisierung des NS5B Proteins mit dem ER.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>ti</sub> in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und die Präparate mittels konfokaler Laser Mikroskopie untersucht. a) Das NS5B Protein wurde mit dem mAk GRS-Pol-3 und einem Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. b) Der ER Marker (PDI Protein) wurde mit einem anti PDI-Kaninchenserum detektiert und anschließend mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Eine Ansammlung des ERs wurde in der Peripherie des Kerns beobachtet. c) Eine Kolokalisierung des NS5B Proteins mit dem ER ist deutlich zu sehen, die sich nach Überlagerung gelb darstellt. Der weiße Pfeil zeigt auf einen Bereich, in dem die Kolokalisierung deutlich erkennbar ist. In nicht infizierten Sk-6 Zellen erfolgten die Markierungen des Proteins NS5B (d) und des ERs (e), wie bei den infizierten Zellen. Die resultierenden Bilder wurden überlagert (f).

Da es sich dabei wahrscheinlich um den NS5A-B Vorläufer handelt, sind weitere Untersuchungen nötig, in denen die subzelluläre Lokalisierung eines allein exprimierten NS5B Proteins bestimmt wird.

#### 3.8.5.4 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS5B

Zuerst erfolgte die NS5B Markierung mit dem anti NS5B mAk GRS-Pol-3, der anschließend mit einem FITC gekoppelten Konjugat nachgewiesen wurde. Anschließend wurde der anti Core mAk GRS-C1 direkt mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Alexa647 markiert. In diesen Präparaten stellt sich das Core-Protein rot und das NS5B grün dar. In geringem Umfang konnte eine punktförmige Kolokalisierung des Core-Proteins mit dem NS5B festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Fraktion des Core-Proteins im gleichen subzellulären Kompartiment zu finden ist, in dem sich auch der Replikationskomplex befindet (Abbildung 34).



**Abbildung 34.** Kolokalisierung des Core Proteins mit dem NS5B Protein.

Sk-6 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit dem KSPV Stamm Alfort<sub>ti</sub> in Suspension infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert mit den entsprechenden Aks inkubiert und anschließend mittels konfokaler Laser Mikroskopie untersucht.

a) Zuerst wurde das NS5B Protein mit dem mAk GRS-Pol-3 und einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. b) Anschließend wurde das Core-Protein mit dem mAk GRS-C1 detektiert, der mit Alexa 647 direkt gekoppelt wurde. c) Die Überlagerung beider Bilder zeigt punktförmige, gelbe Kolokalisierungsstellen.

## 4 Diskussion

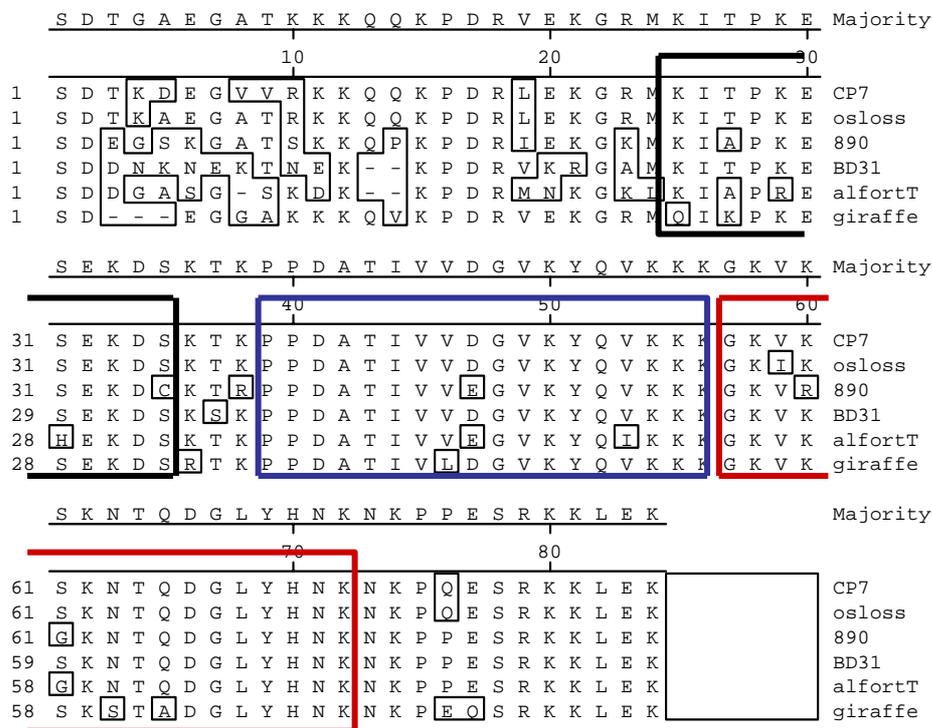
### 4.1 Herstellung und Charakterisierung von mAks gegen das pestivirale Core-Protein und Nachweis des Core-Proteins in Virionen von Pestiviren verschiedener Spezies

Das pestivirale Core gehört zu den am wenigsten charakterisierten Proteinen des Genus *Pestivirus*. Bislang standen für die Impfstoffentwicklung und Charakterisierung der Replikation andere Proteine im Vordergrund des Interesses, womit sich auch der Mangel an Immunreagenzien hoher Spezifität und Sensitivität gegen das Core-Protein erklären lässt. Am Anfang unserer Studien stand ein polyklonales Serum zur Verfügung, das den Nachweis des Core-Proteins im Western blot ermöglichte, mit dem aber die subzelluläre Lokalisierung des Proteins nicht untersucht werden konnte. Aufgrund des Interesses an der Funktion des Core-Proteins bei der Virusmorphogenese und an dessen Interaktion mit der Zelle wurde die Herstellung von mAks angestrebt, die dieses Protein sowohl in infizierten Zellen als auch in Virionen erkennen. Ein monoklonaler Antikörper hat die wichtige Eigenschaft, nur ein einziges Epitop auf dem Antigen zu erkennen und dadurch ein minimales Maß an zu erwartenden Kreuzreaktivitäten und unspezifischer Bindungen im Vergleich zu polyklonalen Antisera zu gewährleisten (Luttmann et al., 2004).

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern in Balb/c Mäusen wurden eine Expressions- und eine Aufreinigungsmethode (immobilisierte Metall Affinitätschromatographie) entwickelt, mit der sehr saubere Core-Proteine der beiden Viren, KSPV und BVDV, gewonnen werden konnten, die als Antigen für die Immunisierung dienten. Ein indirekter ELISA auf „Transfer Surface Plate“ wurde etabliert, wodurch die zügige Isolierung von 8 anti Core-Protein Antikörpern produzierenden Hybridomen ermöglicht wurde.

