

Etablierung und Charakterisierung eines *in vivo* RNA-Rekombinationssystems: Mechanistische Studien und Erzeugung rekombinanter Pestiviren



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

ANDREAS GALLEI

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 2005

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

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: **PD. Dr. Paul Becher**

**Etablierung und Charakterisierung
eines *in vivo* RNA-Rekombinationssystems:
Mechanistische Studien und
Erzeugung rekombinanter Pestiviren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Andreas Gallei

Tierarzt aus Mannheim

Gießen 2005

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: PD Dr. Paul Becher

Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Tag der Disputation: 22.03.2005

Ich erkläre:

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

**Meinen Eltern
Juliane und Peter Gallei
In Liebe und Dankbarkeit
gewidmet**

Abkürzungen

A	Adenosin
aa	„amino acids“ - Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BDV	„Border Disease“-Virus
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhöe
bK	biologische Klonierung
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
°C	Grad Celsius
cp/CP	„cytopathogenic“ - zytopathogen
cDNA	„copy“-DNA
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	„doublestranded“ - doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Guanosin
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IU	„international units“ - internationale Einheiten
IRES	„internal ribosomal entry site“ - interne Ribosomen-Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KSPV	Virus der klassischen Schweinepest
l	Liter
m	milli
M	molar
μ	mikro

mA	milli-Ampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mCi	milli-Curie
MD	„Mucosal Disease“
min	Minute
m.o.i.	„multiplicity of infection“ – Multiplizität der Infektion
mRNA	„messenger RNA“ – Boten-RNA
n	nano
n.i.	nicht infiziert
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	nichttranslatierte Region
ncp/NCP/nzp	„noncytopathogenic“ - nicht zytopathogen
ORF	„open reading frame“ - offener Leserahmen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	post infectionem
PI	persistent infiziert
p.t.	post transfectionem
RdRp	„RNA dependent RNA polymerase“ - RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
Rt	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNT	Serumneutralisationstest
s.o.	siehe oben
ss	„single-stranded“ - einzelsträngig
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCID ₅₀	„tissue culture infectious dose“ ₅₀ - Dosis infektiöser Einheiten, die 50 % der Gewebekulturzellen infizieren

TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uridin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
zp	zytopathogen
ZPE	zytopathischer Effekt
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG	11
1.1 RNA-Rekombination	11
1.1.1 Definition und biologische Bedeutung der RNA-Rekombination	11
1.1.2 Putative Mechanismen der RNA-Rekombination	12
1.1.3 RNA-Rekombination beeinflussende Faktoren	17
1.2 Pestiviren	20
1.2.1 Taxonomie, Morphologie, Genomaufbau und Biotypen	20
1.2.2 Wirtsspektrum von Pestiviren und Pathogenese von Pestivirus-induzierten Krankheiten	21
1.2.3 RNA-Rekombination bei Pestiviren	26
1.3 Zielsetzung der Arbeit	31
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 Zellen.....	32
2.1.1.1 Eukaryotische Zellen	32
2.1.1.2 Prokaryotische Zellen	32
2.1.2 Virusstämme	32
2.1.3 Plasmide und Gesamtklone	32
2.1.4 Antiseren und Antikörper	34
2.1.4.1 Antiseren.....	34
2.1.4.2 Antikörper.....	34
2.1.5 Synthetische DNA-Oligonukleotide	35
2.1.5.1 Oligonukleotide für RT, PCR, gerichtete Mutation und Klonierung	35
2.1.5.2 Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung	40
2.1.6 Nährmedien	41
2.1.6.1 Zellkulturmedien	41
2.1.6.2 Bakterienkulturmedien	41
2.1.7 Lösungen und Puffer	42
2.1.8 Chemikalien	46
2.1.9 Radioaktiv markierte Substanz.....	48
2.1.10 Enzyme.....	48
2.1.11 Vorgefertigte Systeme ("Kits")	48
2.1.12 Verbrauchsmaterialien.....	49
2.1.13 Geräte	50
2.2 Methoden	52
2.2.1 Zellkulturarbeiten	52
2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten	52
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	52
2.2.1.3 Virusinfektion von Zellen.....	53
2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit synthetischer RNA	53
2.2.1.5 Plaquereinigung	54
2.2.1.6 Virustitration und Titerbestimmung	54
2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von viralem Antigen.....	55
2.2.1.8 Serumneutralisationstest	55
2.2.1.9 Wachstumskurve	56
2.2.1.10 Kristallviolett färbung von Zellen.....	57

Inhaltsverzeichnis

2.2.2 Mikrobiologische Methoden	57
2.2.2.1 Anzucht von Bakterien	57
2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	57
2.2.2.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	58
2.2.2.4 Kleine Plasmidpräparation (Mini-Präp).....	59
2.2.2.5 Große Plasmidpräparation (Midi-Präp)	60
2.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken.....	61
2.2.3.1 Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanol-fällung	61
2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	61
2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	62
2.2.4 RNA-Techniken	62
2.2.4.1 Synthetische Transkription	62
2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen.....	63
2.2.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese für „Northern Blot“.....	63
2.2.4.4 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“)	64
2.2.4.5 RNA/DNA-Hybridisierung.....	64
2.2.4.6 Reverse Transkription (RT).....	65
2.2.5 DNA-Techniken.....	65
2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	65
2.2.5.2 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „Quick Change“(QC)-PCR	66
2.2.5.3 Radioaktive Markierung durch „Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gensonde	67
2.2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	67
2.2.5.5 Enzymatische Spaltung von DNA	68
2.2.5.5.1 cDNA-Linearisierung für die synthetische Transkription.....	68
2.2.5.5.2 DNaseI-Verdau	68
2.2.5.5.3 <i>DpnI</i> -Verdau von QC-PCR-Produkten	68
2.2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	68
2.2.5.7 Sequenzierung von DNA.....	69
2.2.5.8 DNA-Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	70
2.2.5.9 Konstruktion der cDNA-Klone.....	71
2.2.5.9.1 p+ubi SGT	71
2.2.5.9.2 p-ubi SGT	71
2.2.5.9.3 p-CP7-5A.....	72
2.2.5.9.4 pNCP7-M1	72
2.2.5.9.5 p+ubi SGT-M1M2.....	72
2.2.5.9.6 p+ubi SGT-M2M3	73
2.2.5.9.7 pNCP7- <i>HindIII/HindIII</i>	73
2.2.5.9.8 pNCP7-GAA	73
2.2.5.9.9 pNCP7- Δ <i>NaeI/SmaI</i>	74
2.2.5.9.10 pNCP7- Δ <i>Clal/Clal</i>	74
2.2.5.9.11 pCP7-11449	74
2.2.5.9.12 pCP7-11284	74
2.2.5.9.13 p+SGT-CP7-11201	75
2.2.5.9.14 p+SGT-CP7-11450	75
2.2.5.9.15 p+ubi-Alfort.....	76
2.2.6 Proteinanalytische Methoden	77
2.2.6.1 Zellyse	77
2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	77
2.2.6.3 Immunoblotanalyse nach Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran	78
2.2.7 Analyse von Sequenzdaten.....	78

Inhaltsverzeichnis

3. ERGEBNISSE	80
3.1 Entwicklung und Charakterisierung eines <i>in vivo</i> RNA-Rekombinationssystems für BVDV	80
3.1.1 Etablierung eines RNA-Rekombinationssystems für BVDV	80
3.1.2 Einfluss der in den synthetischen Transkriptionsansätzen enthaltenen cDNA auf die Entstehung eines zytopathischen Effekts in Zellkultur	82
3.1.3 Korrelation zwischen den Mengen an transfizierter +ubi SGT-RNA und der Anzahl voneinander unabhängig entstandener ZPEs in Zellkultur	84
3.1.4 Charakterisierung von zp BVDV-Rekombinanten	85
3.2 Mechanistische Studien zur RNA-Rekombination	91
3.2.1 Einfluss der Polarität des synthetischen Transkripts +ubi SGT	91
3.2.2 Untersuchungen zur Replikationsinitiation des Minusstrangs von zp BVDV CP7-5A.....	92
3.2.3 Stabilität von +ubi SGT nach Transfektion	94
3.2.4 RNA-Rekombination nach Kotransfektion von zwei synthetischen RNAs in nicht infizierte Zellen	95
3.2.5 RNA-Rekombination nach Kotransfektion von zwei replikationsinkompetenten RNAs.....	96
3.2.6 Charakterisierung von nzp BVDV-Rekombinanten	97
3.2.7 Ursprung der viralen 3'NTR in rekombinanten BVDV-Genomen.....	100
3.2.8 Kotransfektionen von +ubi SGT mit RdRp-Mutanten von NCP7-5A.....	101
3.2.9 RNA-Rekombination <i>in vivo</i> in Abwesenheit einer funktionellen pestiviralen RdRp	104
3.3 Gezielte Anwendung des Rekombinationssystems:	
Erzeugung und Charakterisierung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV	111
3.3.1 Etablierung eines <i>in vivo</i> RNA-Rekombinationssystems für KSPV	111
3.3.2 Biologische Klonierung und Genomanalyse des rekombinanten zp KSPV CP G1	113
3.3.3 Eigenschaften von CP G1 auf verschiedenen Zelllinien	116
3.3.4 Wachstumskinetik von CP G1.....	118
3.3.5 NS3-Expression von CP G1	118
3.3.6 Eignung von CP G1 für Serumneutralisationstests	120
3.3.7 Genetische Stabilität von CP G1	122
4. DISKUSSION	128
4.1 Entwicklung und Charakterisierung eines <i>in vivo</i> RNA-Rekombinationssystems für BVDV	128
4.2 Mechanistische Studien zur RNA-Rekombination <i>in vivo</i>	132
4.3 Gezielte Anwendung des Rekombinationssystems:	
Erzeugung und Charakterisierung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV	142
5. ZUSAMMENFASSUNG	148
6. SUMMARY	151
7. LITERATURVERZEICHNIS	153
8. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	168
9. PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE UND POSTER	170
10. DANKSAGUNG	171

1. Einleitung

1.1 RNA-Rekombination

1.1.1 Definition und biologische Bedeutung der RNA-Rekombination

RNA-Rekombination führt zum Austausch genetischer Information durch kovalente Verbindung zweier parentaler RNA-Moleküle zu einer neuen, rekombinanten Ribonukleinsäure. Dadurch stellt RNA-Rekombination einen wichtigen Mechanismus dar, der neben dem Auftreten von Punktmutationen oder dem genomischen „Reassortment“ segmentierter Genome (Desselberger et al., 1978) zu Erbgutveränderungen von Viren führen kann (Dolja & Carrington, 1992, Strauss & Strauss, 1988, Worobey & Holmes, 1999). Es wird dabei zwischen homologer Rekombination (zwischen parentalen RNA-Sequenzen, die zumindest in den beteiligten Bereichen identisch oder sehr ähnlich sind) und nicht homologer Rekombination (zwischen verschiedenen parentalen RNA-Sequenzen, z.B. viraler und zellulärer RNA) unterschieden. Die Rekombination kann zwischen zwei Bereichen desselben RNA-Moleküls (intramolekular) oder zwischen zwei separaten RNA-Molekülen (intermolekular) erfolgen. RNA-Rekombination wurde für Vertreter verschiedener Familien von Plusstrangviren beschrieben (Agol, 1997, King et al., 1987, Lai, 1992, Meyers & Thiel, 1996, Nagy & Simon, 1997, Strauss & Strauss, 1994), kommt aber auch bei RNA-Viren mit einem Genom negativer Polarität vor (Khatchikian et al., 1989). Durch teils sehr detaillierte Studien wurde RNA-Rekombination für einige bei Bakterien (z.B. Q β -Phage; Munishkin et al., 1988), Pflanzen (z.B. Carmovirus, Tombusvirus, Bromovirus; Bujarski & Kaesberg, 1986, Cascone et al., 1993), Tier und Mensch (Coronaviren, Alphaviren, Aphotovirus, Poliovirus; Cooper, 1977, Jarvis & Kirkegaard, 1992, Keck et al., 1987, King et al., 1982, Kirkegaard & Baltimore, 1986, Ledinko, 1963, Makino et al., 1986, Raju et al., 1995) vorkommende Viren erforscht. RNA-Rekombination

1. Einleitung

trägt zu einer erhöhten genetischen Plastizität bei und kann dadurch zu einer Änderung der Virulenz von rekombinanten Viren führen. Die Pathogenese von Erkrankungen viraler Genese wird dabei maßgeblich beeinflusst (Becher et al., 2001b, Khatchikian et al., 1989, Vennema et al., 1998). Auch von der Entstehung neuer rekombinanter Virusspezies durch RNA-Rekombination wurde berichtet (Hahn et al., 1988, Herrewegh et al., 1998). Andererseits ist dem Phänomen der RNA-Rekombination eine wichtige Rolle in der Konservierung großer viraler Genome beizumessen, da während der RNA-Synthese auftretende Punktmutationen sowie genomische Deletionen repariert werden können (King et al., 1987, Lai, 1992, Nagy & Simon, 1997). Für manche RNA-Viren schließlich stellt RNA-Rekombination einen essentiellen Schritt des viralen Lebenszyklus dar. So können bei Vertretern der Ordnung *Nidovirales* erst nach diskontinuierlicher Transkription während der viralen Minusstrangsynthese subgenomische virale mRNAs zur Translation bereitgestellt werden (Sethna et al., 1989). Vertreter der Familie *Orthomyxoviridae* wiederum mobilisieren durch virale Nichtstrukturproteine die 5'-cap-Struktur zellulärer mRNAs, um sie nach Transkriptionsinitiation in virale mRNAs zu integrieren (Lamb & Krug, 2001).

1.1.2 Putative Mechanismen der RNA-Rekombination

Für die Entstehung rekombinanter RNA-Moleküle wurden im wesentlichen zwei Modelle vorgeschlagen: Ein replikativer „template switch“ der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase oder die nicht replikative Spaltung und Ligation von RNA („breakage and ligation“). Zahlreiche Studien an verschiedenen Virussystemen weisen darauf hin, dass die Generierung rekombinanter RNA-Moleküle auf einen replikativen „template switch“ zurückzuführen ist (Figlerowicz et al., 1998, Jarvis & Kirkegaard, 1992, Kirkegaard & Baltimore, 1986, Nagy et al., 1998, Pilipenko et al., 1995). Das „template switch“-Modell postuliert, dass

1. Einleitung

während der viralen Replikation die neu generierte „nascent“-RNA zusammen mit dem viralen Replikationskomplex von der parentalen Matrize, der Donor-RNA, abdissoziiert. An derselben oder einer anderen parentalen RNA, der Akzeptor-RNA, kann der Replikationskomplex mit der „nascent“-RNA reassoziieren, wodurch nach Reinitiation der RNA-Synthese ein rekombinantes virales RNA-Molekül entsteht (Abb. 1). Durch *in vitro*-Studien konnte die Fähigkeit zum „template switch“ für mehrere virale RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRp) wie z. B. der von Poliovirus, „Brome Mosaic“-Virus und BVDV bewiesen werden (Arnold & Cameron, 1999, Duggal et al., 1997, Kim & Kao, 2001). Eine Besonderheit stellt die Rekombination bei Retroviren dar, der ein „template switch“ der retroviralen reversen Transkriptase während des Umschreibens des viralen RNA-Genoms in ein DNA-Intermediat der viralen Replikation, dem Provirus, zugrundeliegt. Durch reverse Transkription kann so ein rekombinantes Provirus entstehen. Rekombinante retrovirale RNA-Genome werden erst im Verlauf der sich an die Integration des Provirus ins Wirtszellgenom anschließenden Schritte der viralen Replikation transkribiert (Goff, 2001).

In neuester Zeit wurde durch einige Studien über RNA-Rekombination bei Q β -Phage und Poliovirus aber auch ein replikationsunabhängiger Mechanismus nahegelegt (Chetverin, 1997, Chetverina et al., 1999, Gmyl et al., 1999). Dieses „breakage and ligation“ beinhaltet den Bruch oder die enzymatische Spaltung einer oder beider parentaler RNAs, die anschließend zu einem rekombinanten Molekül ligiert werden (Abb. 2). In diesem Zusammenhang wurde die Möglichkeit erwogen, dass die parentalen RNA-Moleküle selbst die intrinsische Aktivität eines kryptischen Ribozyms besitzen könnten, doch kommen auch zelluläre Enzyme wie RNasen und Ligasen für einen nicht replikativen Mechanismus der RNA-Rekombination in Betracht. Allerdings konnte die Detektion einzelner rekombinanter RNA-Moleküle auch in diesen Studien erst nach Amplifikation

1. Einleitung

durch die virale RdRp (Q β -Phage) oder zumindest in Anwesenheit eines vollständigen RdRp-Gens (Poliovirus) erfolgen; dies stellt ein grundsätzliches Problem für den Nachweis von replikationsunabhängiger RNA-Rekombination dar.

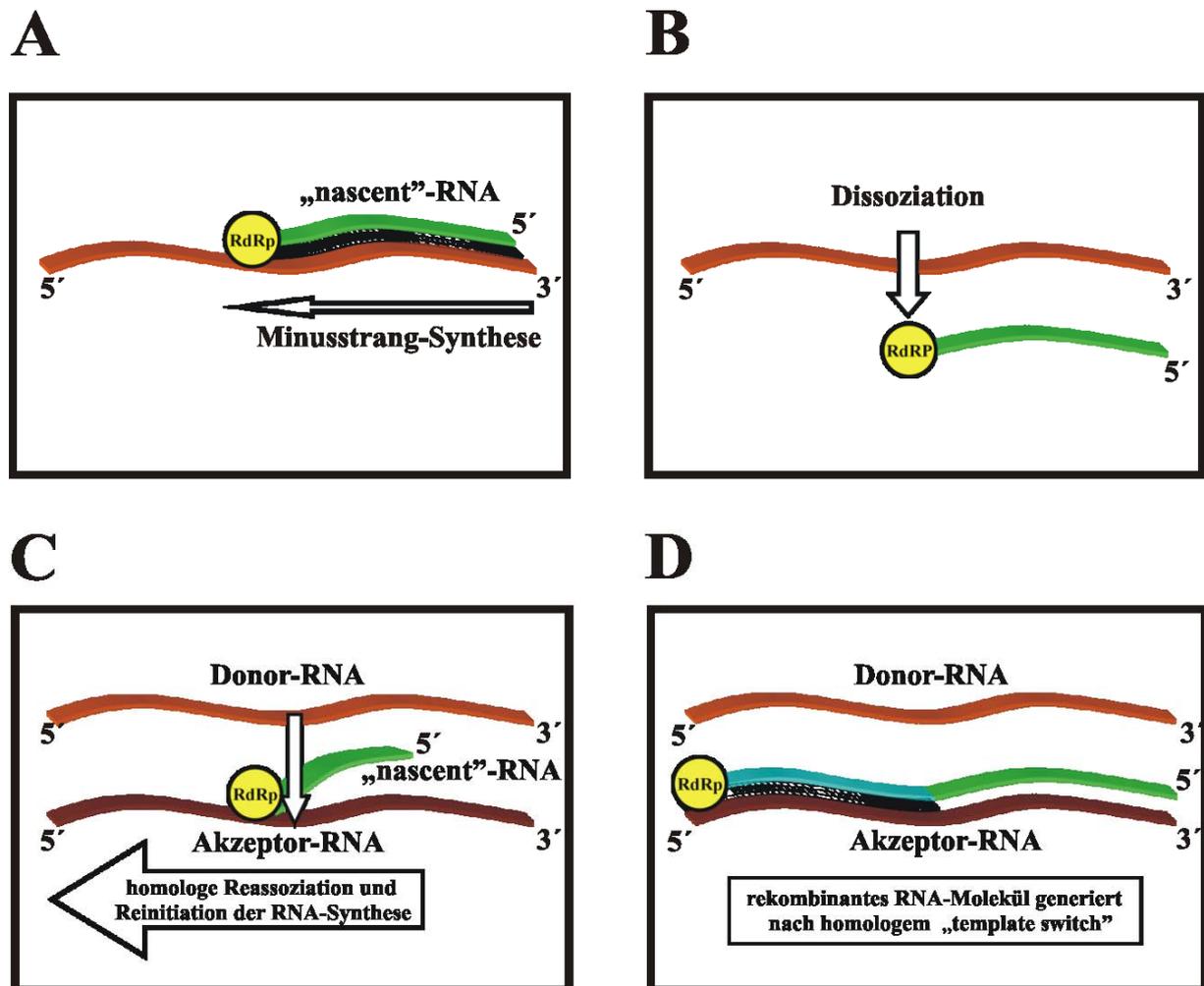


Abb. 1 : Das „template switch“-Modell für RNA-Rekombination

(A) Am 3'-Ende des Genoms eines Plusstrang-RNA-Virus (braun) wird nach Formierung eines Replikationskomplexes (gelb) durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) die Minusstrangsynthese initiiert („nascent“-RNA; grün).

(B) Der Replikationskomplex kann zusammen mit der entstehenden („nascent“-) RNA von der ersten Matrize („template“), der Donor-RNA, abdissoziieren.

(C) Nach Reassoziierung des Replikationskomplexes mit zugehöriger „nascent“-RNA an homologer Stelle einer zweiten Matrize, der Akzeptor-RNA, wird die Minusstrangsynthese reinitiiert.

(D) Als Resultat dieses rezeptiven Prozesses entsteht ein rekombinantes RNA-Molekül nach homologem „template switch“.

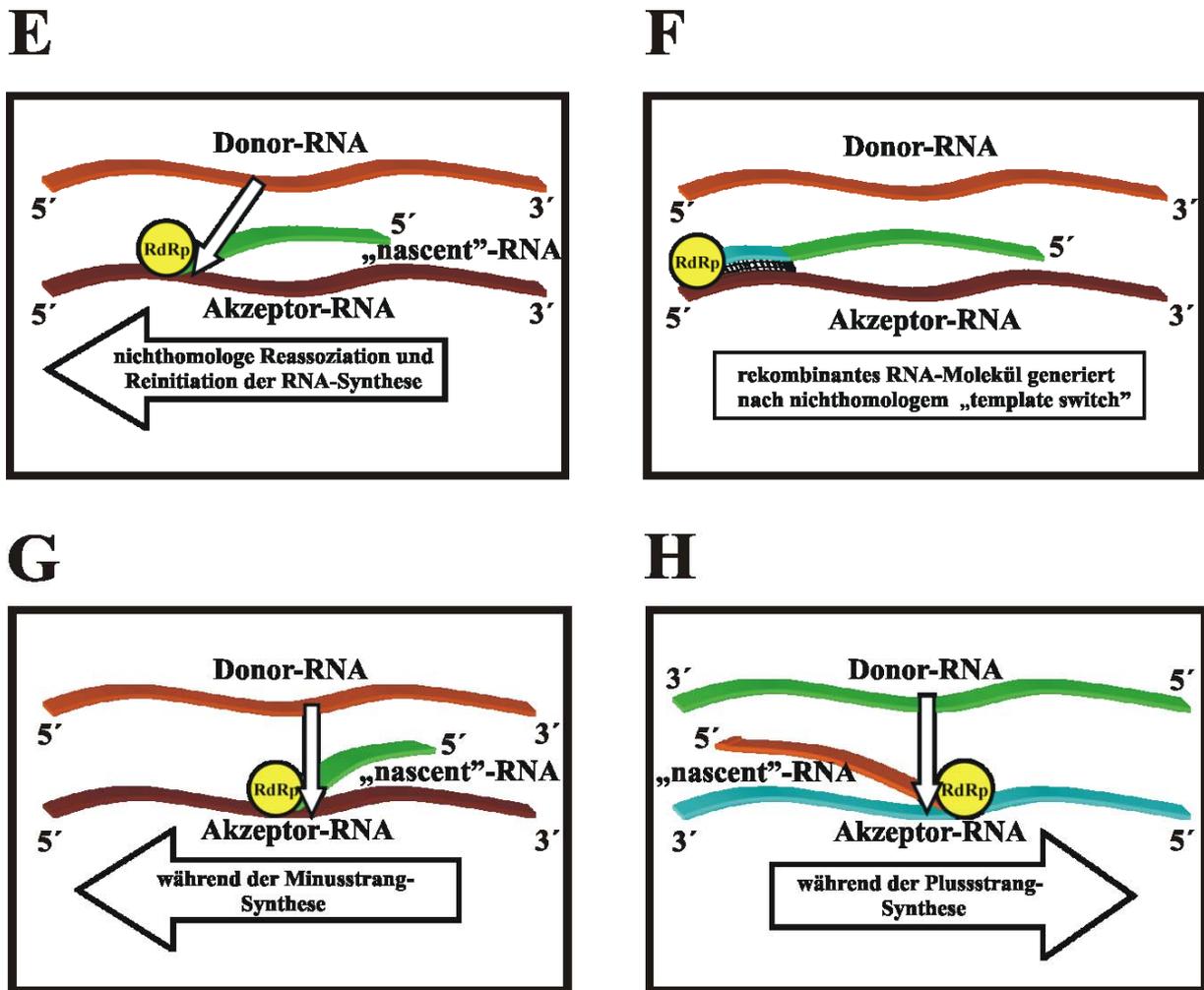


Abb. 1: Das „template switch“-Modell für RNA-Rekombination (Fortsetzung)

(E) Die Reassoziierung des Replikationskomplexes mit zugehöriger „nascent“-RNA an der Akzeptor-RNA kann im Hinblick auf den Dissoziationsort von der Donor-RNA auch an nicht homologen Sequenzen erfolgen.

(F) Nach Reinitiation der RNA-Synthese entsteht ein rekombinanter Minusstrang nach nicht homologem „template switch“.

(G) Ein „template switch“ kann nicht nur während der Minusstrangsynthese erfolgen, sondern (H) auch während der Plusstrangsynthese.

1. Einleitung

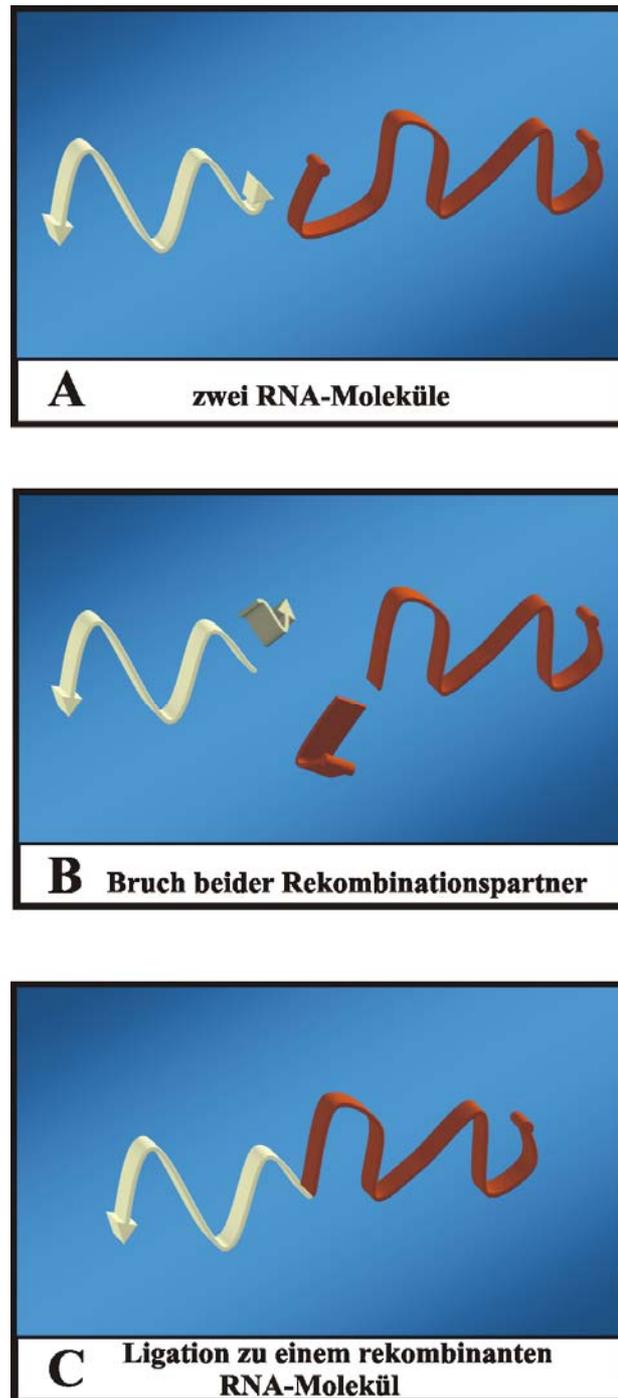


Abb. 2: Das „breakage and ligation“- Modell für RNA-Rekombination

(A) Bei zwei zueinander homologen oder nicht homologen RNA-Molekülen kann es
(B) thermisch oder enzymatisch zum Bruch oder zur Spaltung eines oder beider
Rekombinationspartner kommen, die
(C) durch Ligation zu einem rekombinanten RNA-Molekül neu zusammgefügt werden. Die
beteiligten parentalen RNA-Paare können dabei von positiver oder negativer Polarität sein.

1.1.3 RNA-Rekombination beeinflussende Faktoren

Für nicht replikative wie replikative RNA-Rekombination kann postuliert werden, dass die Häufigkeit der Rekombination von der Menge der beteiligten RNA-Moleküle abhängt (Agol, 1997). Replikative RNA-Rekombination kann während der Synthese von Plus- oder Minusstrang-RNA stattfinden (Abb. 1, Fortsetzung). Da die aus der Replikation von Plusstrang-RNA-Viren resultierende Konzentration an viralen Plussträngen höher als die der Minusstränge ist, wurde nahegelegt, dass replikative RNA-Rekombination häufiger während der Minusstrang-Synthese erfolgt als während der Plusstrang-Synthese (Agol, 1997, Jarvis & Kirkegaard, 1992, Kirkegaard & Baltimore, 1986, Lai, 1992). Analog kann für nicht replikative RNA-Rekombination angenommen werden, dass sie häufiger zwischen den hauptsächlich vorhandenen Plussträngen stattfindet. Diese Vermutungen werden zudem durch die Annahme unterstützt, dass virale Minusstrang-RNA überwiegend als Bestandteil replikativer Intermediate vorliegt und somit für nicht replikative Rekombinationsprozesse wahrscheinlich nicht zugänglich ist.

Mehrere Studien legen für verschiedene RNA-Viren nahe, dass eine lokale Basenpaarung zwischen „nascent“- und Akzeptor-RNA den replikativen „template switch“ sowohl bei homologer als auch bei nicht homologer RNA-Rekombination erleichtert (Abb. 3; Becher et al., 1999a, Li & Ball, 1993, Nagy & Bujarski, 1995, Nagy & Simon, 1997, White & Morris, 1994).

Desweiteren wurde gezeigt, dass auch eine Ausbildung von antiparallelen Heteroduplexstrukturen zwischen zueinander inversen Sequenzabschnitten der parental Moleküle die RNA-Rekombination begünstigen kann (Figlerowicz, 2000, Nagy & Bujarski, 1993, Romanova et al., 1986). Dabei könnte allerdings sowohl ein replikativer als auch ein nicht replikativer Mechanismus zugrunde liegen (Abb. 4). Es wurden auch Sequenzmotive beschrieben, die entweder über ein Pausieren der viralen Transkription am Donor (z.B. durch einen erhöhten AU-

1. Einleitung

Gehalt oder die Ausbildung starker Sekundärstrukturen) oder eine forcierte Reinitiation der viralen RNA-Synthese am Akzeptor (durch Anwesenheit viraler promotorähnlicher Sequenzen) replikative RNA-Rekombination begünstigen (Nagy & Bujarski, 1997, Nagy et al., 1999).

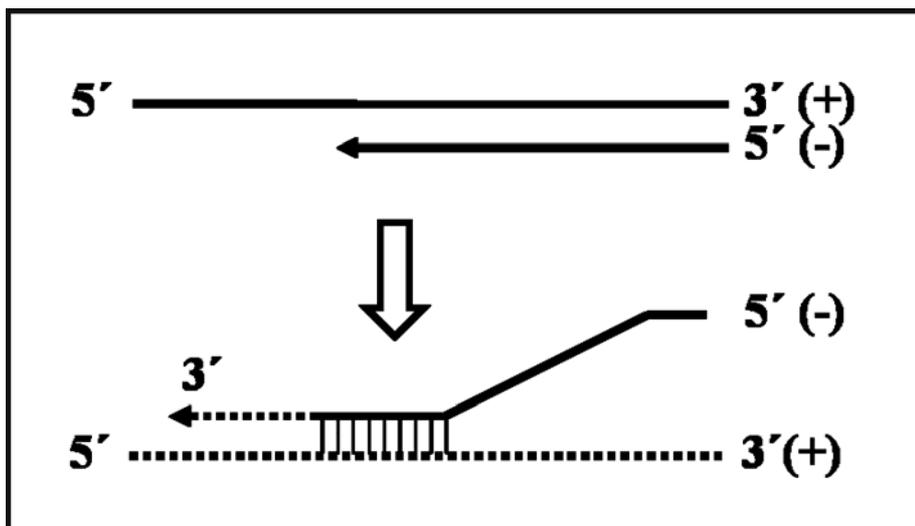


Abb. 3: Basenpaarung begünstigt den replikativen „template switch“

Während der Replikation eines viralen Plusstranggenoms (oben, +) kann der entstehende Minusstrang (darunter, -) zusammen mit dem viralen Replikationskomplex (nicht angezeigt) von der parentalen RNA abdissoziieren (senkrechter Pfeil; s. auch Abb. 1). Eine antiparallele Basenpaarung (vertikale Striche) zwischen der „nascent“-RNA (unten, -) und der Akzeptor-RNA (unten, gepunktete Linie, +) erleichtert die Reassoziierung des Replikationskomplexes am zweiten parentalen RNA-Molekül. Im Anschluss erfolgt die Reinitiation der RNA-Synthese (obere gepunktete Linie) zu einer rekombinanten viralen Minusstrang-RNA.

1. Einleitung

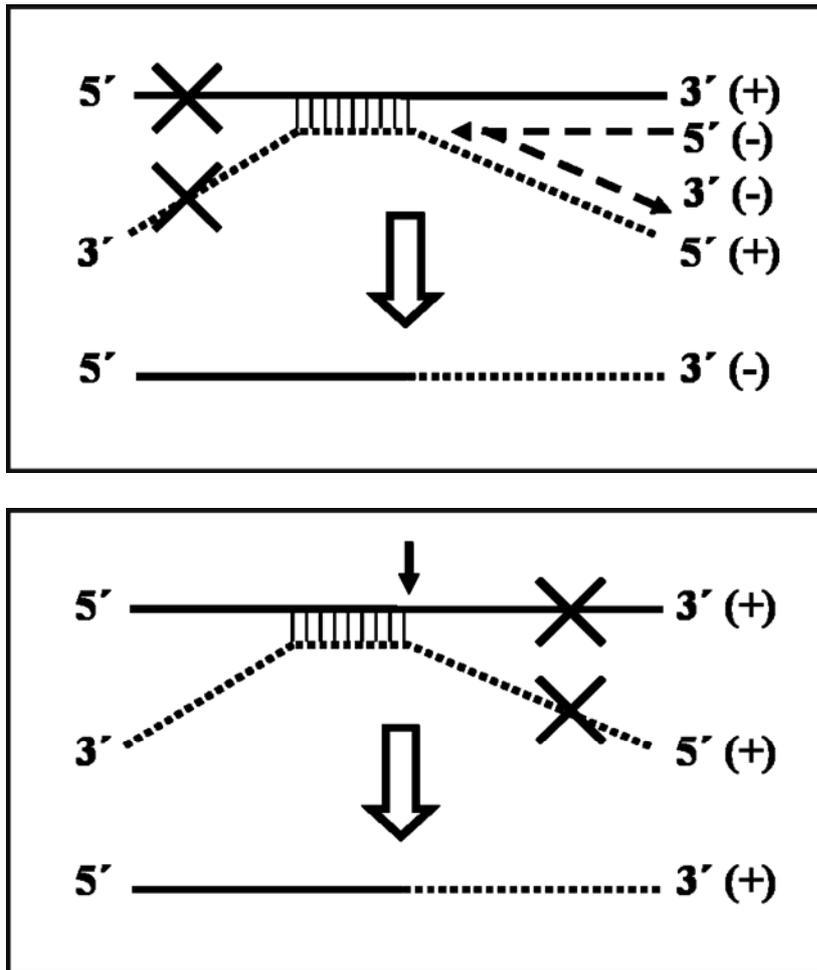


Abb. 4: Heteroduplexstrukturen können replikative und nicht replikative RNA-Rekombination begünstigen

Oben: Die Ausbildung einer Heteroduplexstruktur kann replikative RNA-Rekombination begünstigen. Durch antiparallele Basenpaarung (vertikale Striche) zwischen den zwei beteiligten parental RNA-Molekülen von hier positiver Polarität (oben, durchgezogene Linie, +; Mitte, gepunktete Linie, +) bildet sich eine stabilisierende Heteroduplexstruktur aus. Während der am 3'-Ende des ersten Partners initiierten Minusstrangsynthese kann es bei Erreichen der basengepaarten Region zu einem „template switch“ zum zweiten Partner kommen (gestrichelte Linie, -). Es resultiert (senkrechter Blockpfeil) ein rekombinanter viraler Minusstrang (unten, -). Sequenzen, die zu den durch X markierten komplementär sind, werden nicht in das rekombinante RNA-Molekül integriert.

Unten: Die Ausbildung einer Heteroduplexstruktur könnte auch nicht replikative RNA-Rekombination begünstigen. Durch antiparallele Basenpaarung (vertikale Striche) zwischen den zwei beteiligten parental RNA-Molekülen positiver Polarität (oben, durchgezogene Linie, +; Mitte, gepunktete Linie, +) bildet sich eine Heteroduplexstruktur aus. Nach Bruch oder Spaltung der parental RNAs (senkrechter Pfeil) resultiert (senkrechter Blockpfeil) nach Ligation der verbleibenden und durch Basenpaarung miteinander verbundenen Sequenzen ein rekombinanter viraler Plusstrang (unten, +). Sequenzen, die durch X markiert sind, werden dabei nicht in das rekombinante RNA-Molekül integriert.