Alle gewonnenen Antikörper erkannten das gereinigte Protein sowohl in dessen nativem (ELISA) als auch denaturiertem Zustand (Western Blot), was darauf hindeutet, dass diese Antikörper lineare Epitope erkennen. Mit Hilfe der hergestellten Antikörper gelang der Nachweis des Core-Proteins in Virionen verschiedener Pestiviren. Zwei mAks erkannten nur das Core-Protein des KSPV (GRS-C1; -C2), während die anderen sechs über ein breites Reaktionsspektrum verfügten (GRS-C3; -C4; -C5; -C6; -C7; -C8). Dieses Ergebnis lässt sich durch die nähere Untersuchung der durch die Antikörper erkannten Epitope erklären. Im Bereich der Bindungsstelle der mAks GRS-C1 und -C2 scheinen die Aminosäurereste Arginin und Histidin Teil des Epitopes zu sein. Allerdings tritt an den entsprechenden Stellen bei den anderen pestiviralen Stämmen ein Serin oder ein Lysin auf, die konserviert sind. Die übrigen sechs mAks erkennen ein Epitop in einem hoch konservierten Sequenzbereich, dabei scheinen

die einzelnen ausgetauschten Aminosäuren für die Bindung des Antikörpers an das Epitop nicht relevant zu sein (Abbildung 35).



**Abbildung 35.** Darstellung der von den anti Core mAks: GRS-C1, -C2, -C3, -C4, -C5, -C6, -C7 und -C8, erkannten Epitope.

Ein Sequenzvergleich der Core-Proteinsequenz der Pestiviren verschiedener Spezies: CP-7 (BVDV-1b); Osloss (BVDV-1b); 890 (BVDV-2a); BD31 (BDV-1a); Alfort<sub>ti</sub> (KSPV); und Giraffe wurde mit Hilfe des Programms MegAlign durchgeführt.

schwarz eingrahmt: Bereich der Epitope der mAks GRS-C1 und -C2

blau eingrahmt: Bereich der Epitope der mAks GRS-C3, -C6 und -C7

rot eingrahmt: Bereich der Epitope der mAks GRS-C4, -C5 und -C8

Der Einsatz dieser mAks zum Nachweis des Core-Proteins in Virionen ermöglichte die Detektion eines Disulfid verbrückten Core Homodimers bei zwei BVDV-2 Stämmen (890; Giessen-4), sowie dessen nähere Charakterisierung. Das beim Stamm 890, an der Position 35 der Aminosäuresequenz des Core-Proteins, vorhandene Cystein (Ridpath und Bolin 1995) wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese an der entsprechenden Stelle im KSPV Alfort Gesamtklon p447 eingefügt. Diese Mutation war ausreichend für die Bildung eines Disulfid verbrückten Core Homodimers, ohne das Viruswachstum zu beeinflussen.

Bei Pestiviren wurde die Bildung von Disulfidbrücken in Strukturproteinen nur für die Glykoproteine der Virushülle beschrieben (Thiel et al., 1991). Hier wurde ein Core-Protein Homodimer identifiziert, welches durch Disulfidbrücken gebildet wird und keine Rolle bei

der Vermehrung in Zellkultur bzw. Bildung viraler Partikel spielt. Es ist davon auszugehen, dass das pestivirale Core-Protein ohnehin als Dimer vorkommt und bei BVDV-2 Stämmen nur zusätzlich kovalent verbrückt ist. Für das positiv strängige RNS Virus „Rubella Virus“ wurde beschrieben, dass die Anwesenheit von Disulfid verbrückten Homodimeren des Kapsid-Proteins für die Bildung von „*Virus-like Particles*“ nicht essentiell sei (Lee et al., 1996). Die Kapsid-Proteine der Viren des Genus *Flavivirus* Gelbfieber Virus, Dengue Virus, „*Tick-Borne Encephalitis*“ Virus (Jones et al., 2003; Kiermayr et al., 2004) und Hepatitis C Virus kommen ebenfalls als Dimere vor (Boulant et al., 2005).

#### 4.2 Nachweis des Core-Proteins von Pestiviren verschiedener Spezies in infizierten Zellen, und Kolokalisierungsuntersuchungen mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Bei allen getesteten Pestiviren wurde eine zytoplasmatische granuläre Verteilung des Core-Proteins beobachtet, woraufhin seine Kolokalisierung mit folgenden zellulären Kompartimenten: endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien, „*P-Bodies*“ und „*lipid droplets*“ untersucht wurde. Das Core-Protein kolokalisierte mit ER, Mitochondrien und „*P-Bodies*“, aber nicht mit „*lipid droplets*“. Bislang durchgeführte Studien zur zellulären Lokalisierung pestiviraler Proteine zeigten, dass die Strukturproteine E2 und E<sup>ms</sup> nicht auf der Zelloberfläche infizierter Zellen lokalisieren (Weiland et al., 1999; Grummer et al., 2001). Jedoch war es möglich diese zwei Glykoproteine, E2 und E<sup>ms</sup>, sowie das Nichtstrukturprotein NS3 aus der Fraktion intrazellulärer Membranen zu isolieren (Grummer et al., 2001). Über die Lokalisierung des pestiviralen Core-Proteins liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Die Assoziation des Core-Proteins mit dem ER kann auf die Signalsequenz an seinem C-Terminus zurückgeführt werden, die von der Signal Peptidase (SPP) prozessiert wird (Weihofen et al., 2002; Heimann et al., 2006). Dieses Ergebnis der Kolokalisierung könnte darauf hinweisen, dass das „*assembly*“ pestiviraler Virionen, wie bei anderen Mitgliedern der *Flaviviridae* (Novoa et al., 2005), in vom ER stammenden Membranen stattfindet. Unterstützt wird diese Behauptung dadurch, dass die drei Strukturproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2, die mit dem Core-Protein die Virionen bilden, überwiegend in diesem Organell detektiert wurden. Für E<sup>ms</sup> und E2 ist bekannt, dass die Aminosäuren im C-terminalen Bereich der Proteine für die Interaktion mit Membranen verantwortlich sind (Köhl et al., 2004; Fetzer et al., 2005). Einen zusätzlichen Hinweis auf das „*assembly*“ pestiviraler Virionen im ER lieferte eine Untersuchung mit Brefeldin A, welches den Transport von Proteinen aus dem ER in den Golgi Apparat blockiert (Macovei et al., 2006). Kulturzellen wurden nach BVDV Infektion mit Brefeldin A behandelt, so dass keine infektiösen Partikel im Überstand nachweisbar

waren. Allerdings waren die aus diesen Zellen extrahierten Virionen in der Lage Zellen zu infizieren. Das bedeutet, dass die weitere Prozessierung der pestiviralen Glykoproteine im Golgi-Apparat für die Freisetzung der Virionen aus der Zelle entscheidend, jedoch für die Infektiösität nicht notwendig ist (Thiel et al., 1991). Offensichtlich werden die pestiviralen Virionen bereits im ER gebildet.

Bei Untersuchungen mit Zellen, die mit dem nah verwandten Hepatitis C Virus (HCV) infiziert waren, konnte keine Kolo-kalisierung des Core-Proteins mit dem ER bzw. mit den im ER lokalisierten E1-E2 festgestellt werden (Rouillé et al., 2006). Aufgrund dieser Daten und der in dieser Arbeit durchgeführten Kolo-kalisierungsuntersuchungen, ist davon auszugehen, dass das „*assembly*“ von Pestiviren und HCV möglicherweise durch unterschiedliche Mechanismen erfolgt, wobei die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften beider Kapsid Proteine eine entscheidende Rolle spielen könnten.

Für das Core-Protein des Hepatitis C Virus ist ein hydrophober Bereich beschrieben worden, der die Assoziation mit „*lipid droplets*“ vermittelt (Hope und McLauchlan 2000). „*lipid droplets*“ sind zytosolische Kompartimente, in denen sich Triacylglycerol und Cholesterol ansammeln (Londos et al., 1999). Studien zeigten, dass das Kapsid-Protein von HCV sich wie ein Membranprotein verhält, da es u.a. nur in Anwesenheit von Detergenzien löslich blieb (Boulant et al., 2005). Das pestivirale Core-Protein besitzt keine entsprechende hydrophobe Sequenz, die solche Eigenschaften vermittelt. In der Tat lieferten unsere Studien keine Hinweise darauf, dass eine Kolo-kalisierung des Core-Proteins mit „*lipid droplets*“ vorliegt, während das HCV Core ausschließlich in Assoziation mit diesen Strukturen nachgewiesen wird (Rouillé et al., 2006).

In Experimenten mit transfizierten Zellen wurde eine Lokalisierung des HCV Core-Proteins in den Mitochondrien festgestellt (Schwer et al., 2004). Das pestivirale Core-Protein kolo-kalisierte auch mit diesem Organell, allerdings ähnelt kein Bereich des Core-Proteins der hydrophoben Sequenz vom HCV Core-Protein, die für diese Assoziation verantwortlich gemacht wird (Schwer et al., 2004). In ihren Studien zur Prozessierung des C-Terminus vom pestiviralen Core-Proteins zeigten Heimann et al., dass die Instabilität vom Core-Protein in Anwesenheit von Hemmern des zellulären Proteasoms nicht beeinflusst wird (Heimann et al., 2006). Das könnte bedeuten, dass das Core-Protein durch einen anderen proteolytischen Weg degradiert wird. Es wäre beispielsweise möglich, dass eine Fraktion des Core-Proteins nach der C-terminalen Spaltung die ER Membran verlässt und an oder in den Mitochondrien degradiert wird. Es wurde bereits gezeigt, dass nicht korrekt gefaltene Proteine mit Hilfe von Proteinchaperonen durch mitochondriale Proteasen abgebaut werden (Wagner et al., 1994).

Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass das Core-Protein weitgehend ungefalten ist (Penin; Rümenapf persönliche Mitteilung).

Core-Protein Moleküle, die nicht in die Virionen inkorporiert werden und keine richtige Faltung annehmen, könnten von den entsprechenden Chaperonen erkannt und anschließend degradiert werden.

Das Core-Protein zeigte eine zytosolische punktförmige Verteilung in infizierten Zellen, die man bei allen getesteten Stämmen bzw. Isolaten beobachten konnte. Diese Verteilung zusammen mit der Fähigkeit des Core-Proteins sequenzunabhängig RNS zu binden, führte zu der Hypothese, dass das Core-Protein in „*Processing Bodies (P-Bodies)*“ lokalisieren könnte. Bei „*P-Bodies*“ handelt es sich um zytosolische Granulae, in denen sich Enzyme und Faktoren ansammeln, die für den Abbau von mRNA notwendig sind (Cougot et al., 2004) und somit die Translation regulieren, wie z.B. der Translations- Initiationsfaktor eIF4E und der „*translational silencer RNA/helicase*“ p54/RCK (Sheth und Parker 2003; Anderson und Kedersha 2006). Als Marker für „*P-Bodies*“ diente das Protein Ge-1, welches ein wichtiger Bestandteil dieser ist und mit einem Humanserum nachgewiesen wurde (Yu et al., 2005).

Das pestivirale Core-Protein kolokalisierte eindeutig mit „*P-Bodies*“, was verschiedene Gründe haben könnte. Einerseits könnte das Core-Protein mit Komponenten der „*P-Bodies*“, wie z.B. Proteinen oder zellulärer mRNA interagieren. Andererseits wäre es auch möglich, dass das Core-Protein mit der viralen RNS interagiert, die in den „*P-Bodies*“ degradiert werden soll. Daher wäre es denkbar, dass das Core-Protein die Degradations- bzw. Translationskinetik zellulärer mRNA beeinträchtigen könnte.

Die Kolokalisierung des Core-Proteins mit Proteinen des pestiviralen Replikationskomplexes in infizierten Zellen könnte Informationen darüber liefern, ob die Replikation und das Virus „*assembly*“ im gleichen subzellulären Kompartiment stattfinden. Für diese interessante Möglichkeit sind detaillierte, biochemische Experimente notwendig. Als Marker des Replikationskomplexes fanden die Nichtstrukturproteine NS3 und NS5B Verwendung. Das NS3 unterstützt, aufgrund seiner Helikase Aktivität und durch die Prozessierung der anderen Nichtstrukturproteine, die Replikation des viralen Genoms (Meyers und Thiel 1996). Da allerdings nicht bekannt ist, ob das NS3 nur als Bestandteil des Replikationskomplexes vorkommt, wurde die Kolokalisierung des Core-Proteins auch mit dem NS5B-Protein durchgeführt, welches die virale RNS-abhängige RNS-Polymerase darstellt (Zhong et al., 1998). Für diese Experimente mussten im Rahmen dieser Dissertation zusätzlich monoklonale Antikörper gegen NS5B hergestellt werden, da es keine publizierten anti NS5B mAbs gibt.