1.2 Pestiviren

1.2.1 Taxonomie, Morphologie, Genomaufbau und Biotypen

Gemäß derzeit gültiger Nomenklatur enthält das Genus *Pestivirus* folgende Spezies: (I) Das Virus der bovinen Virusdiarrhö 1 (BVDV-1), (II) BVDV-2, (III) das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) und (IV) das „Border Disease“-Virus des Schafes (BDV) (Becher & Thiel, 2002, Heinz et al., 2000). Ein Virusisolat aus der Giraffe wurde vorläufig als fünfte Spezies aufgenommen (Avalos-Ramirez et al., 2001, Heinz et al., 2000). Auf Grund von Ähnlichkeiten in Genomorganisation und Strategie der Genexpression wurden die Genera *Flavivirus* (beinhaltet z.B. das Gelbfieberevirus und das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis), *Hepacivirus* (Hepatitis-C-Viren) und *Pestivirus* zu der Virusfamilie *Flaviviridae* zusammengefasst (Abb. 5; Heinz et al., 2000).

Pestiviren sind mit einem Durchmesser von 40–60 nm relativ kleine, behüllte Viren. Die Lipidhülle beinhaltet die viralen Glykoproteine und umschließt das wahrscheinlich ikosahedrale Kapsid. In dessen Inneren liegt das aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität bestehende virale Genom von ungefähr 12,3 Kilobasen (kb) Länge. Das virale Erbgut trägt weder eine cap-Struktur noch ist es polyadenyliert. Es enthält einen offenen Leserahmen (ORF), der von 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert wird (Avalos-Ramirez et al., 2001, Becher et al., 1998, Collett et al., 1988, Meyers et al., 1989a, 1996c, Ridpath & Bolin, 1995). Letztere beinhalten wichtige *cis*-aktive Signale für die virale Translation, Transkription und Replikation. Die Initiation der Translation am Ribosom wird durch ein in der pestiviralen 5'NTR gelegenes IRES-Element vermittelt (Lemon & Honda, 1997, Pestova et al., 1998, Poole et al., 1995, Rijnbrand et al., 1997). Der ORF kodiert für ein virales Polyprotein von ungefähr 3900 Aminosäuren (aa), das co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in die reifen viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine prozessiert wird.

1. Einleitung

Am N-Terminus des Polyproteins folgen auf das Nichtstrukturprotein N^{pro}, einer viralen Autoprotease, die viralen Strukturproteine: Das Kapsidprotein C und die viralen Glykoproteine E^{rns} (rns = Ribonukleaseaktivität), E1 und E2 (Thiel et al., 1991). Pestivirales E2 und in geringerem Maße auch E^{rns} können im infizierten Wirt die Bildung neutralisierender Antikörper induzieren (Weiland et al., 1992, Weiland et al., 1990). Im Polyprotein folgen auf die Strukturproteine die Nichtstrukturproteine (NS) p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. NS3 bis NS5B sind essentielle Bestandteile des viralen Replikationskomplexes, wobei NS5B die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) darstellt (Abb. 5; Übersichtsartikel siehe Lindenbach & Rice, 2001, Meyers & Thiel, 1996).

Anhand ihrer Fähigkeit, in empfänglichen Gewebekulturzellen einen zytopathischen Effekt (ZPE) hervorzurufen, wird bei Pestiviren ein zytopathogener (zp) Biotyp von einem nicht zytopathogenen (nzp) Biotyp unterschieden (Gillespie et al., 1960a, Gillespie et al., 1960b, Lee & Gillespie, 1957). Im Gegensatz zu mit nzp Pestiviren infizierten Zellen exprimieren mit zp Pestiviren infizierte Zellen in späten Phasen der Infektion große Mengen an freiem NS3, dem C-terminalen Abschnitt von NS2-3 (Abb. 5, Abb. 6; Lackner et al., 2004). NS3, das eine Serinprotease- und Helikaseaktivität besitzt, stellt somit ein Markerprotein für zp Pestiviren dar (Meyers & Thiel, 1996).

1.2.2 Wirtsspektrum von Pestiviren und Pathogenese von Pestivirus-induzierten Krankheiten

Pestiviren infizieren ausschließlich Paarhufer. KSPV konnte bislang unter natürlichen Bedingungen nur aus Haus- oder Wildschweinen isoliert werden. Im Gegensatz dazu ist die Wirtsspezifität der ruminanten Pestiviren BDV, BVDV-1 und BVDV-2 weniger stark ausgeprägt. So wurden BVD-Viren unter natürlichen

1. Einleitung

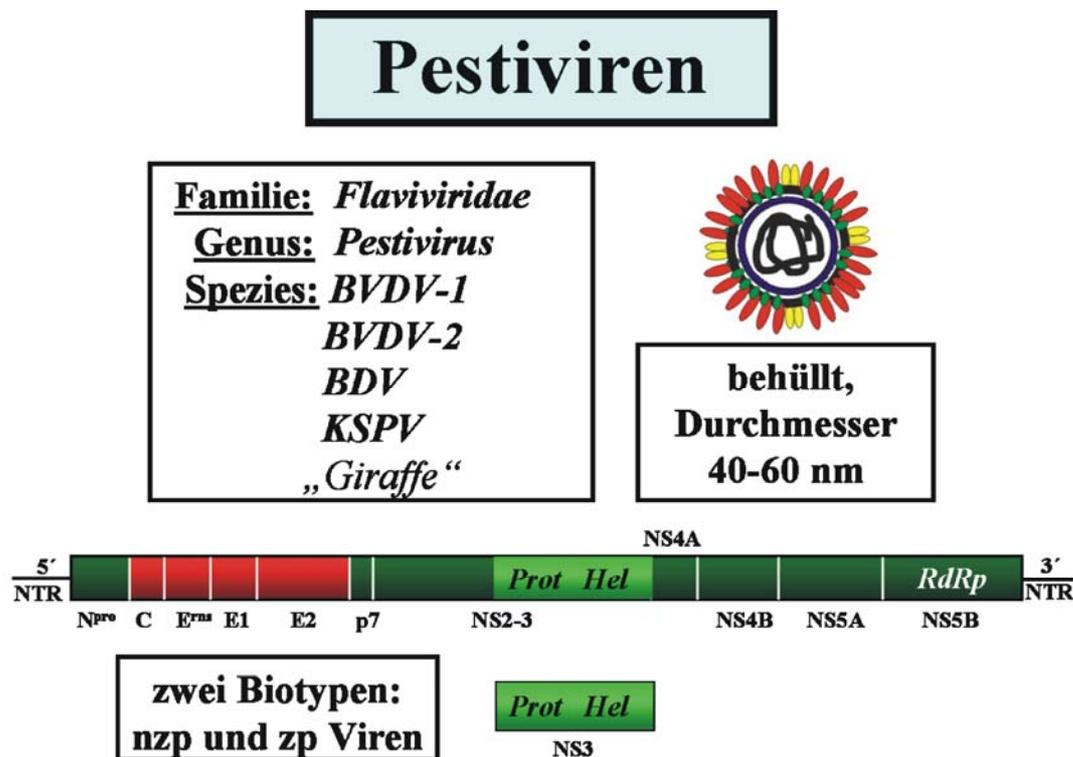


Abb. 5: Taxonomie, Morphologie, Genomaufbau und Biotypen von Pestiviren

Pestiviren gehören zur Familie der *Flaviviridae*. Das Genus umfasst als wichtige Tierseuchenerreger bei Paarhufern das Virus der bovinen Virusdiarrhöe 1 (BVDV-1), BVDV-2, das Virus der „Border Disease“ des Schafes (BDV), das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) und als taxonomisch neu eingeordnete Spezies das Wildtierisolat „Giraffe“.

Pestiviren sind pleomorphe, kleine, behüllte Partikel mit einem Durchmesser von 40-60 nm, in deren Innerem das virale Genom in einem putativen ikosaedralen Kapsid verpackt vorliegt.

Das virale Genom, eine einzelsträngige RNA von positiver Polarität, weist keine cap-Struktur am 5'-Ende auf und ist am 3'-Ende nicht polyadenyliert. Es enthält einen offenen Leserahmen (ORF), der von zwei nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert wird, die für die virale Replikation und Translation essentielle *cis*-aktive Elemente enthalten. Der ORF kodiert für ein Polyprotein von ungefähr 3900 Aminosäuren (aa), das co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen zu den Struktur- und Nichtstrukturproteinen prozessiert wird. Die Strukturproteine (rot) umfassen das Kapsidprotein C sowie die viralen Glykoproteine E^{pro}, E1 und E2; die Nichtstrukturproteine (NS, grün) beinhalten die Autoprotease N^{pro} sowie p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase; RdRp).

Abhängig von der Ausbildung eines zytopathischen Effekts werden nach Infektion empfänglicher Gewebekulturzellen bei Pestiviren ein nicht zytopathogener (nzp) und ein zytopathogener (zp) Biotyp unterschieden. Der zp Biotyp korreliert mit einer vermehrten Expression von freiem NS3 (hellgrün). NS3 besitzt eine Serinprotease- (Prot) und Helikaseaktivität (Hel).

Bedingungen außer vom Rind auch aus Schaf, Ziege, Schwein und Wildwiederkäuerarten isoliert (Becher et al., 1999b, Becher et al., 1997, Nettleton,

1. Einleitung

1990). Die Nomenklatur der Pestiviren resultiert von der Wirtsspezies, aus der sie zuerst isoliert wurden und den dabei beobachteten Krankheitssymptomen. Bei BVDV verläuft die virämische Infektion von immunkompetenten, seronegativen Rindern meist subklinisch oder unter milden Erkrankungserscheinungen (Baker, 1987, Pritchard, 1963). Sie induziert eine Immunsuppression und Leukopenie, wobei im Hinblick auf klinische Ausprägung Diarrhö, Fieber, Depression, Anorexie, vermehrter Sekretausfluss aus Nase oder Augen, Schleimhautveränderungen am Flotzmaul sowie Fruchtbarkeitsstörungen und respiratorische Symptome hinzukommen können (Baker, 1987, Potgieter et al., 1985). Durch die Entwicklung einer spezifischen Immunität wird die Infektion in der Regel aber rasch beendet. Eine Sonderform stellt die Infektion mit hoch virulenten BVDV-Stämmen dar, die mit schwerer Diarrhö, respiratorischen Symptomen und/oder einem hämorrhagischen Syndrom einhergehen kann und oft letal verläuft (Corapi et al., 1990b, Pellerin et al., 1994, Rebhuhn et al., 1989).

Bei trächtigen Tieren kann es zu einer diaplazentaren Infektion der Frucht kommen, die in Abort, Totgeburt, Missbildungen oder der Geburt lebensschwacher Kälber resultieren kann (Baker, 1987, Casaro et al., 1971, Kahrs, 1973). Nach Infektion mit nzp BVDV kann sich zwischen dem 40. und dem 120. Tag der Trächtigkeit eine persistierende Infektion im zu diesem Zeitpunkt noch nicht immunkompetenten Fötus etablieren. Die geborenen Kälber sind dann persistent infiziert (PI-Tier) und scheiden lebenslang Virus in großer Menge aus. Sie bleiben dabei häufig im Wachstum zurück, können aber auch klinisch unauffällig bleiben (Abb. 6; Coria & McClurkin, 1978). „Mucosal Disease“ (MD) ist eine besonders schwere Verlaufsform der Infektion mit BVDV und tritt bei PI-Tieren meist im Alter von 6 bis 24 Monaten auf. Die Erkrankung geht mit Fieber, Anorexie, schweren Ulzerationen und Nekrosen der Schleimhäute sowie der lymphatischen Organe des Verdauungstrakts einher und führt über unstillbare, oft blutige

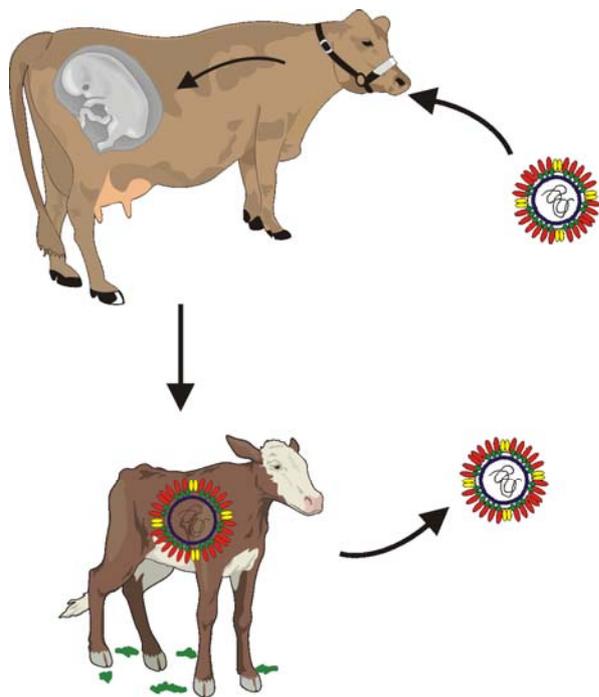
1. Einleitung

Durchfälle nach wenigen Tagen zum Tode (Brownlie et al., 1984). Interessanterweise lässt sich aus einem an MD erkrankten Tier immer ein Paar aus einem nzp BVDV und einem zp BVDV isolieren, die antigenetisch meist eng miteinander verwandt sind (Abb. 6; McClurkin et al., 1985).

BDV verursacht bei Schafen und Ziegen zumeist subklinisch verlaufende oder unter milden Symptomen wie Diarrhö einhergehende Infektionen, kann aber auch zu Fruchtbarkeitsstörungen führen. Eine diaplazentare Infektion des Fötus kann bei tragenden Tieren zum Abort, zu Missbildungen der Frucht oder zur Geburt lebensschwacher, persistent infizierter Lämmer führen (Nettleton, 1990, Terpstra, 1981). In Analogie zu Infektionen mit BVDV beim Rind wurde ein MD-ähnliches Krankheitssyndrom beobachtet, das offenbar nur selten vorkommt (Nettleton et al., 1992).

Infektionen mit KSPV können abhängig von der Virulenz des entsprechenden Stamms mit hoher Morbidität und Letalität einhergehen und dabei Fieber und Hämorrhagien in Haut, inneren Organen und Schleimhäuten auslösen sowie Anorexie, Diarrhö und zentralnervöse Störungen verursachen. Auch sind Fruchtbarkeitsstörungen, diaplazentare Infektionen und die Geburt persistent infizierter Tiere von erheblicher Bedeutung. Ein an MD erinnerndes Krankheitssyndrom konnte bei PI-Tieren allerdings nicht beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass durch staatliche Bekämpfungsmaßnahmen selektiv KSPV-Stämme von hoher Virulenz zurückgedrängt wurden. Entsprechend führen KSPV-Stämme, die von neueren Ausbrüchen in Europa isoliert wurden, in den meisten Fällen eher zu chronischen Formen der Erkrankung mit weniger charakteristischen Symptomen (Floegel-Niesmann et al., 2003).

1. Einleitung



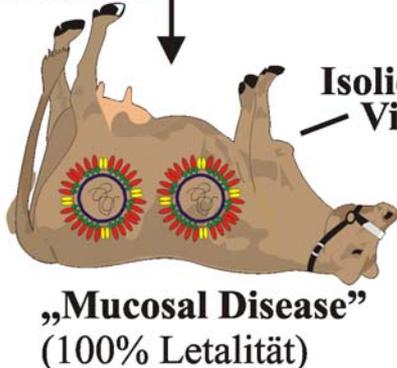
Infektion einer trächtigen Kuh
mit **nzp BVDV**
⇒ Virämie (Muttertier)

⇒ **diaplazentare Infektion**
40. - 120. Tag der Trächtigkeit
⇒ **persistierende Infektion**
⇒ **erworbene Immuntoleranz**

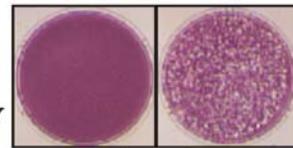
persistent infiziertes Kalb
(PI-Tier)

kann klinisch unauffällig sein

spontanes
Auftreten



nzp
BVDV



zp
BVDV

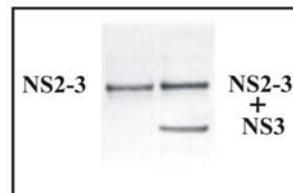


Abb. 6: Pathogenese der „Mucosal Disease“ und Isolierung von zytopathogenen Viren

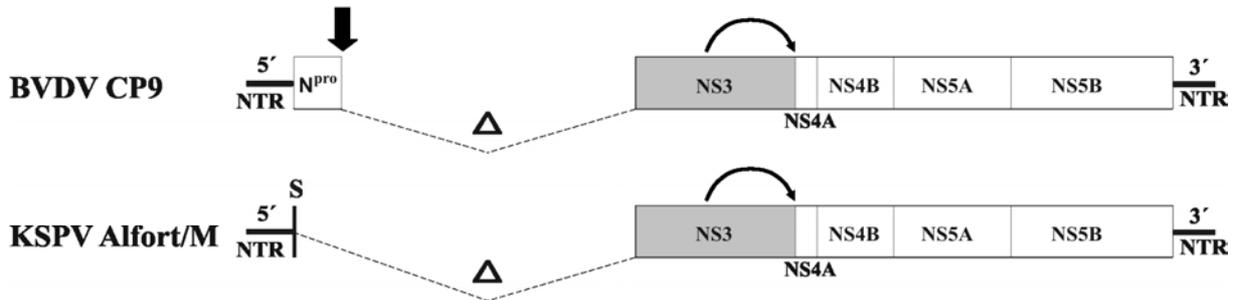
Im Verlauf der Infektion einer trächtigen Kuh mit nzp BVDV kann es ausgehend von einer Virämie des Muttertiers zu einer diaplazentaren Infektion des Fötus kommen. Zwischen dem 40. und dem 120. Tag der Trächtigkeit ist die Etablierung einer persistierenden Infektion im Fötus möglich. Solche Föten entwickeln eine Immuntoleranz gegenüber nzp BVDV und werden als den Erreger dauerausscheidende Kälber geboren, die im Verlauf ihrer weiteren Entwicklung klinisch unauffällig sein können.

Nur bei persistent mit nzp BVDV infizierten Tieren kann es zum spontanen Auftreten der tödlichen „Mucosal Disease“ kommen. Aus solchen Patienten lässt sich immer ein Viruspaar aus einem nzp und einem dazu antigenetisch meist eng verwandten, die Krankheit auslösenden zp BVDV isolieren. Durch Immunoblotanalysen des Lysats von BVDV-infizierten Zellen (rechts unten) lässt sich die Expression von ungespaltenem NS2-3 und in späten Phasen der Infektion nur bei zp BVDV auch von freiem NS3, dem Markerprotein für pestivirale Zytopathogenität, darstellen. Modifiziert nach Becher et al., 2001a. Quelle s. S. 169.