Eine eindeutige Kolokalisierung des Core-Proteins mit den hypothetischen Bestandteilen des pestiviralen Replikationskomplexes, NS5B und NS3, wurde festgestellt. In den Untersuchungen von Rouillé et al. wiesen die Autoren eine partielle Kolokalisierung des HCV Core-Proteins mit dem NS3 nach, das als Marker des Replikationskomplexes diente (Rouillé et al., 2006). Die Kolokalisierung vom NS5B mit dem ER weist darauf hin, dass die Replikation von Pestiviren in Assoziation mit ER Membranen stattfindet. Für das HCV NS5B wurde ein C-terminales Transmembranfragment beschrieben, das die Integration des NS5B in die ER Membran ermöglicht (Ivashkina et al., 2002). Vergleicht man die Sequenzen des pestiviralen NS5B mit denen von HCV, so findet man im C-terminalen Abschnitt Ähnlichkeiten, wobei dieser Bereich bei Pestiviren weniger hydrophob ist.

Auch alle Nichtsstrukturproteine eines HCV Replikons lokalisieren mit ER Membranen (Mottola et al., 2002). Anhand der Gemeinsamkeiten beider Genera ist es sehr wahrscheinlich, dass die Replikationskomplexe in denselben Kompartimenten zu finden sind. Die Analyse unserer Ergebnisse, im Kontext der bereits veröffentlichten Daten, deutet darauf hin, dass das „assembly“ und die Replikation bei Pestiviren in Assoziation mit dem ER stattfinden könnten. Folgende Hinweise unterstützen diese Hypothese:

1. Das Core-Protein wurde im ER nachgewiesen, in dessen Membran der authentische C-Terminus generiert wird (Heimann et al., 2006).
2. Die drei Glykoproteine, die mit dem Core das Virion bilden, lokalisierten im ER. Die aus diesem Kompartiment stammenden Viruspartikel sind bereits infektiös (Macovei et al., 2006).
3. Das Core-Protein kolokalisiert mit NS3 und NS5B, zwei Bestandteilen des pestiviralen Replikationskomplexes.
4. Der zentrale Bestandteil des pestiviralen Replikationskomplexes, nämlich die RNS-abhängige RNS-Polymerase (NS5B), lokalisiert ebenfalls überwiegend im ER.

#### 4.3 Charakterisierung der RNS bindenden Aktivität des Core-Proteins

Das pestivirale Core-Protein wurde auf seine RNS bindende Aktivität mit verschiedenen RNS getestet. Mit Hilfe eines Agarosegel RNS-Bindungsassays (Geigenmuller-Gnirke et al., 1993) wurde festgestellt, dass das Core-Protein in der Lage ist, pestivirale und nicht pestivirale RNS, verschiedene Bereiche des pestiviralen Genoms, ribosomale, doppelsträngige, sowie A-, U- und G-RNS-Polymere zu binden. Eine DNS-Bindung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Obwohl der RNS-Bindungsassay nur eine qualitative Auswertung der Bindungsstärke ermöglichte, ist aufgrund dieser Daten eine hohe Affinität zu erwarten. Auch

für Proteine anderer Virussysteme wurde bereits eine unspezifische RNS bindende Aktivität beschrieben. Das Echovirus Protein 2C konnte RNS unspezifisch binden, allerdings keine stark gefaltene RNS (Klein et al., 2000). Auch verschiedene Proteine eines Pflanzenvirus wiesen eine unspezifische Interaktion mit RNS auf (Merits et al., 1998).

In den Nukleokapsiden von RNS Viren wird die genomische RNS vom Kapsid-Protein umgeben, wobei die virale RNS reifer Virionen nur an einige Aminosäuren des Kapsid-Proteins gebunden ist (Bink und Pleij 2002). Diese Interaktion scheint unabhängig von der Base zu sein und findet nur zwischen Zucker bzw. dessen Phosphat Gruppe und basischen Aminosäuren (z.B. Lysin) des Kapsides statt. Beim pestiviralen Core-Protein ist es eindeutig, dass es mit der Ribose interagiert, was die unspezifische RNS Bindung erklärt. Die spezifische Inkorporation viraler Genome in Viruspartikel kann anhand dieser Daten nicht auf die spezifische RNS Bindung des pestiviralen Core-Proteins zurückgeführt werden. Für das positiv strängige RNS Virus „*Flock House Virus*“ wurde beschrieben, dass die Verpackung des Genoms nicht durch eine RNS spezifische Interaktion des Core-Proteins vermittelt wird (Venter et al., 2005). In diesem Fall wird die Verpackung der genomischen RNS dadurch gewährleistet, dass Replikation und „*assembly*“ räumlich koordiniert erfolgen. Pestiviren verpacken ihr Genom möglicherweise durch einen ähnlichen Mechanismus.

Das Core-Protein des Hepatitis C Virus (HCV) weist ebenso ein breites Spektrum an RNS Substraten auf (McLauchlan 2000). Diesem Protein wurde eine Funktion als RNS Chaperon zugeschrieben, das die Bildung eines genomischen RNS Dimers ermöglicht (Cristofari et al., 2004), wodurch die Rekombination der RNS während des Replikationszyklus begünstigt werden könnte. RNS Chaperone sind Proteine, in denen ungefaltene Bereiche zu finden sind (Tompa und Csermely 2004) die mit einem breiten Spektrum von RNS Sequenz interagieren und dafür sorgen, dass das RNS Molekül die stabilste Konformation annimmt und dadurch einen Funktionsgewinn erzielt (Ivanyi-Nagy et al., 2005). Der pleiotrope Phänotyp, der bei der Überexpression des HCV Core Proteins auftritt, könnte auf die Chaperon Aktivität des Proteins zurückzuführen sein.

Für das Nukleokapsid des humanen Immundefizienzvirus (HIV) ist eine Funktion als RNS Chaperon beschrieben worden. Das Protein ist zu fast 50 Prozent ungefalteten und erscheint wichtige Rollen zu übernehmen bei den verschiedenen Schritten des viralen Infektionszyklus, z.B. bei der RNS-Replikation und der Virusmorphogenese, wobei das Protein mit Faktoren der infizierten Zelle interagiert (Ivanyi-Nagy et al., 2005).

Möglicherweise fungiert das pestivirale Core ebenfalls als RNS Chaperon, da es RNS bindende Aktivität aufweist und wie für die identifizierten RNS Chaperonen beschrieben, ungefalteten vorliegt.

Durch die Doppelstrang RNS bindende Aktivität des Core-Proteins könnten Pestiviren den „*RNA Interference*“ Mechanismus in der infizierten Zelle beeinflussen. Durch diesen Mechanismus wird das virale Genom von zellulären RNAsen angegriffen, die dabei resultierenden Fragmente paaren sich mit komplementären Bereichen des viralen Genoms und die entstandene Doppelstrang RNS kann dann degradiert werden (Bagasra und Prilliman 2004). Die Viren haben eine Reihe von Strategien entwickelt, um während der Infektion verschiedene Schritte des „*RNA Interference*“ Mechanismus zu unterbrechen (Schütz und Sarnow 2006). Für zwei Nodaviren wurde beschrieben, dass das Nichtstrukturprotein B2 doppelsträngige RNS bindet, woraufhin man postulierte, dass die Interaktion zwischen genomischer RNS und Komponenten des „*RNA Interference*“ Systems durch die RNS bindende Aktivität von B2 blockiert wird (Sullivan und Ganem 2005; Fenner et al., 2006).

Für das HCV Core-Protein wurde eine hemmende Wirkung auf den RNS Interferenz Mechanismus beschrieben, wobei das Core-Protein aber mit einer zentralen Komponente des Systems interagiert und nicht die RNS zu binden scheint (Wang et al., 2006). Über den Einfluss pestiviraler Proteine auf diesem Mechanismus ist zwar nichts bekannt, es wäre aber vorstellbar, dass ein Protein wie das Core mit einer diffusen intrazellulären Lokalisierung und RNS bindenden Eigenschaften den RNS Interferenz Mechanismus ebenfalls zum Vorteil des Virus beeinflussen könnte.

Für KSPV und nicht zytopathogene BVDV Stämmen ist eine Blockierung der Interferon Produktion beschrieben worden (Schweizer und Peterhans 2001; Bensaude et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass nicht zytopathogenes BVDV gegen IFN resistent ist, aber gleichzeitig die BVDV infizierten Zellen vor anderen Virus Infektionen geschützt sind (Schweizer et al., 2006). Es wurde auch nachgewiesen, dass ein KSPV nur ohne die N-terminale Protease N<sup>pro</sup> die Interferon Produktion stimuliert (Ruggli et al., 2005), weshalb die Aktivität von N<sup>pro</sup> als Hauptursache für die Blockierung anzusehen ist.

Die Wirkungen des Core-Proteins auf das Interferon System sind bisher noch nicht untersucht worden. Aufgrund seiner RNS bindenden Aktivität und Verteilung in der infizierten Zelle könnte das Core Protein dazu beitragen, dass das Virus die Induktion der Interferonproduktion unter dem Einfluss der dsRNS hemmt. Möglicherweise würde das pestivirale Core die dsRNS-abhängige Interferon Induktion minimieren, indem das Protein die virale dsRNS bindet und somit die Interaktion mit dem s.g. „*Toll-like receptor 3*“ (TL-3) unterbindet. Der

TL-3 ist in der Lage die dsRNS und somit die Virusinfektion zu erkennen, infolgedessen Typ-I Interferon produziert wird (Takeda et al., 2003). Für eine Reihe verschiedener RNS-Viren sind virale Proteine beschrieben worden, die durch ihre dsRNS bindende Aktivität die Interferon Induktion hemmen.

Die im Rahmen dieser Dissertation erbrachten Ergebnisse über die subzelluläre Lokalisierung und RNS bindende Eigenschaften des Core-Proteins von Pestiviren stellen die Grundlage für weitere Untersuchungen über die Funktion dieses Proteins dar. Im Vordergrund des Interesses steht die Morphogenese des pestiviralen Partikels. Dem Core-Protein kommt dabei eine zentrale Funktion zu, da es sowohl mit der RNS als auch mit anderen zellulären und viralen Strukturen (Replikationskomplex) wechselwirkt. Ob und in welchem Umfang das Core-Protein mit den Mechanismen der angeborenen Immunität interferiert, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 5 Zusammenfassung

Die subzelluläre Lokalisierung und die RNS bindende Aktivität des Core-Proteins von Pestiviren wurden untersucht und folgende Ergebnisse erzielt:

1.- Das Gen des Core-Proteins von KSPV und BVDV wurde in einen prokaryotischen Expressionsvektor kloniert, das Core-Protein in Bakterien (*E. coli*) exprimiert und durch „*Immobilized Metal Affinity Chromatography*“ (IMAC) in hohem Maß gereinigt. Dieses Protein fand Anwendung als Antigen zur Herstellung von mAks und stellte die Basis eines RNS-Bindungsassays dar.

2.- Ein System zum Screening von Hybridom Überständen wurde entwickelt, mit dem acht anti Core-Protein mAk produzierende Hybridome isoliert wurden. Die Anwendung der hergestellten mAks ermöglichte die Detektion des Core-Proteins von 13 Pestiviren verschiedener Spezies [BVDV-1 (7 Stämme); BVDV-2 (2 Stämme); BDV (2 Stämme); KSPV; Giraffe] in infizierten Zellen und aufkonzentrierten Virionen.

3.- Ein Disulfid verbrücktes Core-Protein Homodimer wurde in Virionen von BVDV-2 Stämmen identifiziert und mittels reverser Genetik charakterisiert. Wie bei den Flaviviren kommt das Core-Protein in Virionen von Pestiviren sehr wahrscheinlich als Dimer vor.

4.- In infizierten Zellen kolokalisierte das Core-Protein mit dem endoplasmatischen Retikulum und mit den Mitochondrien. Auch wurde dieses Protein in Assoziation mit den „*RNA-processing bodies*“ („*P-Bodies*“) nachgewiesen, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation spielen. Eine Kolokalisierung des Core-Proteins mit Komponenten der pestiviralen Replikase, nämlich NS3 und NS5B, wurde festgestellt. Das NS5B (virale RNS-abhängige RNS-Polymerase) wurde, wie die drei Strukturproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2, überwiegend ER assoziiert nachgewiesen. Aufgrund seiner Verteilung könnte das Core-Protein in der infizierten Zelle Prozesse wie z.B. Translation beeinflussen. Die Lokalisierung der Nichtstruktur- bzw. Strukturproteine deutet darauf hin, dass „*assembly*“ und Replikation bei Pestiviren in demselben Kompartiment stattfinden.

5.- Ein Agarose RNS-Bindungsassay wurde zur Untersuchung der RNS-Bindungsaktivität des Core-Proteins entwickelt. Das Core-Protein band RNS sequenzunabhängig und somit kann die Inkorporation genomischer RNS in die pestiviralen Virionen aufgrund einer spezifischen RNS bindenden Aktivität des Core-Proteins ausgeschlossen werden. Sehr wahrscheinlich wird es durch das zeitlich koordinierte Erfolgen der Replikation des viralen Genoms und des Virus „*assembly*“ ermöglicht.