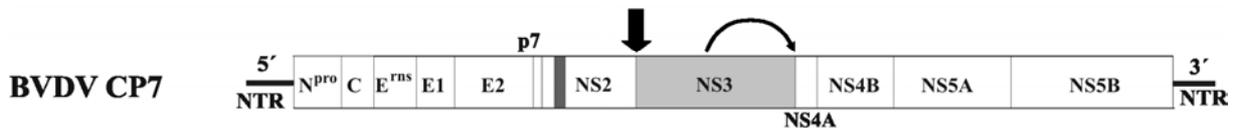
1.2.3 RNA-Rekombination bei Pestiviren

Die Tatsache, dass sich die aus einem Tier mit MD stammenden zp und nzp Virusstämme antigenetisch meist nicht oder kaum unterscheiden, ist unter Berücksichtigung der im Allgemeinen hohen antigenetischen Variabilität von BVDV äußerst bemerkenswert. Dies legte die Vermutung nahe, dass das zp Virus aus dem nzp Virus durch Mutation im PI-Tier hervorgeht (Corapi et al., 1988, Howard et al., 1987). In der Tat konnte durch molekulare Charakterisierung der Genome solcher Viruspaare diese Hypothese verifiziert werden. Dabei stellte sich heraus, dass der bei weitem größte Teil der zp BVDV-Stämme aus entsprechenden nzp Viren im PI-Tier durch nicht homologe RNA-Rekombination entstanden ist (Übersichtsartikel siehe Meyers et al., 1996b). Die Genome solcher zp Pestivirusstämme beinhalten genomische Veränderungen, die Deletionen oder Duplikationen viraler Sequenzen und/oder Insertionen bestimmter zellulärer mRNA-Sequenzen darstellen (Abb. 7; Becher et al., 1996, Meyers et al., 1995). Es wurde weiterhin festgestellt, dass aus einem an MD erkrankten Tier sogar mehrere durch RNA-Rekombination entstandene zp BVDV isoliert werden können (Becher et al., 1999a, Becher et al., 2001b, Fricke et al., 2001). Durch die experimentelle Erzeugung von MD im PI-Tier konnte bewiesen werden, dass eine Überinfektion mit einem antigenetisch eng verwandten zp Virus krankheitsauslösend ist (Bolin et al., 1985, Brownlie & Clarke, 1993, Brownlie et al., 1984). Auch die Auslösung von MD nach RNA-Rekombination zwischen dem persistierenden nzp BVDV und einem heterologen zp BVDV-Impfvirus ist mittlerweile belegt (Becher et al., 2001b). Allerdings beschränkt sich das Vorkommen von zp pestiviralen Genomen nicht auf BVDV, sondern es konnten auch KSPV- und BDV-Stämme mit zp Biotyp isoliert werden. Neben der hauptsächlichen Bedeutung von RNA-Rekombination für das Entstehen von zytopathogenen Pestiviren konnte in einem Fall auch gezeigt werden, dass das Auftreten bestimmter Punktmutationen für das Entstehen eines zp

A. Deletion viraler Sequenzen



B. Insertion viraler Sequenzen



C. Insertion zellulärer Sequenzen

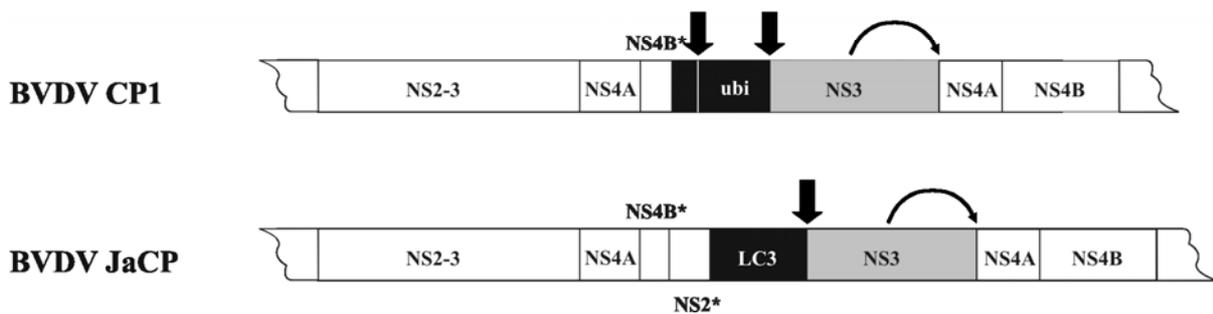


Abb. 7: Genomaufbau und NS3-Entstehung bei zp Pestiviren

Nicht homologe RNA-Rekombination kann zur Entstehung von zp Pestivirus-Genomen führen. Beispiele:

(A) Eine Deletion viraler Sequenzen (Δ) verursacht bei BVDV CP9 im resultierenden Polyprotein eine Verschiebung der C-terminalen Prozessierungsstelle der viralen Autoprotease N^{pro} (senkrechter Pfeil) an den N-Terminus von NS3 (Tautz et al., 1994). Bei dem KSPV-Stamm Alfort/M resultiert eine Deletion in der Fusion des NS3-Gens an das Startkodon (S) des ORFs (Meyers & Thiel, 1995). Beide Deletionen führen nach C-terminaler Abspaltung durch die NS3-Serinprotease (gebogene Pfeile) zur Expression von NS3 (hellgrau), dem Markerprotein für zp Pestiviren.

(B) Bei BVDV CP7 kommt es durch 27 duplizierte Nukleotide im NS2-Gen (dunkelgrauer Balken) posttranslational zur C-terminalen Abspaltung von NS2 (senkrechter Pfeil) und damit zur Expression von NS3 (hellgrau; Tautz et al., 1996).

1. Einleitung

(C) Durch die Insertion zellulärer Sequenzen, die für bestimmte Proteine kodieren (s. Tab.1; hier Ubiquitin (ubi) bzw. ein Fragment von LC3), werden in die resultierenden viralen Polyproteine von BVDV CP1 und BVDV JaCP (Meyers et al., 1991, Meyers et al., 1998) Prozessierungsstellen für zelluläre Proteasen integriert (senkrechte Pfeile; Fricke et al., 2004, Tautz et al., 1993). Dies führt nach C-terminaler Abspaltung durch die NS3-Serinprotease (gebogene Pfeile) zur Expression von NS3 (hellgrau). Die entsprechenden Genome, die außerdem duplizierte virale Sequenzen aufweisen, sind nur ausschnittsweise dargestellt. NS4B*, 5'-Teil der NS4B-kodierenden Region; NS2*, 3'-Teil der NS2-kodierenden Region. Modifiziert nach Becher; Quelle s. S. 169.

BVDV verantwortlich sein kann (Kümmerer et al., 1998, Kümmerer & Meyers, 2000). Obwohl der Zusammenhang zwischen hohem Expressionsniveau des Zytopathogenitätsmarkers NS3 und pestiviral induzierter Apoptose (Zhang et al., 1997) noch nicht aufgeklärt ist, konnte gezeigt werden, dass besagte genomische Veränderungen in zp Pestiviren die genetische Basis für die Expression von NS3 und die damit verbundene pestivirale Zytopathogenität darstellen (Abb. 7; Baroth et al., 2000, Becher et al., 2001b, Becher et al., 2002, Kümmerer & Meyers, 2000, Mendez et al., 1998, Meyers et al., 1996a, Meyers et al., 1996c, Meyers et al., 1998, Moser et al., 1999).

Die bislang in zp Pestiviren identifizierten zellulären mRNA-Insertionen lassen sich entsprechend der Funktionen der von ihnen kodierten zellulären Homologe und durch Sequenzvergleiche in drei Gruppen einteilen (Becher et al., 2002; Tab. 1): Ubiquitin und ubiquitinähnliche Proteine, die Transportproteine LC3, GATE-16 und GABA-RAP und ein Chaperon, das J-Domänen-Protein Jiv (J-Domänen-Protein interagierend mit viralem Protein). Die in zahlreichen Studien belegte Integration zellulärer, kodierender Sequenzen in pestivirale Genome (weitere Beispiele: Qi et al., 1992, Qi et al., 1998, Ridpath & Neill, 2000, Vilcek et al., 2000) stellt abgesehen von der Anwesenheit zellulärer Onkogene in den Genomen transformierender Retroviren eine Besonderheit unter den RNA-Viren dar.

1. Einleitung

Name der Insertion	Anzahl von Stämmen	Lokalisation im viralen Genom	zelluläres Homolog	Funktion des zellulären Homologs
A				
Ubiquitin	>10	direkt vor dem NS3-Gen	Polyubiquitin	Proteindegradation, etc.
S27a-ubi	1 (5)		Ubiquitin-S27a	Degradation/ ribosomales Protein
SMT3B	1		SUMO-1 (SMT3B)	nukleozytoplasmatischer Transport
NEDD8	1	im NS3-Gen	NEDD8 (RUB1)	Regulation des Zellzyklus
B				
LC3	1	direkt vor dem NS3-Gen	LC3	lysosomaler/vacuolärer Transport
GATE-16	1		GATE-16	intra-Golgi-Transport
X604	1		GABA-RAP	Transport des GABA-Rezeptors
C				
Jiv (cINS)	>10 (auch bei BDV)	vor dem NS3-Gen (meistens im NS2-Gen)	J-Domänen-Protein	Chaperon

Tab. 1: Zelluläres Homolog, genomischer Integrationsort und Integrationshäufigkeit von mRNA-Insertionen in zp BVDV-Stämmen

mRNA-Insertionen in zp BVDV-Stämmen, die für folgende Gruppen zellulärer Homologe kodieren (modifiziert nach Becher et al., 2003; Quelle s. S. 169):

- (A) Ubiquitin und ubiquitinähnliche Proteine
- (B) Transportproteine LC3, GATE-16 und GABA-RAP
- (C) J-Domänen-Protein Jiv

Es kann angenommen werden, dass bei zp Pestivirusgenomen eine Integration kodierender, zellulärer mRNA-Sequenzen auf einen doppelten „template switch“ während der Minusstrangsynthese zurückzuführen ist (replikative RNA-Rekombination, Abb. 8). Alternativ ist aber auch eine Integration der zellulären Sequenzen in das virale Genom nach doppeltem Bruch bzw. Spaltung und anschließender Ligation möglich (nicht replikative RNA-Rekombination).

Die Nukleinsäuresequenzen rekombinanter Pestiviren enthalten wichtige Informationen über stattgefundenere Rekombinationsereignisse und erlauben dadurch über die reine Herkunftsbestimmung der beteiligten Moleküle hinausgehende Studien. So wurde für die RNA-Rekombination bei Pestiviren durch Sequenzuntersuchungen rekombinanter zp Pestivirusgenome bereits nahegelegt, dass Basenpaarung zwischen „nascent“- und Akzeptor-RNA replikative RNA-Rekombination erleichtern könnte, RNA-Rekombination sowohl während der Plus-

1. Einleitung

als auch der Minusstrangsynthese erfolgen kann und dass die Pestivirus-RdRp Primer mit und ohne basengepaartes 3'-Nukleotid verlängert (Becher et al., 1999a, Becher et al., 2001b, Fricke et al., 2001).

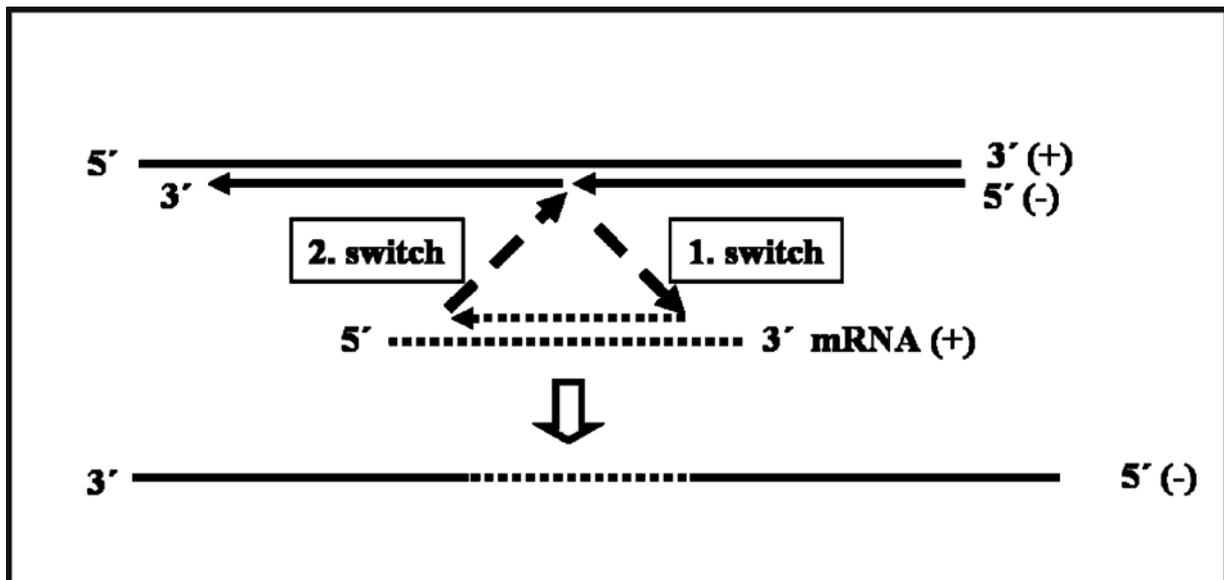


Abb. 8: Modell für die Integration zellulärer mRNA-Sequenzen in virale Plusstranggenome

Bei *z*p Pestivirusgenomen wäre eine Integration zellulärer mRNA-Sequenzen (Mitte, gepunktete Linie, mRNA, +) während der viralen Replikation auf einen doppelten „template switch“ (gestrichelte Pfeile) während der viralen Minusstrangsynthese (durchgezogene Pfeile, oben) zurückzuführen, da die zellulären Sequenzen im resultierenden Virusgenom in kodierender Form vorliegen. Als replikatives Intermediat entsteht ein rekombinanter Minusstrang (unten, -), der die RNA-Sequenzen zellulären Ursprungs in negativer Polarität beinhaltet (Punkte).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Allgemeinen erschwert die Tatsache, dass die rekombinanten Genome von zp Pestiviren aus jeweils unterschiedlichen parentalen Sequenzen hervorgehen, die Erstellung und Verifizierung allgemeingültiger Aussagen über RNA-Rekombination bei Pestiviren. Die experimentelle Erzeugung von MD in mit nzp BVDV persistent infizierten Rindern stellt hierfür nur einen sehr bedingt geeigneten Versuchsansatz dar, der neben der Berücksichtigung ethischer Aspekte große Nachteile auf Grund seiner zeit- und materialaufwändigen Durchführung aufweist.

Ziel dieser aus Mitteln des Sonderforschungsbereichs 535 („Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“, Teilprojekt B8 - RNA Rekombination bei Pestiviren) finanzierten Arbeit war es, in Zellkultur ein RNA-Rekombinationssystem zu etablieren, das eine einfache und gezielte Überprüfung von Arbeitshypothesen erlaubt, die aus Sequenzvergleichen von zp Pestivirusisolaten abgeleitet wurden. Dabei sollte durch die Verwendung von *in vitro* transkribierten, pestiviralen cRNAs die gezielte Beeinflussung eines oder beider Rekombinationspartner auf cDNA-Ebene ermöglicht werden.

Neben der Etablierung und Optimierung dieses Systems sollten im Fokus der sich anschließenden Untersuchungen insbesondere die folgenden Zielsetzungen stehen:

- Einfluss von Polarität, Menge und Replikationskompetenz der beteiligten Rekombinationspartner auf die RNA-Rekombination
- Untersuchungen zum Mechanismus der RNA-Rekombination
- Identifizierung von die pestivirale RNA-Rekombination beeinflussenden Sequenzcharakteristika
- Gezielte Erzeugung rekombinanter Pestiviren durch RNA-Rekombination

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Eukaryotische Zellen

„Madin Darby bovine kidney“ (MDBK)- und „Porcine kidney“ (PK15)-Zellen wurden bezogen von der American Tissue Culture Collection in Rockville, Md., USA. „Swine kidney“ (SK6)-Zellen wurden von Dr. J. D. Tratschin (Institut für Virologie und Immunprophylaxe in Mittelhäusern, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

2.1.1.2 Prokaryotische Zellen

Für die Transformation und Vermehrung von DNA-Plasmiden verwendete Bakterien waren die *E. coli*-Stämme TOP 10F (Fa. Invitrogen), Qiagen EZ (Fa. Qiagen) und K12 HB 101.

2.1.2 Virusstämme

Der BVDV-1-Stamm NCP7 wurde von Dr. E. J. Dubovi (Cornell University, Ithaca, USA) erhalten (Corapi et al., 1988). Der KSPV-Stamm Alfort-p447 entstammt dem infektiösen cDNA-Klon p-Alfort-p447 (siehe unten).

2.1.3 Plasmide und Gesamtklone

Zur Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten wurden das pCR2.1[®]-Plasmid (Fa. Invitrogen) und das p-Drive[®]-Plasmid (Fa. Qiagen) verwendet. Diese ca. 3.9 kb langen Plasmide enthalten u. a. ein Ampicillin-Resistenzgen sowie einen Teil des *E.coli* LacZ-Genes (LacZ'). Beide Plasmide enthalten multiple

2. Material und Methoden

Klonierungsstellen sowie eine Stelle für die TA-Klonierung (s.u.). Ein Einbau fremder DNA an dieser Stelle inaktiviert das LacZ'-Gen. Dies ermöglicht nach Plasmidtransfektion in kompetente Bakterien und Ausplattieren auf Indikatoragarplatten (mit Ampicillin und X-Gal) die Blau/Weiß-Selektion von Bakterienkolonien, die das rekombinante Plasmid tragen. Die Klonierung von infektiösen BVDV-cDNA-Gesamtklonen und von Subklonen mit mehr als 2 kb pestiviraler cDNA-Sequenz erfolgte mit dem ca. 2 kb großen, ebenfalls ein Ampicillinresistenzgen tragenden Plasmidvektor Proteus, der freundlicherweise von Dr. R. J. Kuhn (Purdue University, West Lafayette, USA) überlassen wurde (Kuhn et al., 1991).

Die infektiösen BVDV-Gesamtklone pCP7-5A und pNCP7-5A wurden von PD Dr. Paul Becher und Michaela Orlich (beide Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Gießen) erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Baroth et al. 2000, Becher et al., 2000).

Der infektiöse KSPV-Gesamtklon pAlfort-p447 ist eine modifizierte Version von pA/CSFV (Meyers et al., 1989a), enthält allerdings anstelle von Sequenzen des Plasmids pACYC177 Sequenzen des Plasmids pBR322 und wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Tillmann Rümenapf (Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt. Weitere Modifikationen beinhalten die Einführung eines SP6-Promotors vor dem 5'-Ende der KSPV-cDNA-Sequenzen, die stille Mutation interner *Sma*I-Schnittstellen und die Reparatur einer auf ein fehlendes C bei Position 7907 (pA/CSFV) zurückzuführenden Verschiebung des offenen Leserahmens.

Der Klon des nzp BVDV-Subgenoms NCP413 wurde von PD Dr. Paul Becher zur Verfügung gestellt. Er entspricht dem Plasmid pNCP7-5A, trägt aber eine interne Deletion von fast 3 kb im Bereich zwischen zwei bei nt 460 und nt 3440 eingefügten *Age*I-Schnittstellen.

2. Material und Methoden

Der das Fragment von der *Cla*I (11076)- bis zur *Aat*II (12259)-Schnittstelle von pCP7-5A beinhaltende cDNA-Klon p3M2, bei denen die Nukleotide 12226 bis 12229 von pCP7-5A deletiert sind, wurde ebenso wie der entsprechende cDNA-Klon p3M4, bei dem die Nukleotide 12195-12198 deletiert sind, von Alexander Pankraz (Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Gießen) erstellt und zur Verfügung gestellt.

Der cDNA-Klon pC14.1, der BVDV CP14-spezifische Sequenzen enthält, wurde von HD Dr. Norbert Tautz (Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt (Tautz et al., 1993).

2.1.4 Antiseren und Antikörper

2.1.4.1 Antiseren

Das polyklonale Schweineserum pkS- α KSPV, gewonnen nach dreimaliger Infektion mit KSPV, wurde von Dr. Matthias König, das polyklonale Schafserum aus Infektion mit BDV X818 pkS- α BDV (siehe 3.3.5) wurde von PD Dr. Paul Becher (beide Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt.

2.1.4.2 Antikörper

Primärantikörper

Der mAK 8.12.7 (Code 4), der gegen das pestivirale NS3 gerichtet ist, wurde von Dr. E. J. Dubovi (Cornell University, Ithaca, USA) zur Verfügung gestellt (Corapi et al., 1990a). Der mAK A18 ist gegen das virale Strukturprotein E2 von KSPV gerichtet (Weiland et al., 1990).

Sekundärantikörper

Ziege anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert (Fa. Dianova).

Ziege anti-Maus IgG, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Fa. Dianova).

2. Material und Methoden

2.1.5 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Die in den Tabellen 2 bis 4 angegebenen Oligonukleotide (Oligos, Primer) für reverse Transkription (RT), PCR, gerichtete Mutation, Klonierung und DNA-Sequenzierung wurden von der Fa. MWG-Biotech hergestellt. Unterstrichene Nukleotide stellen die spezifische Erkennungssequenz für das im Namen des Oligonukleotids angegebene Restriktionsenzym dar. Kleingeschriebene Nukleotide weichen von den parentalen Sequenzen von pCP7-5A (Becher et al., 2000), pAlfort-p447 oder der p-Drive-Sequenz ab. Die Polarität (Pol.) der Primer ist angegeben: (+) kodierender Strang; (-) revers, Gegenstrang.

M= A oder C, R= A oder G, Y= C oder T.

2.1.5.1 Oligonukleotide für RT, PCR, gerichtete Mutation und Klonierung

Tab. 2: BVDV-Primer

Die Angaben zur Lokalisation der Primersequenzen beziehen sich auf das Genom des BVDV cDNA-Klons pCP7-5A, Genbanknummer AF 220247 (Becher et al., 2000). Primer, die für Sequenzanalysen verwendet wurden, sind in **A** bis **D** aufgelistet. Primer, die der Einführung genomischer Mutationen dienen, sind in **E** aufgeführt.

A:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
OI CP7- α (1)	5'-GTATACGAGGTTAGGCAAG-3'	+
OI CP7-B4 (620)	5'-ACCAGGGCCGTTATTCTA-3'	+
OI CP7-B5 (870)	5'-TGCTCCGACACAAAAGAT-3'	+
OI CP7-B6 (1150)	5'-CCCTGGTTTTCTTTCAAG-3'	+
OI CP7-B16 (3850)	5'-TAATAGGTCTGGTTATAGC-3'	+
OI CP7-4950	5'-TGTGGGATGACTCTAGCGG-3'	+

2. Material und Methoden

OI CP7-5050	5'-GTTTGTACAATACACCGCTAG-3'	+
OI CP7-B26 (5900)	5'-GATAGAGGAGATAGGAC-3'	+
OI BVD-7100	5'-AGACTAGARGAYACMACCCACCT-3'	+
OI CP7-7350	5'-AGACTAGAGGACACAACCCACCT-3'	+
OI CP7-B36 (7720)	5'-TGAGACAAGCAGCTGTTCG-3'	+
OI CP7-B38 (8270)	5'-CAGTCCAGACAATTGGC-3'	+
OI CP7-B39 (8520)	5'-GGTGGGCTCCCGCACCAT-3'	+
OI CP7-B40 (8770)	5'-AACCAGTTGCTAAACTAG-3'	+
OI CP7-B41 (9020)	5'-AAAAATGAAGAAAGGCTGC-3'	+
OI CP7-B42 (9270)	5'-GTTGGGATCACTTTAGTT-3'	+
OI CP7-B44 (9770)	5'-AGCCTTGGAAGCTCTCAG-3'	+
OI CP7-B46 (10100)	5'-GCTATTGCTACGTTGCCC-3'	+
OI CP7-B47 (10350)	5'-GTGAGGCACCAGGGTAAT-3'	+
OI CP7-B48 (10600)	5'-AATTGTTAGAGATCTTTC-3'	+
OI CP7-NS3 R (5373)	5'-AGCGGTCACATGGTCTACTG-3'	-

B (Primerpaare):

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
1: OI CP7-B48 (10600)	s.o.	+
OI CP7-B36 R (6950)	5'-ATGCAAGCTGGATAGGCT-3'	-
2: OI CP7-B54A (12064)	5'-GTTGAGAGTTCTGCTTATG-3'	+
OI CP7-B58 R (11700)	5'-CCTCACAAGAGGATTCCA-3'	-

2. Material und Methoden

C:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
OI CP7-B53 (11656)	5'-GCCAGAGACA ACTCCATC-3'	+
OI CP7-3M1 R (12250)	5'GTGGACGTCGGGTGTACATACAGCTAA AGTGCTGTGTGC-3'	-

D:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
OI CP7-11003	5'-GTA ACTAGTAGAGATCTACGG-3'	+
OI CP7-12070 R	5'-GAACTCTCAACCTCCTCAGCAGCAG-3'	-

E:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
OI <i>NheI</i> -T7-ubi	5'TAC <u>GCTAGCT</u> AATACGACTCACTATA GGATGGGTACTGAGGAAAG-3'	+
OI CP14- <i>AgeI</i> R	5'-ATC <u>ACCGGTCTCT</u> AGCCCCCTTCTC-3'	-
OI <i>NheI</i> - <i>SrfI</i> -ubi	5'TAC <u>GCTAGCCCCGGGCT</u> AGGATGGGTA CTGAGG-3'	+
OI P200 R (252)	5'-GGGCATGCCCTCGTCCAC-3'	-
OI CP7-5A- <i>NheI</i> - <i>SnaBI</i>	5'TAC <u>GCTAGCTACGTATA</u> CGAGGTTAG GCAAGTTC-3'	+
OI CP7-11900- Δ <i>EcoRV</i>	5'CCGACAGGTTaATcTCTAGCAAAACTG- 3'	+
OI CP7-11900- Δ <i>EcoRV</i> R	5'CAGTTTTGCTAGAgATtAACCTGTCCG- 3'	-
OI CP7-RdRp-GAA	5'-CATGTCTGTGGGGcTGcCGGCTTCC-3'	+
OI CP7-RdRp-GAA R	5'-GGAAGCCGgCAgCCCCACAGACATG-	-

2. Material und Methoden

	3'	
OI CP7-12080- <i>ClaI</i>	5'GAGAGTTCTGCTT <u>ATcGat</u> GCTGTCGGT GCC-3'	+
OI CP7-12080- <i>ClaI</i> R	5'GGCACCGACAGC <u>CatCg</u> ATAAGCAGAAC TCTC-3'	-
OI CP7-QC-11450- <i>SmaI</i>	5'GCTCTCATAC <u>CCcGgg</u> CCCGTTAGGT GGTC-3'	+
OI CP7-QC-11450- <i>SmaI</i> R	5'GACCACCTAACGGG <u>GccCg</u> GGTGTATGA GAGC-3'	-
OI CP7-B49 (10756)	5'-TGATGATTGGCAATCAGG-3'	+
OI CP7-11284- <i>SmaI-FseI</i> R	5'AGTGGCCGGCCCGGGGACATGGATCC TTGCAACCC-3'	-
OI CP7- <i>ClaI</i> -T7-M 11450	5'CTG <u>ATCGATTA</u> AATACGACTCACTATAG TaCCtGTTAGGTGGTCTGATAAC-3'	+
OI CP7- <i>ClaI</i> -T7-M 11200	5'CTG <u>ATCGATTA</u> AATACGACTCACTATAG TcTTgACAATGATGTATGCCTTCTG-3'	+
OI CP7-12260 R	5'-CTAGTCCAACCGTGGACG-3'	-

Tab. 3: KSPV-Primer

Die Angaben zur Lokalisation der Primersequenzen beziehen sich auf das Genom des KSPV Alfort/Tü, Genbanknummer J04358 (Meyers et al., 1989a). Primer, die für Sequenzanalysen verwendet wurden, sind in **A** aufgelistet. Primer, die der Einführung genomischer Mutationen dienen, sind in **B** aufgeführt.

2. Material und Methoden

A (Primerpaare):

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
1: Ol Alfort-10032	5'-CACATATGGTCTCAGCCTACC-3'	+
Ol Alfort-5170 R	5'-GTGTTTCAGTAACCTTCTTGC- 3'	-
2: Ol Alfort-10032	s.o.	+
Ol Alfort-5690 R	5'-GTTCTTCCCGACCTTGACCC-3'	-
3: Ol Alfort-7017	5'-TGGAGAGGTGACTGATACTTAC-3'	+
Ol Alfort-5170 R	s.o.	-
4: Ol Alfort-171	5'-GTACAGGACAGTCGTCAGTAG-3'	+
Ol Alfort-6017 R	5'-AAGTAACCGTAAGAGGCATAGG-3'	-

B:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
Ol Alfort-NS3-5'- <i>ApaI</i> (5140)	5'-GAGGGCCcGCTGTTTGCAAG-3'	+
Ol Alfort-5690 R	s.o.	-
Ol <i>XhoI</i> -T7-NS2-ubi	5'TACCTCGAGTAATACGACTCACTATAG GATG-3'	+
Ol <i>ApaI</i> -ubi-3' R	5'-GCgGGCCCTCCACCTCTG-3'	-

Tab. 4: Vektorprimer

Die Angaben zur Lokalisation der Primersequenzen beziehen sich auf den p-Drive-Vektor (Fa. Qiagen).

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
Ol p-Drive- Δ <i>ApaI</i> (365)	5'-CACGTGTGGGaGCaCGAGCTCGCG-3'	+
Ol p-Drive- Δ <i>ApaI</i> R (388)	5'-CGCGAGCTCGtGctCCCACACGTG-3'	-

2. Material und Methoden

2.1.5.2 Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

Für die Nukleinsäuresequenzierung wurden 5'-IRD800-markierte Oligonukleotide verwendet. Die Angaben zur Lokalisation der Primersequenzen beziehen sich auf die Genome von BVDV-Stamm CP7-5A (**A**) und den KSPV-Stamm Alfort-p447 (**B**) oder auf die Sequenz des p-Drive-Vektors (**C**).

Tab. 5: Sequenzierprimer

A:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
OI CP7-B17 IR (11000)	5'-CACTAAGGCTTGGGACACCCAAG-3'	+
OI CP7-B18 IR (11700)	5'-CACAGCAGCCAGAGACA ACTCC-3'	+
OI 5.2 IR (370)	5'-ACTCCATGTGCCATGTACAG-3'	-
OI CP7-B1 R IR (11600)	5'-ATAGTACCCCTTTCTCCACTT-3'	-

B:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
OI CSFV-1 IR (378)	5'-CTGCTGTACATGGCACATGGAG-3'	+

C:

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
OI M13 IR (221)	5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTG -3'	+
OI M13 R IR (447)	5'-TTCACAGGAAACAGCTATGAC -3'	-

2. Material und Methoden

2.1.6 Nährmedien

Als Lösungsmittel wurde, falls keine anderen Angaben erfolgen, doppelt destilliertes H₂O aus der hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage verwendet. Die für die Kultivierung von Bakterien verwendeten Medien wurden nach Herstellung autoklaviert.

2.1.6.1 Zellkulturmedien

Für die Zellkultur wurde das Medium "BFA 34" verwendet, das auf Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) basiert. Hierzu wurden 9.6 g DMEM Fertigpulver (Fa. Gibco BRL) und 2.2 g NaHCO₃ in 1 l Aqua bidest. gelöst und der pH auf 7.0 eingestellt. Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 10 % Pferdeserum, 0.04 g/l Penicillin und 0.07 g/l Streptomycin.

2.1.6.2 Bakterienkulturmedien

- LB-Medium: 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt ad 1 l H₂O, pH 7.5.
- LB(++)-Medium: LB-Medium inkl. MgCl₂ und MgSO₄.
- SOC-Medium: 2 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.
- LB-Plattenagar: 2 % g Agar-Agar in LB-Medium.
- Bakterienresuspensionspuffer: 60 mM CaCl₂, 10 mM Pipes, 15 % Glycerin, pH 7.1.

Zur Selektion transformierter Bakterien wurden dem LB-Medium bzw. dem LB-Plattenagar 100 µg/ml Ampicillin zugefügt.

2. Material und Methoden

2.1.7 Lösungen und Puffer

Als Lösungsmittel diente, sofern nicht gesondert aufgeführt, doppelt destilliertes H₂O. Die Lösungen wurden, falls nicht abweichend angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

- Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin, -20 °C.
- Auftragspuffer für Agargelelektrophorese: 0.25 % Bromphenolblau, 0.1 % Orange G, 30 % Glycerin, H₂O ad 10 ml, -20 °C.
- β-Mercaptoethanol: 0.5 M β-Mercaptoethanol, -20 °C.
- BSA-Lösung: 1 % bovines Serumalbumin, 0.01 % NaN₃, 4 °C .
- DNA-Größenmarker für Gelelektrophorese: 6 ml H₂O, 100 µl Tris/HCl (pH 7.5/0.5 M), 50 µl 0.1 M EDTA (pH 8.0), 125 µl 1 % Orange G, 50 µl 1 % Bromphenolblau, 400 µl Glycerin, 200 µl DNA-Leiter (1 kb, 1 µg/µl).
- Ethanol (70 %): 70 ml Ethanol, 30 ml DNase-/RNase-freies Wasser, 4 °C.
- Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid, 4 °C, lichtgeschützt gelagert.
- Formaldehydlösung: 3.7 ml Formaldehyd, 100 ml PBS, 4 °C.
- Kristallviolettlösung: 0.2 % in 50 % Ethanol.
- "low melting"-Agarose (LMA): 1.5 g LMA auf 50 ml, autoklaviert, 4 °C.
- MgCl₂ / CaCl₂ Lösung (1x): 5 g MgCl₂ x 6 H₂O, 5 g CaCl₂ ad 500 ml H₂O, 4°C.
- Octyl-Glykosid-Lösung: 5 g 1-O-N-Octyl-β-D-Glukopyranosid ad 1 l PBS, 4°C.
- Orange G (0.25 %): 2.5 ml Orange G 1%, 3 ml Glycerin, 4.5 ml H₂O.
- PBS: PBS deficient, 0.1 g CaCl₂, 0.1 g MgCl₂ x 6 H₂O.
- PBS deficient: 0.25 g KCl, 1.8 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0.25 g KH₂PO₄, 10 g NaCl, ad 1 l.

2. Material und Methoden

- PBS/Tween: 5 ml 10 % Tween-20 (gelöst in PBS 1x) ad 1 l PBS, 4 °C.
- PBS/BSA: 1 g BSA (Fraktion V), 1 ml NaN₃ 10 % (gelöst in PBS) ad 100 ml PBS.
- Penicillin/Streptomycin (500 x): 5 x 10⁴ IU/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat, -20 °C.
- Phenol mit 0.1 % Hydroxychinolin.
- Restriktionsenzym- und DNA-Ligationspuffer: von den Firmen Invitrogen, NEB, Promega, Takara direkt bezogen.
- RNase freies H₂O: Fa. Qiagen und Roth.
- SDS-Lösung: 10 % Natriumdodecylsulfat.
- TAE-Gelelektrophoresepuffer (50x): 2 M Tris, 0.25 M Na-Acetat, 0.05 M EDTA-Na₂ x 2 H₂O, mit Eisessig auf pH 7.8, autoklaviert.
- Trypanblau-Färbelösung: 0.25 % Trypanblau, 0.15 M NaCl, 4 °C.
- Trypsinlösung: 2.5 g Trypsin (1:300), 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄ x 2 H₂O, 1.44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1.23 g Na₂EDTA, 0.016 g Phenolrot, ad 1 l, 4 °C.
- Tween-20 (10 %-Stammlösung): 10 ml Tween, 90 ml PBS, 4 °C.
- X-Gal-Lösung: 40 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid in DMF, -20 °C.
- Lösungen für die Plasmid-DNA-Midi-Präparation (nach Angaben der Fa. Macherey-Nagel):
 - P 1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA-Na₂ x 2 H₂O, pH 8.0, autoklaviert, 40 mg/ml RNase A, 4 °C.
 - P 2: 200 mM NaOH, 1 % SDS.
 - P 3: 2.8 M K-Acetat, pH 5.1 (mit Eisessig eingestellt), 4 °C.

2. Material und Methoden

- N2: 0.1 M Tris, 15 % Ethanol, 0.9 M KCl, pH 6.3 (mit Phosphorsäure eingestellt)
- N3: wie N2, aber 1.15 M KCl.
- N5: wie N2, aber 1 M KCl und pH 8.5.

- Lösungen für die Plasmid-DNA-Mini-Präparation:
 - L 1: 10 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 5 ml 0.1 M EDTA-Na₂ x 2 H₂O (pH 8.0), 400 µg/ml RNase A, ad 50 ml, 4 °C.
 - L 2: 200 mM NaOH, 1 % SDS.
 - L 3: 3 M K-Acetat, pH 5.75 (mit Eisessig eingestellt), 4 °C.

- Puffer für die Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion:
 - RT Puffer A (2.5x): 125 mM Tris (pH 8.3), 187.5 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂, 25 mM DTT, 1.25 mM dNTPs, -20 °C.
 - PCR-Puffer B (5x): 25 mM Tris (pH 8.3), 100 mM KCl, 6.5 mM MgCl₂, 1.25 mM dNTPs, 0.5 % Triton x 100, 0.1 % BSA, -20 °C.

- Lösungen für Sequenzgele:
 - Ammoniumperoxidisulfat (APS): 10 % Ammoniumperoxidisulfat, -20 °C.
 - TBE-Puffer „long run“ (10x): 60.05 g Tris, 30.91 g Borsäure, 7.44 g EDTA-Na₂, ad 1 l, pH 8.0, autoklaviert.
 - 4 % Polyacrylamidlösung: 25.6 ml Ultra pure Sequagel XR, 6.4 ml Ultra pure Sequagel complete Puffer, 6.4 g Urea, 1.6 ml 10 x TBE-Puffer, 12 ml H₂O, 16 µl TEMED, 320 µl 10 % APS.