## 6 Summary

The subcellular localization and RNA binding activity of the core-protein from pestiviruses were studied and the following results were obtained:

1.- The gene of the core-protein from CSFV and BVDV was cloned in a prokaryotic expression vector. After expression in bacteria (*E. coli*) the protein was purified by „*Immobilized Methal Affinity Chromatography*“ (IMAC), and used as antigen to produce mAbs and also in a RNA-binding assay.

2.- A system for the screening from hybridoma supernatants was developed which allowed the isolation of eight hybridomas that produce an core-protein mAbs.

The generated mAbs proved to be useful to detect the core-protein of different Pestivirus species [BVDV-1 (7 strains); BVDV-2 (2 strains); BDV (2 strains); CSFV; giraffe] in infected cells and concentrated virions.

3.- A core-protein disulfide bond-linked homodimer was identified in virions from BVDV-2 strains and was characterized by reverse genetics. It is very probable that, like the core-protein from flaviviruses, the pestiviral core-protein is found as a dimer in virions.

4.- In infected cells the core-protein colocalized with the endoplasmic reticulum und mitochondria. This protein was also found in association with „*RNA-processing bodies*“ („*P-Bodies*“), which play an important role in the regulation of translation.

The core-protein also colocalized with components of the pestiviral replicase, namely NS3 and NS5B. The NS5B (viral RNA-dependent RNA polymerase), and the three structural proteins E<sup>ms</sup>, E1 und E2 associated mainly with the endoplasmic reticulum.

Due to its distribution in the infected cell the core-protein could influence processes like i.e. translation. The localization patterns of the nonstructural and structural proteins indicate that in the case of pestiviruses assembly and replication could take place in the same compartment.

5.- An agarose RNA-binding assay was developed to study the RNA-binding activity of the core-protein. The core-protein bound RNA in a sequence independent manner, which excludes the possibility that the incorporation of viral genomes in the virions is due to a sequence specific interaction of the core-protein with the pestiviral RNA. Instead the specific incorporation of the viral genome very likely occurs due to the compartmentalized and time coordinated replication of the viral genome and the virus assembly.

---

## 7 Literatur

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman und J. S. Pober (1997). Cellular and molecular immunology. Pennsylvania, W.B. Saunders.
- Anderson, P. und N. Kedersha (2006). RNA granules. *J Cell Biol* **172**(13): 803-808.
- Avalos-Ramirez, R., M. Orlich, H. J. Thiel und P. Becher (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* **286**(2): 456-65.
- Bagasra, O. und K. R. Prilliman (2004). RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol* **35**: 545-553.
- Barlow, R. M., J. C. Rennie, A. C. Gardiner und V. T. Vantsis (1980). Infection of pregnant sheep with the NADL strain of bovine virus diarrhoea virus and their subsequent challenge with Border disease IIB pool *J Comp Path* **90**(1): 67-72.
- Becher, P., M. Orlich, A. Kosmidou, M. König, M. Baroth und H.-J. Thiel (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* **262**(1): 64-71.
- Becher, P., M. Orlich, A. D. Shannon, G. Horner, M. König und H. J. Thiel (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* **78**(6): 1357-1366.
- Becher, P., M. Orlich und H. J. Thiel (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* **72**(6): 5165-5173.
- Bensaude, E., J. L. E. Turner, P. R. Wakeley, D. A. Sweetman, C. Pardieu, T. W. Drew, T. Wileman und P. P. Powell (2004). Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *J Gen Virol* **85**: 1029-1037.
- Bink, H. H. J. und C. W. A. Pleij (2002). RNA-protein interactions in spherical viruses. *Arch Virol* **147**: 2261-2279.
- Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin und J.-P. Lavergne (2005). Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* **79**(17): 11353-11365.
- Collett, M. S., D. K. Anderson und E. Retzel (1988a). Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol* **69**(10): 2637-43.
- Collett, M. S., R. Larson, S. K. Belzer und E. Retzel (1988b). Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**(1): 200-8.
- Corapi, W. V., R. O. Donis und E. J. Dubovi (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**(9): 1388-1394.

- Cougot, N., S. Babajko und B. Séraphin (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* **165**(1): 31-40.
- Cristofari, G., R. Ivanyi-Nagy, C. Gabus, S. Boulant, J.-P. Lavergne, F. Penin und J.-L. Darlix (2004). The hepatitis C virus core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **32**(8): 2623-2631.
- Dunne, H. W. (1973). Hog cholera (european swine fever) *Adv Vet Sci Comp Med* **17**: 315-359.
- Edwards, S., A. Fukusho, P. C. Lefevre, A. Lipowski, Z. Pejsak, P. Roehe und J. Westergaard (2000). Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol* **73**(2-3): 103-19.
- Enzmann, P. J. und F. Weiland (1978). Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses. *Arch Virol* **57**(4): 339-48.
- Fenner, B. J., W. Goh und J. Kwang (2006). Sequestration and protection of double-stranded RNA by the betanodavirus B2 Protein. *J Virol* **80**(14): 6822-6833.
- Ferrari, D. M. und H.-D. Söling (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J* **339**: 1-10.
- Fetzer, C., B. A. Tews und G. Meyers (2005). The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E<sup>ms</sup> represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol* **79**(18): 11901-11913.
- Geigenmüller-Gnirke, U., H. Nitschko und S. Schlesinger (1993). Deletion analysis of the capsid protein of Sindbis virus: identification of the RNA binding region. *J Virol* **67**(3): 1620-1626.
- Gómez-Villamandos, J. C., F. J. Salguero, E. Ruiz-Villamor, P. J. Sánchez-Cordón, M. J. Bautista und M. A. Sierra (2003). Classical swine fever: pathology of bone marrow. *Vet Pathol* **40**: 157-163.
- Grummer, B., M. Beer, E. Liebler-Tenorio und I. Greiser-Wilke (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* **82**: 2597-2605.
- Harlow, E. und D. Lane (1998). *Antibodies: A laboratory manual*. Plainview, NY, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Hausmann, Y., G. Roman-Sosa, H. J. Thiel und T. Rümenapf (2004). Classical swine fever virus glycoprotein Erns is an endoribonuclease with an unusual base specificity. *J Virol* **78**(10): 5507-5512.
- Heimann, M., G. Roman-Sosa, B. Martoglio, H.-J. Thiel und T. Rümenapf (2006). Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol* **80**(4): 1915-21.
- Hope, R. G. und J. McLauchlan (2000). Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* **81**: 1913-1925.