2. Material und Methoden

- Lösungen für RNA-Gele und „Northern Blot“:
 - RNA-Gelpuffer A: 0.2 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O , autoklaviert.
 - RNA-Gelpuffer B: 0.2 M Na_2HPO_4 x 2 H_2O , autoklaviert.
 - RNA-Gelpuffer (10x): 125 ml A, 122.5 ml B, auf 500 ml.
 - SSC (20x): 175.3 g NaCl, 88.2 g Na-Citrat, ad 1 l, mit HCl auf pH 7.0, autoklaviert.
 - Hybridisierlösung: 7 % SDS, 20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA-Na, pH 7.2 (mit NaOH eingestellt).
 - 5 % Waschlösung: wie Hybridisierlösung, aber 5 % SDS.
 - 1 % Waschlösung: wie Hybridisierlösung, aber 1 % SDS.
 - TES: 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.5 % SDS.

- Gele und Puffer für Proteingele nach von Jagow:
 - SDS-Lysispuffer: 2 % SDS, 6 M Urea, 10 % Glycerin, 0.01 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol, auf 100 ml, 4 °C.
 - Anodenpuffer (10x): 0.2 M Tris, pH 8.9.
 - Kathodenpuffer (10x): 1 M Tris, 1 M Tricin, 1 % SDS, pH 8.25.
 - Gelpuffer: 3 M Tris, 0.3 % SDS, pH 8.45 (mit HCl eingestellt).
 - Sammelgel (4 %): 1 ml Acrylamid, 2.5 ml Gelpuffer, 6.4 ml H_2O , 80 μl 10 % APS, 10 μl TEMED.
 - Trenngel (8 %): 2 ml Acrylamid, 3.3 ml Gelpuffer, 4.1 ml H_2O , 50 μl 10 % APS, 5 μl TEMED, 500 μl Glycerin 5.5 %.

2. Material und Methoden

2.1.8 Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
Acrylamid	Fa. Biozym
Agar-Agar	Fa. Difco
Agarose für Gelelektrophorese, auch „low melting“	Fa. Gibco-BRL
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Fa. Merck
Ampicillin	Fa. Serva
Bacto-Hefeextrakt	Fa. Difco
Bacto-Trypton	Fa. Difco
Bromphenolblau	Fa. Sigma
BSA	Fa. Gibco BRL
Chloroform	Fa. Roth
dNTPs und rNTPs	Fa. Boehringer Mannheim
Ethanol	Fa. Merck
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer Mannheim
Formaldehyd (37%)	Fa. Merck
Glycerin (87%)	Fa. Merck
Glyoxal (40%)	Fa. Fluka
Guanidinthiocyanat	Fa. Roth
Isopropanol	Fa. Merck

2. Material und Methoden

Kristallviolett	Fa. Fluka
β -Mercaptoethanol	Fa. Invitrogen
Natriumazid (NaN_3)	Fa. Serva
NaOH	Fa. Fluka
n-Octyl- β -D-Glukopyranosid	Fa. Gibco-BRL
Penicillin	Fa. Sigma
Phenol	Fa. Roth
Schwefelsäure	Fa. Fluka
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. ICN
Sephadex G50 (medium)	Fa. Pharmacia
Sequagel XR, Sequagel complete	Fa. Biozym
Streptomycin	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Gibco BRL
Tris	Fa. Boehringer Mannheim
Triton X-100	Fa. Fluka
Tween-20	Fa. Fluka
Urea	Fa. United States Biochemical

Weitere nicht separat gelistete Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Gibco BRL, Merck, Pharmacia, Serva und Sigma bezogen.

2. Material und Methoden

2.1.9 Radioaktiv markierte Substanz

α (^{32}P)-dCTP (3000 Ci/mmol)	Fa. Amersham
--	--------------

2.1.10 Enzyme

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Fa. Promega
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England Biolabs (NEB), Boehringer, Gibco BRL, Pharmacia, Promega, Stratagene, Takara
Reverse Transkriptase Superscript™ II	Fa. Invitrogen
RNase A	Fa. Serva
RNase-Inhibitor	Fa. Takara
SP6-RNA-Polymerase	Fa. Takara
T4-DNA-Ligase	Fa. NEB
T7-RNA-Polymerase	Fa. Ambion
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fa. NEB
Trypsin	Fa. Sigma
Turbo-DNaseI	Fa. Ambion

2.1.11 Vorgefertigte Systeme (“Kits”)

“A-addition”-Kit	Fa. Qiagen
cDNA-Klonierungskit “PCR-cloning ^{plus} ”	Fa. Qiagen
DNA-Agarosegeleextraktionskit “QUIAEX Gel Extraction Kit“ mit QIAEX® II	Fa. Qiagen

2. Material und Methoden

DNA-Plasmidpräparationskit Midiprep	Fa. Macherey-Nagel
DNA-Sequenzierungs-Kit "ThermoSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit"	Fa. Amersham
"Nick"-Translationskit	Fa. Amersham
RNA-Extraktionskit "RNeasy [®] "	Fa. Qiagen
SP6-RNA-Transkriptionskit	Fa. Takara
T7-RNA-Transkriptionskit	Fa. Ambion
"Western Blot"-Kit Renaissance	Fa. NEN

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Einmaldispensionsspritzen 5 ml	Fa. Eppendorf
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturschalen (Ø 10 cm), Mikrotiterplatten (6-, 24-, 96-Loch), Petrischalen, Plastikröhrchen (12, 50 ml)	Fa. Falcon
DNA-Längenstandard	Fa. Gibco BRL
Elektroporationsküvetten	Fa. Molecular Bioproducts
Homogenisatorsäulchen "Quiashredder TM "	Fa. Qiagen
Latexhandschuhe (Rotiprotector [®])	Fa. Roth
Nitrilhandschuhe (Rotiprotect [®] -Nitril)	Fa. Roth
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83	Fa. Schleicher & Schüll
Nylonmembran Duralon-UV	Fa. Stratagene
Mikroreaktionsgefäße (0.2, 1.5, 2.0 ml)	Fa. Biozym, Fa. Eppendorf

2. Material und Methoden

Paraffinkügelchen	Fa. Paraplast Monoject
Pipettenspitzen (0.1-10, 2-20, 10-200, 200-1000 µl)	Fa. Biozym
Röntgenfilm Biomax MR-1	Fa. Kodak
Säulen für Midipreps (AX-100)	Fa. Macherey-Nagel
Spritzenfilter, aufschraubbar, 0.45 µm	Fa. Fisher Scientific

2.1.13 Geräte

Analysenwaage 3716 MP	Fa. Sartorius
Bakterienschüttler und -inkubator IH 50	Fa. Noctua
DNA-Sequenzierautomat (Modell 4000L), Zubehör	Fa. Licor
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Fa. Biorad
Filmentwickler Curix 60	Fa. Agfa
Fluoreszenzmikroskop HBO 50 mit F-View Imaging System	Fa. Zeiss
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Fa. Brand
Glasgeräte	Fa. Schott
Gefrierschränke (-20 °C und -70 °C)	Fa. Liebherr
Geldokumentationssystem	Fa. MWG Biotech
Gelelektrophoreseapparaturen	Werkstatt des Instituts für Virologie, JLU Gießen
Hybridisierschrank 400 HY	Fa. Bachofer
Kühlbad RM6	Fa. Lauda
Kühlschrank (4°C)	Fa. Liebherr
Lichtmikroskop Diavert	Fa. Leitz
Magnetrührer IKAMAG REO	Fa. IKA

2. Material und Methoden

Messgerät für Radioaktivität LB 1210 B	Fa. Berthold
Minishaker VIBRAX-VXR	Fa. IKA
Mikropipetten (0.1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl)	Fa. Gilson
Multikanalpipette	Fa. Micronic
Photometer (GeneQuant II)	Fa. Pharmacia Biotech
pH-Meter	Fa. Knick
Spannungsquellen P25, EPS 600	Fa. Biometra, Fa. Pharmacia
sterile Werkbank Clean Air CA/RE 6	Fa. Haan
Thermocycler PROGENE	Fa. Techne
Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf
Thermocrosslinker Mini Oven	Fa. Hybaid
Transferapparatur für "Western Blot" Trans-Blot SD semidry	Fa. Biorad
UV-Transilluminator 254, 312 nm	Fa. Bachofer
UV-Crosslinker Stratalinker 1200	Fa. Stratagene
Vortexer MS1	Fa. IKA
Wärmebank	Fa. Steute
Wasserbad 37 °C WB 10	Werkstatt des Instituts für Virologie, JLU Gießen
Zellkulturbrutschrank Sterikult 200 Inkubator	Fa. Forma Scientific

2. Material und Methoden

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Biofuge fresco (gekühlte Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße)	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge Biofuge pico	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Fa. Eppendorf
Zentrifuge Labofuge 400 R	Fa. Heraeus
Zentrifuge Minifuge 2	Fa. Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Die Zellen wurden auf Zellkulturschalen von 10 cm Durchmesser bei 37 °C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden jeden dritten bis vierten Tag passagiert. Dazu wurde das Medium (10 ml) abgenommen und die Zellen mit 5 ml 37 °C warmem Trypsin für einige Minuten im Zellbrutschrank inkubiert. Nach Abnahme des Trypsins wurden die sich vom Boden der Zellkulturschale ablösenden Zellen in geeigneter Verdünnung (MDBK 1:10, SK6 1:20, PK15 1:15) auf neue Kulturgefäße verteilt. Das Medium wurde zwischen den Passagen nicht gewechselt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtanzahl an lebenden Zellen wurde ein entsprechender Zellkulturrasen wie beschrieben abtrypsinisiert und mit 10-20 ml Medium je große Zellschale vorverdünnt. Diese Zellsuspension wurde anschließend mit Trypanblau 1:10 verdünnt und die Anzahl blau gefärbter, lebender Zellen mit einer Fuchs-

2. Material und Methoden

Rosenthal-Zählkammer ermittelt. Die Berechnung der Anzahl lebender Zellen/ml Zellsuspension erfolgte mittels folgender Formel: durchschnittliche Zellzahl pro großem ausgezähltem Quadrat $\times 16 \times 10$ (Verdünnungsfaktor) $\times 0.31 \times 1000$.

2.2.1.3 Virusinfektion von Zellen

Der Zellkulturüberstand von nicht infizierten Zellen wurde abgenommen und die Zellen durch eine einstündige Inkubation im Zellkulturschrank mit Zellkulturüberstand infiziert. Anschließend wurde dieser Überstand abgenommen, neues Medium zugegeben und der jeweilige Ansatz 24-72 h inkubiert. Die mit einem np Virus infizierten Zellen wurden nach Auftreten eines ZPE geerntet, die mit nzp Virus infizierten Zellen nach ca. 48 h. Infektiöse Zellkulturüberstände wurden, wenn nicht anders angegeben, zum selben Zeitpunkt geerntet und in Portionen von 1-4 ml bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren und erst kurz vor Durchführung einer weiteren Infektion aufgetaut.

2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit synthetischer RNA

Am Vortag wurden Zellen auf großen Zellkulturschalen so ausgesät, dass deren Boden am Tag der Transfektion zu 80-90 % zugewachsen war. Für jeden Transfektionsansatz wurden dann die Zellen einer großen Schale abtrypsinisiert, in PBS deficient resuspendiert und zentrifugiert (Labofuge 400 R, 2000 Upm, 4 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nach Abnahme des Überstands wurde dieser Waschvorgang zweimal wiederholt und die je Zellansatz in 400 μl PBS deficient suspendierten Zellen mit dem oder den jeweilig verwendeten synthetischen Transkript(en) vermischt, in eine Elektroporationsküvette überführt und bei 180 V und 950 μF mit dem Genepulser transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit Medium aus der Küvette herausgespült und vollständig auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Wenn nicht anders angegeben, wurden dafür in den Rekombinationsexperimenten je Ansatz zwei „24-well“-Zellkulturschalen und für entsprechende Kontrollen „6-

2. Material und Methoden

wells“ verwendet. Nach einer Inkubation von 3 h, in der sich lebende Zellen abgesetzt hatten und festgewachsen waren, wurde bei den „6-wells“ der Zelltrümmer enthaltende Überstand gewechselt und die Ansätze weitere 3-5 Tage inkubiert.

2.2.1.5 Plaquereinigung

SK6-Zellen wurden auf „6-well“-Gewebekulturschalen mit rekombinantem zp KSPV in fortlaufender Verdünnung des infektiösen Überstandes von 1:10 infiziert. Anschließend wurden diese Ansätze mit 0.6 % „low melting“-Agarose enthaltendem Medium überschichtet und einige Tage inkubiert. Nach dem Auftreten eines zytopathischen Effekts wurde Material von Plaques, die in der höchsten Verdünnungsstufe aufgetreten waren, mit Eppendorfspitzen gestochen und durch mehrstündiges Schütteln in jeweils 1 ml frischem Medium bei 4 °C resuspendiert. Nach erneuter Infektion von nicht infizierten Zellen mit dem so erhaltenen infektiösen Material wurde eine solche Plaquereinigung mehrmals wiederholt.

2.2.1.6 Virustitration und Titerbestimmung

Die Endpunkttitration erfolgte auf „96-well“-Platten, in die zunächst je Vertiefung 100 µl Medium vorgelegt wurden. Je waagrechte Titrationsreihe von 12 Vertiefungen wurden dann in die erste Vertiefung 50 µl gegebenenfalls vorverdünnte Virussuspension gegeben und mit einer Mehrkanalpipette fortlaufend und unter Spitzenwechsel 1:3 austitriert. Daraufhin wurden je Vertiefung 2.5×10^4 MDBK-Zellen bzw. 1.5×10^4 SK6-Zellen in einem Volumen von je 100 µl hinzugegeben und entsprechende Ansätze für 3-4 Tage im Zellbrutschrank inkubiert. Bei zp Viren erfolgte die Auswertung über die Auszählung der Vertiefungen, in denen ein ZPE aufgetreten war, bei nzp Viren mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse. Infektiöse Virustiter wurden wie folgt berechnet:

2. Material und Methoden

$TCID_{50}$ (Dosis, bei der 50 % der Gewebekulturzellen infiziert werden)/ml = $3^{(\text{durchschnittliche positive Verdünnungsstufe} + 0.5)} \times 10 \times \text{Vorverdünnung}$.

2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von viralem Antigen

Die indirekte Immunfluoreszenz (IF) wurde zum Nachweis der Infektion von Zellen mit Pestiviren durchgeführt. Dazu wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3.7 % Formalin für mindestens eine halbe Stunde bei 4 °C fixiert. Das Formaldehyd wurde dann abgesaugt und die Zellen wieder mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Detergens Oktylglykosid behandelt, das die Zellmembran für die verwendeten Antikörper durchlässig macht (750 µl 0,5 % in PBS/Tween je Vertiefung einer „6-well“ für 5-10 min) und dann mit PBS/Tween gewaschen. Die Zellen wurden schließlich für 2 h mit 750 µl einer verdünnten Antikörperlösung je Vertiefung einer „6-well“ überschichtet. Die Antikörperstammlosung wurde zuvor 1:10 in PBS/BSA verdünnt. Beim Nachweis von Infektionen mit BVDV wurde der monoklonale Antikörper (mAK) Code 4, beim Nachweis der Infektion mit KSPV der mAK A18 verwendet. Nach mindestens zwei Stunden wurde die Antikörperlösung entfernt, die Zellen drei Mal mit PBS/Tween gewaschen und dann mit dem zweiten, 1:1000 verdünnten, Ziege anti-Maus IgG (Cy3-konjugiert) in einer Menge von 750 µl/well für eine Stunde überschichtet. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS/Tween gewaschen. Die Zellen zeigten im Falle einer Infektion mit Pestiviren unter dem Fluoreszenzmikroskop eine zytoplasmatische, rötliche Fluoreszenz.

2.2.1.8 Serumneutralisationstest

Zur Durchführung des Neutralisationstests wurden die Antiseren, in denen gegen Pestiviren gerichtete neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden sollten, zunächst 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. In jede Vertiefung einer 96-Lochplatte

2. Material und Methoden

wurden 50 µl Medium pipettiert. Danach wurden in die Vertiefungen der ersten senkrechten Reihe jeweils 50 µl des gegebenenfalls vorverdünnten Serums pipettiert und in 2-er Schritten bis zu einer Verdünnung von 2^{12} fortlaufend verdünnt. In alle Vertiefungen wurde dann 50 µl Virussuspension, die auf 100-150 TCID₅₀/50 µl vorverdünnt war, hinzugefügt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden in jede Vertiefung 1.5×10^4 SK6-Zellen in einem Volumen von 100 µl hinzugegeben. In jedem Experiment wurde auch eine Kontrolltitration der Virusgebrauchssuspension durchgeführt. Nach 48-72 Stunden wurden alle Platten dann lichtmikroskopisch und/oder durch IF ausgewertet und die Antikörpertiter der jeweils 8 Replikate als reziproke Werte der Serumverdünnungen, die bei 50 % der Replikate eine Infektion vollständig verhinderten, ermittelt (nach Spaermann und Kaerber).

2.2.1.9 Wachstumskurve

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden nicht infizierte, 3 h zuvor ausgezählte SK6-Zellen nach dem Anwachsen in einer „6-well“-Zellkulturschalenvertiefung mit infektiösem Überstand bei einer m.o.i. von 0.3 infiziert. Die m.o.i. ergab sich aus dem Quotienten von vorher ermitteltem infektiösem Virustiter des verwendeten Zellkulturüberstands zur Anzahl der eingesetzten, lebenden Zellen. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die infizierten Zellen fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml frischem Medium für 72 h im Zellbrutschrank inkubiert. Zu festgesetzten Zeitpunkten wurden jeweils 230 µl Überstand entnommen und durch neues Medium ersetzt. Die Bestimmung der jeweiligen infektiösen Virustiter erfolgte nach Endpunkttitration der entnommenen Proben auf 96-Lochplatten.

2. Material und Methoden

2.2.1.10 Kristallviolett färbung von Zellen

Die Kristallviolett färbung von Zellen diente der Sichtbarmachung der durch eine fortgeschrittene Infektion mit einem *z*p Pestivirus verursachten Löcher im Zellrasen. Nach Abnahme des Zellkulturüberstands und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zunächst mit 3.7 % Formalin für mindestens eine halbe Stunde bei 4 °C fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen zwei Mal mit aqua bidest. gewaschen, mit Kristallviolettlösung für einige min bei Rt angefärbt, wieder zweimal gewaschen und abschließend bei Rt getrocknet.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien

Alle verwendeten *E.coli*-Stämme wurden bei 37 °C unter Schütteln in LB-Medium vermehrt. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 mg Ampicillin/l Medium.

2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Unter Kompetenz von Bakterienzellen versteht man die Fähigkeit, Fremd-DNA direkt durch die Zellwand aufzunehmen. Um natürlicherweise kaum kompetente *E.coli*-Bakterien für Plasmid-DNA empfänglich zu machen, wurden die Zellen mit CaCl₂ enthaltendem Bakterienresuspensionspuffer behandelt. Zunächst wurde dazu eine frisch über Nacht gewachsene Bakterienkolonie von einer mit *E. coli* HB101 bespatelten LB-Agarplatte (ohne Ampicillin) gestochen und damit 3 ml LB(++)-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension wurde am nächsten Tag 1 ml entnommen, der zur Animpfung von 100 ml LB(++)-Medium diente. Dieser Ansatz wurde wieder bei 37 °C schüttelnd inkubiert und in regelmäßigen Abständen einer photometrischen Dichtebestimmung unterzogen. Die Bakterien wurden in der exponentiellen

2. Material und Methoden

Wachstumsphase bei einer OD (optischen Dichte)₆₀₀ von 0.6 abzentrifugiert (3000 Upm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde dann in 25 ml eiskaltem Bakterienresuspensionspuffer resuspendiert und 40 min auf Eis gelagert, wobei alle 10 min vorsichtig von Hand geschwenkt wurde. Danach wurden die Bakterien erneut pelletiert und in 5 ml Puffer resuspendiert. Die transformationskompetenten Bakterien wurden in Aliquots von 50 µl schockgefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Herstellung kompetenter *E. coli* TOP 10 wurde anstelle des LB(++)-Mediums SOC-Medium verwendet.

2.2.2.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Transformation in Bakterien wurde der entsprechende Ligationsansatz bzw. ca. 50-100 ng Plasmid-DNA (z.B. aus QC-PCR) zu einem Aliquot zuvor frisch aufgetauter, kompetenter *E. coli* HB101 gegeben und vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde alle 10 min vorsichtig aufgeschüttelt und dabei für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Durchführung eines Hitzeschocks (1.5 min bei 42 °C) wurden die Bakterien 2 min auf Eis gekühlt und 200 µl LB(++)-Medium zugegeben. Nach anschließender Inkubation bei 37 °C für 1 h bei leichtem Schütteln wurde ca. 1/3 des Ansatzes auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgespatelt und über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach der identisch verlaufenden Transformation von *E. coli* TOP 10 oder Qiagen EZ (letztere vorher nur 5 min auf Eis) wurde 250 µl SOC-Medium je Ansatz hinzugegeben. Im Anschluss konnten *E. coli* Qiagen EZ direkt ausplattiert werden. Nach der Transformation von Ligationsansätzen aus PCR-Klonierungen wurden die LB-Ampicillin-Agarplatten zur Blau/Weiß-Selektion von das rekombinante Plamid enthaltenden Bakterienkolonien mit 40 µl X-Gal bestrichen.

2.2.2.4 Kleine Plasmidpräparation (Mini-Präp)

Die Vorteile der Mini-Präp liegen in der Möglichkeit, auf relativ einfache Art und Weise eine größere Anzahl von Kolonien transformierter Bakterien jeweils zu vermehren und das in ihnen enthaltene rekombinante Plasmid zu gewinnen. Die Nachteile sind die relativ geringen Mengen an gewonnener Plasmid-DNA und der höhere Salzanteil im Vergleich zu der aus der DNA-Midi-Präparation gewonnenen DNA. Bei der Mini-Präparation wurde je eine Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und in einem kleinen Reagenzglas in 4.5 ml LB-Ampicillin-Nährlösung resuspendiert. Die angeimpften Reagenzgläser wurden im Schüttelbrutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von jedem Ansatz wurden je 2 ml der Bakteriensuspension in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden bei 4000 Upm 10-15 min bei Rt zentrifugiert, der Überstand abgenommen, weitere 2 ml Suspension hinzugegeben und abermals zentrifugiert. Es wurden je Ansatz 200 µl L 1 hinzugegeben und die offenen Eppendorfgefäß zum Auflösen der Bakterienpellets für einige min bei Rt in den Schüttler gestellt. Danach wurden erst je 200 µl L 2 und direkt danach auch je 200 µl L 3 hinzugegeben, die Gefäße verschlossen, geschwenkt und für 5-10 min auf Eis gestellt. In der vorgekühlten Zentrifuge wurde bei 4 °C, 13000 U/min für 20-30 min das ausgefällte Protein abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand in neue Eppendorfgefäße (1,5 ml) überführt und durch Zugabe von jeweils 400 µl Isopropanol die enthaltene Plasmid-DNA ausgefällt. Es wurde wieder mindestens 30 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das verbleibende Pellet wurde durch je 200 µl 70 % Ethanol ohne Resuspendieren gewaschen (Zentrifugation für 5-10 min und erneute Abnahme des Überstands). Das Pellet wurde dann in 50 µl aqua bidest aufgelöst.

2. Material und Methoden

2.2.2.5 Große Plasmidpräparation (Midi-Präp)

Der Vorteil der DNA-Midi-Präparation liegt in der Möglichkeit, relativ große und reine DNA-Mengen unter allerdings größerem Material- und Zeitaufwand als bei der Mini-Präp zu gewinnen. Bei der Midi-Präparation wurde je eine Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und in einer 500 ml Schottflasche in 80-200 ml LB-Ampicillin-Nährlösung resuspendiert. Die angeimpfte Flasche wurde im Schüttelbrutschrank 15-24 h bei 37°C inkubiert. Von jedem Ansatz wurden je 50 ml der Bakteriensuspension in ein 50 ml Plastikgefäß gegeben, bei 4000 Upm 10-15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die gesamte Bakteriensuspension abzentrifugiert war. Die Bakterienpellets wurden in 4 ml P 1 resuspendiert, dieselbe Menge P 2 zur alkalischen Lyse hinzugefügt und vorsichtig geschüttelt. Zur Proteinfällung und SDS-Neutralisation wurden nun 4 ml P3 hinzugefügt und wieder vorsichtig geschüttelt. Die Probe wurde dann für 5-10 min auf Eis gestellt und danach bei 4500 Upm, 15 min und 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Nucleobond AX-100-Säule je Midipräp mit 5 ml Lösung N2 äquilibriert. Die Säulen wurden dabei auf Glasmesszylinder gestellt. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde ohne das Pellet auf je eine Säule gegossen. Die in der Lösung enthaltene DNA adsorbierte an die Säule. Diese wurde anschließend zweimal hintereinander mit je 5 ml N3 gewaschen. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 4 ml N5 in ein neues 4 ml Plastikröhrchen eluiert. Die DNA wurde aus der Elutionslösung mit 2,8 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und die Lösung 10 min bei Rt inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation verteilt auf fünf 1.5 ml Eppendorfgefäß bei 13000 U/min, 30 min bei 4 °C in der vorgekühlten Zentrifuge an. Mit einer Eppendorfpipette wurden die Überstände entfernt und die DNA-Pellets durch Zugabe von je 200 µl 70 % Ethanol und anschließende Zentrifugation bei 13000 Upm, 4 °C für 5-10 min gewaschen.

2.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken

2.2.3.1 Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanol-fällung

Zur Transkription linearisierte cDNA oder synthetisches RNA-Transkript nach DNaseI-Verdau wurden zur Entfernung der in den Ansätzen enthaltenen Enzyme mit aqua bidest auf ein Volumen von 400 µl ergänzt, mit ebenfalls 400 µl Phenol überschichtet und nach Schütteln zentrifugiert (5-10 min bei 13000 Upm, Rt). Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform überschichtet, geschüttelt und wieder zentrifugiert. Die obere Phase wurde abermals abgenommen und mit 40 µl 3 M KCl und 1 ml 100 % Ethanol vermischt und über Nacht zum Ausfällen der Nukleinsäure bei -20 °C weggefroren. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 13000 Upm, 1 h und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol ohne Resuspendieren gewaschen. Das Pellet wurde nach Lufttrocknung in 10 µl aqua bidest/ca. 2 µg gefällter Nukleinsäure gelöst. Abschließend wurde eine diagnostische Gelelektrophorese mit einem eingesetzten Volumen von 0,5 µl der erhaltenen Nukleinsäurelösung durchgeführt.

2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Von den zu untersuchenden Nukleinsäurelösungen wurden Verdünnungen von 1/100 in einem Volumen von 100 µl angefertigt. Das Spektralphotometer wurde zuvor mit einer reinen Wasserlösung vorgeeicht. Die dann gemessenen Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm sollten zwischen 0,1 und 1 liegen. Die Extinktionswerte wurden mit dem Verdünnungsgrad und bei dsDNA mit 0.05 und bei ssRNA mit 0.04 multipliziert, um die Nukleinsäurekonzentration der Ursprungslösung in µg/µl zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese wurde als Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dazu wurden 1 %ige Agarosegele verwendet, die nach Kochen von Agarose in 1 x TAE-Puffer und Abkühlen auf ca. 60 °C gegossen nach Abkühlen auf Rt erstarrt waren. Auf das Gel wurde in ausgesparte Taschen die entsprechende Probe (mit Aufgusspuffer 1 zu 5 vermischt) aufgetragen. Als Längenstandard wurden dabei DNA-Marker bekannter Größe flankierend aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 100 ng/ml Ethidiumbromid enthaltendem 1 x TAE-Puffer für 40 min bei 100 V/400 mA durchgeführt. Nach dem Gellauf wurden Nukleinsäurebanden im Gel unter UV-Licht von 254 nm sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem fotografiert.

2.2.4 RNA-Techniken

Beim Umgang mit RNA wurde stets mit Handschuhen gearbeitet, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Desweiteren wurden nur sterilisierte und/oder mit Ethanol gereinigte Materialien, gestopfte Pipettenspitzen und RNase-freies Aqua bidest. verwendet.

2.2.4.1 Synthetische Transkription

Ca. 2 µg linearisierte und einer Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanol-fällung unterzogene cDNA wurde promotorabhängig in vitro mit den Transkriptionskits der Firmen Takara (SP6-Polymerase, rNTPs, BSA, DTT, 10 x Puffer, RNase-Inhibitor) und Ambion (wie Takara, aber T7-Polymerase, kein DTT) nach Herstellerangaben bei 37 °C für 1 h in einem Volumen von 20 µl (oder dem Vielfachen) transkribiert. Zur Abschätzung von RNA-Menge und -Integrität wurden 2 µl Transkriptionsansatz einer Agarosegelelektrophorese unterzogen.

2. Material und Methoden

Wenn angegeben, wurden die in den Rekombinationsexperimenten verwendeten Transkriptionsansätze zuvor außerdem einem DNaseI-Verdau und gegebenenfalls einer sich anschließenden Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanolfällung unterworfen.

2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Um Gesamtzell-RNA zu gewinnen, wurde von Zellkulturen der Überstand abgenommen, die Zellen mit PBS deficient gewaschen und trypsinisiert. Die Zellen wurden mit 0.8 ml PBS deficient aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4000 Upm für 2-3 min bei Rt zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 330 µl β-Mercaptoethanol enthaltendem Guanidinthiocyanat-Lysispuffer gelöst und auf Homogenisatorsäulchen aufgetragen, die anschließend bei 10000 Upm 2-3 min bei Rt abzentrifugiert wurden. Die im Filtrat enthaltene RNA wurde nach Vermischen mit 330 µl 70 % Ethanol nach Herstellerangabe der Fa. Qiagen mit dem „RNeasy“-Kit an spezielle Säulchen gebunden, gewaschen, mit je 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und anschließend einer photometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung unterzogen.

2.2.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese für „Northern Blot“

Es wurden 1.5 g Agarose zu 15 ml 10 x Phosphatpuffer und 114 ml H₂O gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 21 ml 37 % Formalin hinzugegeben und ein denaturierendes Agarosegel gegossen. Die Proben (entsprechend einer Menge von 5 µg RNA) wurden bereits zuvor mit 1.8 µl Glyoxal (40 %), 3 µl 5x Phoshatpuffer und H₂O in einem Gesamtansatz von 12.3 µl für 45 min bei 56 °C in Eppendorfgefäß denaturiert. Danach wurde jeweils 3 µl Auftragspuffer hinzugegeben, die Proben auf das Gel aufgetragen und eine elektrophoretische Auftrennung der Proben bei 120 V für 4-5 h unter ständiger Umwälzung des 1 x Phosphatlaufpuffers durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.2.4.4 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“)

Auf einer Glasplatte, die über eine mit 20 x SSC-Lösung gefüllte Schale gelegt war, wurde ein angefeuchtetes Stück Filterpapier so plaziert, dass beide Enden des Filterpapiers in die Salzlösung eintauchten. Auf das Filterpapier wurde das Agarosegel, darauf eine in Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran und darüber zwei ebenso große Stücke angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Abschließend wurde der Aufbau mit einem Stoß Zellulose und darüber einem Stoß saugfähigen Papier abgedeckt und mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Über die Kapillarkraft des Papiers wurde die Transferlösung aus der Schale durch das Gel gesaugt und dabei die RNA aus dem Gel eluiert und an die Nylonmembran gebunden. Nach einem mindestens 12 h dauernden Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 3 x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Auf dem 254 nm-UV-Transilluminator wurde ein UV-Lineal neben die Membran gelegt und Gelgröße sowie die Positionen der sichtbaren ribosomalen RNA-Banden durch ein Photo dokumentiert. Abschließend erfolgte durch UV-Crosslinken und mehrstündiges Backen im Thermocrosslinker bei 80°C eine kovalente Fixierung der RNA an die Nylonmembran und ein Abbau des in den Proben enthaltenen Glyoxals.

2.2.4.5 RNA/DNA-Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde zusammen mit etwa 10 ml entsprechend vortemperierter Hybridisierlösung in eine Glasröhre verbracht und im vorgeheizten Hybridisierofen drehend für eine halbe h inkubiert. Nach Verwerfen der Lösung wurde in 10 ml neue Hybridisierlösung die direkt zuvor bei 94°C für 2 min hitzedenaturierte, radioaktiv markierte cDNA-Sonde hinzugegeben und der Ansatz anschließend über Nacht bei einer Temperatur von 56-60 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran 1 x mit 5 % Hybridisierlösung und 2 x mit 1 % Hybridisierlösung für je 15 min gewaschen, getrocknet und dann autoradiographisch ausgewertet.

2. Material und Methoden

2.2.4.6 Reverse Transkription (RT)

1 µl RNA-Lösung wurde mit ca. 30 pMol des reversen Primers (Oligonukleotid) und autoklaviertem, bidestilliertem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11.5 µl aufgefüllt, in einem PCR-Gefäß für 3 min bei 94 °C denaturiert und anschließend für 2 min auf 4 °C abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde der RT-Mix (je Ansatz bestehend aus 8 µl RT-Puffer A, 0.25 µl RNase-Inhibitor und 0.25 µl reverser Transkriptase) vorbereitet und der Reaktion zusammen mit einem Paraffinstückchen (Schmelzpunkt 55 °C) zugegeben. Danach erfolgte die reverse Transkription bei 37 °C für 30 min. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 80 °C für 2 min wurde das Paraffin geschmolzen, dabei die reverse Transkriptase denaturiert und der Ansatz danach auf 20 °C für 2 min und schließlich auf 4 °C für 2 min abgekühlt.

2.2.5 DNA-Techniken

2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für eine PCR nach reverser Transkription wurden je Ansatz 30 µl eines aus 10 µl PCR-Puffer B, 30 pMol des kodierenden Primers, 0.4 µl Taq-DNA-Polymerase und H₂O bestehenden PCR-Mixes dem RT-Ansatz hinzugegeben, und die PCR im Gesamtvolumen von 50 µl nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 94 °C unter folgenden Zyklusparametern durchgeführt:

Denaturierung: 94 °C, 30 s
Annealing: 45-60 °C, 30 s
Elongation: 72 °C, 30-150 s
Zykluszahl: 25

Zuletzt erfolgte ein abschließender Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C, ehe die PCR durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt wurde. Zur Beurteilung wurden 5 µl

2. Material und Methoden

des Ansatzes einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Bei PCRs ohne vorhergehende RT wurde ein PCR-Ansatz von 50 μ l bestehend aus ca. 100 ng DNA-Template, 30 pMol reversem und kodierendem Primer, 5 μ l Taq-Polymerase-10x-Puffer, 0.5 μ l 20 mM dNTPs, 0.4 μ l Taq-Polymerase und H₂O pipettiert und die PCR wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.5.2 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „Quick Change“(QC)-PCR

Bei dieser Methode diente ein doppelsträngiges Plasmid, in das eine Mutation eingefügt werden sollte, als Matrize für eine PCR, die mit einer DNA-Polymerase von besonders hoher Lese- und Korrekturgenauigkeit (*Pfu*-Polymerase, „proof reading“-Aktivität) durchgeführt wurde. Dabei wurde ein zueinander komplementäres Paar von Primern verwendet, in die die gewünschte Sequenzmutation eingefügt wurde. Desweiteren beinhalteten die Primer einen die Mutation in beide Richtungen flankierenden Sequenzbereich von 13 oder mehr Nukleotiden, der für eine stabile Anlagerung an das Template während der „Annealing“-Phase der PCR sorgte. Ein Standardansatz von 50 μ l setzte sich wie folgt zusammen: 5 μ l *Pfu*-Polymerase 10 x-Puffer, 5 μ l DTT, 1 μ l *Pfu*-Polymerase, 0.5 μ l 20 mM dNTPs, je ca. 50 pMol reverser und kodierender Primer, ca. 50-100 ng DNA-Template, H₂O ad 50 μ l. Nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 94 °C erfolgte die QC-PCR unter folgenden Zyklusparametern:

Denaturierung: 94 °C, 30 s
Annealing: 48-60 °C, 60 s
Elongation: 68 °C, 2 min/kb
Zykluszahl: 20-25

Danach wurde die PCR durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Nach einem abschließenden *DpnI*-Verdau wurde 1 μ l des Ansatzes einer Agarosegelelektrophorese unterzogen.

2.2.5.3 Radioaktive Markierung durch „Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gensonde

Die radioaktive Markierung von cDNA wurde mit dem „Nick“-Translationskit der Firma Amersham durchgeführt. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 4 µl dNTP-Mix (ohne dCTP), 25 µCi α (^{32}P)-dCTP, ca. 50-100 ng der zu markierenden Gensonde, H₂O und 2 µl Enzymlösung für 60-90 min bei 15 °C inkubiert. Dabei wurden durch die im Enzymmix enthaltene DNaseI gesetzte Einzelstrangbrüche durch die DNA-Polymerase I unter Austausch von nichtmarkiertem durch radioaktiv markiertes dCTP repariert und die Sonde so markiert. Für „Northern Blot“-Analysen von BVDV-Genomen wurden dazu Gensonden der genomischen Bereiche *Cla*I (11076)/*Aat*II (12259), *Cla*I/*Fse*I (12294) oder *Not*I (4918)/*Nsi*I (7465) des cDNA-Klons pCP7-5A verwendet, für „Northern Blot“-Analysen von KSPV-Genomen eine Gensonde des genomischen Bereichs *Eco*RI (5560)/*Nae*I (8340) des cDNA-Klons pAlfort-p447.