- Horzinek, M., J. Maess und R. and Laufs (1971). Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea and hog cholera viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* **33**(3): 306-8.
- Horzinek, M., E. Reczko und K. and Petzoldt (1967). On the morphology of hog cholera virus. *Arch Gesamte Virusforsch* **21**(3): 475-8.
- Hulst, M. M. und R. J. Moormann (1997). Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins Erns and E2 of classical swine fever virus: Erns and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol* **78**: 2779-2787.
- Iqbal, M., H. Flick-Smith und J. McCauley (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol* **81**(451-459).
- Ivanyi-Nagy, R., L. Davidovic, E. W. Kahandjian und J.-L. Darlix (2005). Disordered RNA chaperone proteins: from functions to disease. *Cell. Mol. Life. Sci* **62**: 1409-1417.
- Ivanyi-Nagy, R., I. Kanevsky, C. Gabus, J.-P. Lavergne, D. Ficheuch, F. Penin, P. Fossé und J.-L. Darlix (2006). Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **34**(9): 2618-2533.
- Ivashkina, I., B. Wölk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, F. Penin und D. Moradpour (2002). The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* **76**(24): 13088-13093.
- Jones, C. T., L. Ma, J. W. Burgner, T. D. Groesch, C. B. Post und R. J. Kuhn (2003). Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* **77**(12): 7143-7149.
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch exp Pathol Pharmakol* **162**: 480.
- Kiermayr, S., R. M. Kofler, C. W. Mandl, P. Messner und F. X. Heinz (2004). Isolation of capsid protein dimers from tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J Virol* **78**(15): 8078-8084.
- Klein, M., H. J. Eggers und B. Nelsen-Salz (2000). Echovirus-9 protein 2C binds single-stranded RNA unspecifically. *J Gen Virol* **81**: 2481-2484.
- Köhl, W., G. Zimmer, I. Greiser-Wilke, L. Haas, V. Moennig und G. Herrler (2004). The surface glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus contains an intracellular localization signal. *J Gen Virol* **85**: 1101-1111.
- König, M., T. Lengsfeld, T. Pauly, R. Stark und H. J. Thiel (1995). Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* **69**(10): 6479-6486.
- Krey, T., A. Himmelreich, M. Heimann, C. Menge, H. J. Thiel, K. Maurer und T. Rümenapf (2006). Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol* **80**(8): 3912-3922.

- Kunkel, M. und S. J. Watowich (2002). Conformational changes accompanying self-assembly of the hepatitis C virus core protein. *Virology* **294**: 239-245.
- Langedijk, J. P. M. (2001). Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J. Biol. Chem* **277**: 5308-5314.
- Lazar, C., N. Zitzmann, R. A. Dwek und N. Branza-Nichita (2003). The pestivirus glycoprotein E(rns) interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology* **30**(314): 696-705.
- Lee, J. Y., D. Hwang und S. Gillam (1996). Dimerization of rubella virus capsid protein is not required for virus particle formation. *Virology*(216): 223-227.
- Li, D., W. B. Lott, J. Martyn, G. Haqshenas und E. J. Gowans (2004). Differential effects on hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site by vitamin B12 and the HCV core protein. *J Virol* **78**(21): 12075-81.
- Liang, D., I. Fernandez-Sainz, I. H. Ansari, L. H. V. G. Gil, V. Vassilev und R. O. Donis (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol* **84**: 1269-1274.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira und J. Darnell (1996). *Molekulare Zellbiologie*. Berlin, 2 Walter de Gruyter.
- Londos, C., D. L. Brasaemle, C. J. Schultz, J. P. Segrest und A. R. Kimmel (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Cell & Developmental biology* **10**: 51-58.
- Luttmann, W., K. Bratke, M. Küpper und D. Myrtek (2004). *Immunologie*. Heidelberg, Elsevier.
- Macovei, A., N. Zitzmann, C. Lazar, R. A. Dwek und N. Branza-Nichita (2006). Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochem Biophys Res Comm* **346**: 1083-1090.
- Mandl, C. W. (2004). Flavivirus immunization with capsid-deletion mutants: basics, benefits, and barriers. *Viral Immunol* **14**(4): 461-471.
- Marx, J. (2005). P-Bodies mark the spot for controlling protein production. *Science* **310**(4): 764-765.
- Maurer, K., T. Krey, V. Moennig, H. J. Thiel und T. Rüménapf (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* **78**(4): 1792-1799.
- McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hep* **7**: 2-14.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, R. G. Hope und B. Martoglio (2000). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* **21**: 3980-3988.

- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, R. G. Hope und B. Martoglio (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* **21**(15): 3980-3988.
- Merits, A., D. Guo und M. Saarma (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J Gen Virol* **79**: 3123-3127.
- Meyers, G., T. Rügenapf und H. J. Thiel (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* **171**: 555-567.
- Meyers, G., N. Tautz, P. Becher, H. J. Thiel und B. Kümmerer (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J Virol* **70**: 8606-8613.
- Meyers, G. und H. J. Thiel (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res* **47**: 53-118.
- Moennig, V., G. Floegel-Niesmann und I. Greiser-Wilke (2003). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J* **165**: 11-20.
- Moennig, V. und P. G. Plagemann (1992). The pestiviruses. *Adv Virus Res* **41**: 53-98.
- Mottola, G., G. Cardinali, A. Ceccacci, C. Trozzi, L. Bartholomew, M. R. Torrisi, E. Pedrazzini, S. Bonatti und G. Migliaccio (2002). Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* **293**: 31-43.
- Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn und M. G. Rossmann (2005). A structural perspective of the *flavivirus* life cycle. *Nature* **3**: 13-22.
- Nakai, K., T. Okamoto, T. Kimura-Someya, K. Ishii, C. K. Lim, H. Tani, E. Matsuo, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Miyamura, J. H. Nunberg, K. Moriishi und Y. Matsuura (2006). Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol* **80**(22): 11265-11273.
- Novoa, R. R., G. Calderita, R. Arranz, J. Fontana, H. Granzow und C. Risco (2005). Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* **97**: 147-172.
- Pauly, T., M. König, H. J. Thiel und A. Saalmüller (1998). Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J Gen Virol* **79**: 31-40.
- Pellerin, C., J. van den Hurk, J. Lecomte und P. Tussen (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**(2): 260-268.
- Poole, T. L., C. Wang, R. A. Popp, L. N. Potgieter, A. Siddiqui und M. S. Collett (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *J Virol* **206**(1): 750-4.

- Ray, R. B., L. M. Lagging, K. Meyer und R. Ray (1996). Hepatitis C virus core protein cooperates with *ras* and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* **70**: 4438-4443.
- Rice, C. M. (1996). Flaviviridae: the viruses and their replication. *Filed's virology*. P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott-Raven. 3: 931-959.
- Ridpath, J. und S. R. Bolin (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.
- Rijnbrandt, R., T. van der Straaten, P. A. van Rijn, W. J. Spaan und P. J. Bredenbeek (1997). Internal ribosomal 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**(1): 451-7.
- Rouillé, Y., F. Helle, D. Delgrange, P. Roingard, C. Voisset, E. Blanchard, S. Belouzard, J. McKeating, A. H. Patel, G. Maertens, T. Wakita, C. Wychowski und J. Dubuisson (2006). Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* **80**(6): 2832-2841.
- Ruggli, N., B. H. Bird, L. Liu, O. Bauhofer, J. D. Tratschin und M. A. Hofmann (2005). N(pro) of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction. *Virology* **340**(2): 265-76.
- Rümenapf, T., R. Stark, M. Heimann und H. J. Thiel (1998). N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site directed mutagenesis. *J Virol* **72**: 2544-2547.
- Rümenapf, T., R. Stark, G. Meyers und H. J. Thiel (1991). Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* **65**(2): 589-597.
- Rümenapf, T., G. Unger, J. H. Strauss und H. J. Thiel (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* **67**(6): 3288-94.
- Saatkamp, H. W., P. B. Berentsen und H. S. Horst (2000). Economic aspects of the control of classical swine fever outbreaks in the European Union. *Vet Microbiol* **73**(2-3): 221-237.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York., Cold Spring Harbor Press.
- Santollini, E., G. Migliaccio und N. La-Monica (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* **68**: 3631-3641.
- Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer und H.-J. Thiel (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**: 1169-1171.

- Schütz, S. und P. Sarnow (2006). Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. *Virology* **344**: 151-157.
- Schweizer, M., P. Mätzner, G. Pfaffen, H. Stalder und E. Peterhans (2006). "Self" and "nonsel" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J Virol* **80**(14): 6926-6935.
- Schweizer, M. und E. Peterhans (2001). Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol* **75**(10): 4692-4698.
- Schwer, B., S. Ren, T. Pietschmann, J. Kartenbeck, K. Kaehlcke, R. Bartenschlager, T. S. Benedict-Yen und M. Ott (2004). Targeting of novel hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization signal. *J Virol* **78**(15): 7958-7968.
- Shaw, I. G., C. E. Winkler und S. Terlecki (1967). Experimental reproduction of hypomyelogenesis congenita of lambs. *Vet Rec* **81**: 115-116.
- Sheth, U. und R. Parker (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **2**(300): 805-808.
- Stark, R., G. Meyers, T. Rüménapf und H. J. Thiel (1993). Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**: 7088-7095.
- Sullivan, C. S. und D. Ganem (2005). A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol* **79**(12): 7371-7379.
- Summerfield, A., S. M. Knoetig, R. Tschudin und K. McCullough (2000). Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during classical swine fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells. *Virology* **272**: 50-60.
- Summerfield, A., K. Zingle, S. Inumaru und K. McCullough (2001). Induction of apoptosis in bone marrow neutrophil-lineage cells by classical swine fever virus. *J Gen Virol* **82**: 1309-1318.
- Suzuki, R., S. Sakamoto, T. Tsutsumi, A. Rikimaru, K. Tanaka, T. Shimoike, K. Moriishi, T. Iwasaki, K. Mizumoto, Y. Matsuura, T. Miyamura und T. Suzuki (2005). Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol* **79**(2): 1271-1281.
- Takeda, K., T. Kaisho und S. Akira (2003). Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol* **21**: 335-376.
- Tautz, N., A. Kaiser und H. J. Thiel (2000). NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* **1**(273): 351-363.
- Thiel, H. J., P. G. Plagemann und V. Moennig (1996). Pestiviruses. *Fields Virology*: 1059-1069.

- Thiel, H. J., R. Stark, E. Weiland, T. Rümenapf und G. Meyers (1991). Hog Cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* **65**(9): 4705-12.
- Tompa, P. und P. Csermely (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* **18**: 1169-1175.
- Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara und A. Nomoto (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**(3): 1476-83.
- Vantsis, V. T., K. A. Linklater, J. C. Rennie und R. M. Barlow (1979). Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of border disease. *J Comp Path* **89**: 331-339.
- Venter, P. A., N. K. Krishna und A. Schneemann (2005). Capsid protein synthesis from replicating RNA directs specific packaging of the genome of a multipartite, positive-strand RNA virus. *J Virol* **79**(10): 6239-6248.
- Wagner, I., H. Arlt, L. van Dyck, T. Langer und W. Neupert (1994). Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* **13**(21): 5135-5145.
- Wang, Y., N. Kato, A. Jazag, N. Dahrel, M. Otsuka, H. Taniguchi, T. Kawabe und M. Omata (2006). Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNS silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* **130**: 883-892.
- Wang, Z., Y. Nie, P. Wang, M. Ding und H. Deng (2004). Characterization of classical swine fever virus entry by using presutyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology* **330**: 332-341.
- Warrener, P. und M. S. Collett (1995). Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol* **69**(3): 1720-1726.
- Weihofen, E., K. Binns, M. K. Lemberg, K. Ashman und B. Martoglio (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* **296**: 2215-2218.
- Weiland, E., R. Ahl, R. Stark, F. Weiland und H. J. Thiel (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* **66**(6): 3677-82.
- Weiland, E., R. Stark, B. Haas, T. Rümenapf, G. Meyers und H. J. Thiel (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* **64**(8): 3563-3569.
- Weiland, F., E. Weiland, G. Unger, A. Saalmüller und H. J. Thiel (1999). Localization of pestiviral envelope proteins E<sup>ms</sup> and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J Gen Virol* **80**: 1157-1165.
- Wengler, G., D. W. Bradley, M. S. Collett, F. H. Heinz, R. W. Schlesinger und J. H. Strauss (1995). Flaviviridae. *Virus taxonomy*. F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S.

- A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo und M. D. Summers. Vienna, Springer-Verlag. **Six report on the international committee on taxonomy of viruses.**
- Xu, J., E. Mendez, P. R. Caron, C. Lin, M. A. Murcko, M. S. Collett und C. M. Rice (1997). Bovine diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* **71**(7): 5312-5322.
- Yu, J. H., W. H. Yang, T. Gulick, K. D. Bloch und D. B. Bloch (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* **11**: 1795-1802.
- Zhong, W., L. L. Gutshall und A. M. DeVecchio (1998). Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J Virol* **72**(11): 9365-9369.

## **Präsentationen auf Kongressen:**

Teile der vorgelegten Arbeit wurden in folgenden Kongressen als Poster präsentiert:

Gleyder Roman-Sosa & Till Rümenapf

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against pestivirus core protein

- *6<sup>tz</sup> Pestivirus Symposium, Thun, Switzerland, sept 2005*

- *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, März 2006*

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5141-6



9 783835 951419