Die Nick-Translation wurde dann gestoppt, 60 µl TES zugefügt und die Sonde durch Gelzentrifugation über eine Sephadex-G50-Säule bei 1200 Upm für 2 min von freien Nukleotiden und damit von unspezifischer Radioaktivität abgetrennt.

2.2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte Bande wurde nach Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht von 302 nm auf dem Transilluminator zügig mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß verbracht. Nach Schmelzen des Gelstücks unter Schütteln bei 50 °C für 10 min wurde die enthaltene DNA mit dem „QUIAEX Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangabe isoliert. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Glaspartikel.

2.2.5.5 Enzymatische Spaltung von DNA

Die in dieser Studie verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA sequenzspezifisch. Es wurden dabei Enzyme eingesetzt, deren Erkennungssignal für die DNA-Spaltung zumeist aus einer bestimmten Hexanukleotidsequenz besteht. Dies ermöglichte das gezielte Ausschneiden gewünschter Sequenzbereiche aus einem größeren DNA-Molekül. Aus Mini-Präp gewonnene, rekombinante Plasmide aus PCR-Klonierungen wurden in der Regel einem diagnostischen *EcoRI*-Verdau unterzogen. Die Puffer und Inkubationsbedingungen wurden nach den Angaben der Hersteller gewählt.

2.2.5.5.1 cDNA-Linearisierung für die synthetische Transkription

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA vor *in vitro*-Transkription wurde (außer *Clal* für pNCP7- Δ *NaeI/SmaI* und *SnaBI* für pCP7-5A) immer *SmaI* verwendet.

2.2.5.5.2 DNaseI-Verdau

Um gegebenenfalls die in einem Transkriptionsansatz enthaltene, linearisierte cDNA zu degradieren, wurde je Ansatz von 20 μ l 1 μ l RNase-freie DNaseI zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.5.3 DpnI-Verdau von QC-PCR-Produkten

Nach der QC-PCR wurde nach Zugabe von 1 μ l *DpnI* ein Verdau von einer Stunde bei 37 °C durchgeführt, der die methylierte Template-DNA bakteriellen Ursprungs im Gegensatz zur PCR-generierten, unmethylierten DNA selektiv abbaute.

2.2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die Klonierung von aufgereinigten PCR-Produkten erfolgte durch enzymatische Ligation nach einer Aneinanderlagerung von A/T-Überhängen der PCR-Produkte mit komplementären Überhängen des linearisierten Vektors unter Verwendung des PCR-cloning^{plus}-kit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Bei älteren PCR-

2. Material und Methoden

Produkten konnte durch Anhängen von A-Überhängen mit dem „A-addition Kit“ der Fa. Qiagen die Klonierungseffizienz erheblich gesteigert werden.

Gerichtete Klonierungen von nach Restriktionsenzymverdau aufgereinigten DNA-Fragmenten wurden in einem Gesamtansatz von 10 µl, bestehend aus 1 µl T4-DNA-Ligase, 1 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer, variierenden Mengen der beiden zu ligierenden Partner (im Bereich von je 50 -250 ng DNA) und H₂O, über Nacht bei 14 °C in einem PCR-Gefäß ligiert. Die gezielte Ligation von aufgereinigten DNA-Fragmenten wurde dabei durch Aneinanderlagerung enzymspezifischer Überhänge erleichtert.

2.2.5.7 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung mit dem „Cycle-Sequencing Kit“ der Fa. Amersham wurde DNA aus Plasmidpräparation in einer Menge von 150-500 ng/kb mit 2 µl 5'-IRD800-markiertem Primer (verwendete Primer s. Tab. 5; 1pMol/µl) und H₂O zu einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt und vermischt. Von jedem Ansatz wurden je 6 µl in 4 PCR-Tubes pipettiert und in diese anschließend jeweils 2 µl von einem der vier Sequenziermixe hinzugegeben. Diese Mixe enthalten jeweils alle vier dNTPs, eine DNA-Polymerase sowie eines der vier NTPS in Didesoxy(dd)-Form. Anschließend erfolgte im Thermocycler die Sequenzierreaktion unter folgenden Zyklusparametern:

Denaturierung: 94 °C, 30 s
Annealing: 56 °C, 30 s
Elongation: 70 °C, 30 s
Zykluszahl: 30

In den Sequenzierungsreaktionen entstanden nach Syntheseinitiation durch die DNA-Polymerase am an die Zielsequenz angelagerten Primer unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren jeweilige Elongation durch Integration eines ddNTPs terminiert wurde. Abschließend wurde die Reaktion auf 10 °C abgekühlt und nach

2. Material und Methoden

Zugabe von 4 μl Auftrags- und Stoppuffer durch Erhitzen auf 70 °C für 90 s gestoppt.

2.2.5.8 DNA-Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierproben wurden für lange Läufe 4%-ige Polyacrylamid-Harnstoff-Gele einer Länge von 66 cm und einer Dicke von 0.25 mm verwendet. Diese bestanden aus 25.6 ml Sequagel XR, 6.4 ml Sequagel complete, 6.4 g Urea, 12 ml H₂O und 1.6 ml 10 x TBE-Puffer. Nach dem vollständigen Auflösen des Harnstoffs wurden 16 μl TEMED und 320 μl APS hinzugegeben und das Gel zügig mit einer 50 ml-Spritze durch einen aufgeschraubten 0.450 μm -Filter blasenfrei zwischen zwei gereinigte, in eine Haltevorrichtung eingepannte Glasplatten horizontal gegossen. Nach Einschieben eines Vorkamms erfolgte die Gelpolymerisation für 2 h. Die nach Herausziehen des Vorkamms gereinigte Gelapparatur wurde dann senkrecht in den Sequenzierautomaten eingesetzt und unter Verwendung von 1 x TBE-Kathoden- und -Anodenpuffer ein Vorlauf von 40 min bei 2000 V, 37 mA, 50 W, 45 °C gestartet. Danach wurde je 1 μl der Sequenzierproben in eine der 48 Taschen eines eingesetzten Haifischzahnkamms pipettiert und nach Einmessen des Geräts über Nacht die Gelelektrophorese unter den oben genannten Bedingungen durchgeführt. Das während der Elektrophorese der Sequenzierproben durch Laserlichtanregung im IR-Bereich erzeugte Bild wurde durch das Programm „Data Collection“ aufgezeichnet. Entsprechende DNA-Sequenzen wurden daraus mit dem Programm „Image Analysis“ gewonnen.

2.2.5.9 Konstruktion der cDNA-Klone

Alle für weitere Klonierungen verwendeten cDNA-Sequenzen wurden zuvor durch DNA-Sequenzanalysen kontrolliert. Wenn nicht anders vermerkt, beziehen sich alle Positionsangaben auf das Genom von BVDV-Stamm CP7-5A (Becher et al., 2000). Die für die Klonierungen verwendeten Primer sind den Tabellen 2 E, 3 B und 4 zu entnehmen.

2.2.5.9.1 p+ubi SGT

Zunächst wurde aus einer PCR, die mit den Primern *NheI*-T7-ubi und CP14-*AgeI* R und mit pC14.1 (siehe 2.1.3) als Matrize durchgeführt wurde, ein spezifisches Produkt kloniert. Dieser PCR-Klon beinhaltet am 5'-Ende eine *NheI*-Schnittstelle, gefolgt von einem T7-Promotor und Sequenzen von BVDV CP 14. Diese Sequenzen kodieren für die 5 C-terminalen AS des NS2-Gens von CP14, ein C-terminales Fragment und zwei komplette Monomere von zellulärem Ubiquitin, sowie für den N-terminalen Teil des NS3-Gens von CP14 und enden mit einer *AgeI*-Schnittstelle. Für die Konstruktion von p+ubi SGT wurde die Region zwischen den singulären *NheI*- (direkt vor der SP6-Promotorsequenz stromaufwärts von nt 1 der BVDV-cDNA-Sequenz gelegen) und *AgeI*-Schnittstellen (5336) von pCP7-5A durch das entsprechende cDNA-Fragment des PCR-Klons ausgetauscht.

2.2.5.9.2 p-ubi SGT

Es wurde aus einer PCR, die mit den Primern *NheI*-*SrfI*-ubi und CP14-*AgeI* R und mit pC14.1 (siehe 2.1.3) als Matrize durchgeführt wurde, ein spezifisches Produkt kloniert. Dieser PCR-Klon beinhaltet am 5'-Ende eine *NheI*- gefolgt von einer *SrfI*-Schnittstelle und dieselben Sequenzen von BVDV CP 14 wie p+ubi SGT (s.o.). Im Anschluss wurde für die Konstruktion von p-ubi SGT die Region zwischen den singulären *NheI*- (direkt vor der SP6-Promotorsequenz stromaufwärts von nt 1 der BVDV-cDNA-Sequenz gelegen) und *AgeI*-Schnittstellen (5336) von pCP7-5A

2. Material und Methoden

durch das entsprechende cDNA-Fragment des PCR-Klons ausgetauscht. Bei pCP7-5A war zuvor die *SmaI*-Schnittstelle direkt hinter dem letzten nt der BVDV-cDNA-Sequenz durch eine reverse T7-Promotorsequenz ersetzt worden.

2.2.5.9.3 p-CP7-5A

Aus einer PCR, die mit den Primern CP7-5A-*NheI*-*SnaBI* und P200 R und mit pCP7-5A als Matrize durchgeführt wurde, wurde ein spezifisches Produkt kloniert. Dieser cDNA-Klon beinhaltet am 5'-Ende eine *NheI*- gefolgt von einer *SnaBI*-Schnittstelle und die 5'-terminalen Sequenzen von pCP7-5A. Danach wurde die Region zwischen den singulären *NheI*- (direkt vor der SP6-Promotorsequenz stromaufwärts von nt 1 der BVDV-cDNA-Sequenz gelegen) und *XhoI* (222)-Schnittstellen von pCP7-5A durch das entsprechende cDNA-Fragment des PCR-Klons ausgetauscht. Bei pCP7-5A war zuvor die *SmaI*-Schnittstelle direkt hinter dem letzten nt der BVDV-cDNA-Sequenz durch eine reverse T7-Promotorsequenz ersetzt worden.

2.2.5.9.4 pNCP7-M1

Zur Konstruktion von pNCP7-M1 wurde das Fragment zwischen der *ClaI* (11076)- und der *AatII* (12259)-Schnittstelle von pNCP7-5A durch entsprechende Sequenzen von cDNA-Klon p3M2 (siehe 2.1.3) ersetzt. Die darin enthaltene Deletion der Nukleotide 12226-12229 entspricht dem genetischen Marker M 1 (Abb. 19 B).

2.2.5.9.5 p+ubi SGT-M1M2

Zunächst wurde eine QC-PCR mit den Primern Ol-CP7-11900- Δ *EcoRV* und Ol-CP7-11900- Δ *EcoRV* R und mit p3M2 (siehe 2.1.3) als Matrize durchgeführt. Dabei wurden zwei stille Mutationen in die bei 11904 gelegene *EcoRV*-Schnittstelle als genetischer Marker M 2 eingeführt (Abb. 22 B). Die Deletion der

2. Material und Methoden

Nukleotide 12226-12229 entspricht dem genetischen Marker M 1 (Abb. 19 B). Zur Konstruktion von p+ubi SGT-M1M2 wurde das *Cla*I (11076)-/*Aat*II (12259)-Fragment von p+ubiSGT durch entsprechende Sequenzen des QC-PCR-Klons ausgetauscht.

2.2.5.9.6 p+ubi SGT-M2M3

Zunächst wurde eine QC-PCR mit den Primern Ol-CP7-11900- Δ *Eco*RV und Ol-CP7-11900- Δ *Eco*RV R und mit p3M4 (siehe 2.1.3) als Matrize durchgeführt. Dabei wurden zwei stille Mutationen in die bei 11904 gelegene *Eco*RV-Schnittstelle als genetischer Marker M 2 eingeführt. Die Deletion der Nukleotide 12195-12198 stellt den genetischen Marker M 3 dar (Abb. 22 B). Zur Konstruktion von p+ubi SGT-M2M3 wurde das *Cla*I (11076)-/*Aat*II (12259)-Fragment von p+ubiSGT durch entsprechende Sequenzen des QC-PCR-Klons ausgetauscht.

2.2.5.9.7 pNCP7-*Hind*III/*Hind*III

Für sich anschließende Klonierungsschritte wurde der cDNA-Klon pNCP7-*Hind*III/*Hind*III durch Verdau von pNCP7-5A mit *Hind*III (Schnittstellen im Genom von CP7-5A bei 1901, 10155 und 10435) und anschließende Religation der den Proteus-Vektor flankierenden Sequenzen generiert.

2.2.5.9.8 pNCP7-GAA

Zunächst wurde eine QC-PCR mit den Primern Ol-CP7-RdRp-GAA und Ol-CP7-RdRp-GAA R und mit pNCP7-*Hind*III/*Hind*III als Matrize durchgeführt. Dabei wurde die den Nukleotiden 11285-11293 entsprechende Sequenz GGGGATGAC, die das aktive Zentrum der BVDV-Polymerase mit den aa GDD kodiert, zur die aa GAA kodierenden Sequenz GGGGCTGCC mutiert. Zur Konstruktion von pNCP7-GAA wurde anschließend das *Cla*I (11076)-/*Xho*I (222)-Fragment von pNCP7-5A durch entsprechende Sequenzen des QC-PCR-Klons ersetzt (23).

2. Material und Methoden

2.2.5.9.9 pNCP7- Δ *NaeI/SmaI*

Das Plasmid pNCP7- Δ *NaeI/SmaI* resultierte aus „blunt end“-Religation des *NaeI* (11491)-/*SmaI* (12294)-verdauten Plasmids pNCP7-5A und beinhaltet in Folge dessen eine Sequenzdeletion im Bereich zwischen diesen Schnittstellen (Abb. 23).

2.2.5.9.10 pNCP7- Δ *ClaI/ClaI*

Es wurde zunächst eine QC-PCR mit den Primern Ol-CP7-12080-*ClaI* und Ol-CP7-12080-*ClaI* R und mit pNCP7-*HindIII/HindIII* als Matrize durchgeführt. Dadurch wurde bei nt 12081 eine zusätzliche *ClaI*-Schnittstelle eingeführt. Der QC-PCR-Klon wurde dann *ClaI* (11076) -/*ClaI* (12081) geschnitten und unter Deletion von ca. 1 kb Sequenz religiert. Zur Konstruktion von pNCP7- Δ *ClaI/ClaI* wurde dann das *ClaI* (11076) -/*AatII* (12259)-Fragment von pNCP7-5A durch entsprechende Sequenzen des die Deletion tragenden QC-PCR-Klons ausgetauscht (Abb. 23).

2.2.5.9.11 pCP7-11449

Zunächst wurde eine QC-PCR mit den Primern Ol-CP7-QC-11450-*SmaI* und Ol-CP7-QC-11450-*SmaI* R und mit pNCP7- Δ *NaeI/SmaI* als Matrize durchgeführt. Dadurch wurde im resultierenden QC-PCR-Klon bei Position 11449 eine zusätzliche *SmaI*-Schnittstelle eingefügt, die dem genetischen Marker M 4 entspricht (Abb. 24 A). Zur Konstruktion von pCP7-11449 wurde anschließend das den Proteus-Vektor beinhaltende *ClaI* (11076) -/*XhoI* (222)-Fragment von pCP7-5A durch entsprechende Sequenzen des QC-PCR-Klons ausgetauscht.

2.2.5.9.12 pCP7-11284

Es wurde zunächst unter Verwendung von *Pfu*- statt *Taq*-DNA-Polymerase eine PCR mit den Primern Ol CP7-B49 und Ol-CP7-11284-*SmaI-FseI* R und mit pNCP7-5A als Matrize durchgeführt. Nach Behandlung mit dem „A-addition“-Kit

2. Material und Methoden

der Firma Qiagen wurde das PCR-Produkt kloniert. Durch die PCR wurde bei Position 11284 eine zusätzliche *SmaI*-Schnittstelle, gefolgt von einer *FseI*-Schnittstelle, eingefügt. Die *SmaI*-Schnittstelle entspricht dem genetischen Marker M 5 (Abb. 24 A). Zur Konstruktion von pCP7-11284 wurde dann das *ClaI* (11076) -/*FseI*-Fragment von pCP7-5A durch entsprechende Sequenzen des PCR-Klons ausgetauscht. Bei pCP7-5A war zuvor eine *FseI*-Schnittstelle in der Vektorsequenz stromabwärts vom letzten Nukleotid der BVDV-cDNA-Sequenz eingefügt worden.

2.2.5.9.13 p+SGT-CP7-11201

Zunächst wurde eine QC-PCR mit den Primern Ol-CP7-11900- Δ *EcoRV* und Ol-CP7-11900- Δ *EcoRV* R und mit einem cDNA-Klon als Matrize durchgeführt, der die stromabwärts von Nukleotid 10756 gelegenen Sequenzen von pCP7-5A enthält. Dabei wurden zwei stille Mutationen der bei 11904 gelegenen *EcoRV*-Schnittstelle als genetischer Marker M 2 eingeführt (Abb. 22 B). Dieses Plasmid wurde für eine PCR mit den Primern Ol CP7-*ClaI*-T7-M 11200 und Ol CP7-12260 R verwendet und ein spezifisches Produkt kloniert. Dieser PCR-Klon beinhaltet am 5'-Ende eine *ClaI*-Schnittstelle gefolgt von einem T7-Promotor sowie die cDNA-Sequenzen von pCP7-5A zwischen nt 11201 und nt 12260. Durch den kodierenden Primer wurde dabei eine stille Mutation der Nukleotide 11203 und 11206 eingefügt, die dem genetischen Marker M 6 entspricht (Abb. 24 B). Zur Konstruktion von p+SGT-CP7-11201 wurde dann das *ClaI* (11076) -/*AatII* (12259)-Fragment von pNCP7-*HindIII*/*HindIII* durch die entsprechende Sequenz des PCR-Klons ausgetauscht.

2.2.5.9.14 p+SGT-CP7-11450

Das aus der ersten QC-PCR für die Klonierung von von p+SGT-CP7-11201 stammende Plasmid (s.o.) wurde für eine PCR mit den Primern Ol CP7-*ClaI*-T7-M 11450 und Ol CP7-12260 R verwendet. Dieser PCR-Klon beinhaltet am 5'-Ende eine *ClaI*-Schnittstelle gefolgt von einem T7-Promotor sowie die cDNA-

2. Material und Methoden

Sequenzen von pCP7-5A zwischen nt 11450 und nt 12260. Durch den kodierenden Primer wurde dabei eine stille Mutation der Nukleotide 11452 und 11455 eingefügt, die dem genetischen Marker M 7 entspricht (Abb. 24 B). Zur Konstruktion von p+SGT-CP7-11450 wurde dann das *ClaI* (11076) -/*AatII* (12259)-Fragment von pNCP7-*HindIII/HindIII* durch die entsprechende Sequenz des PCR-Klons ausgetauscht.

2.2.5.9.15 p+ubi-Alfort

Zunächst wurden zwei PCRs mit pC14.1 (siehe 2.1.3, PCR 1) und dem cDNA-Klon pAlfort-p447 (siehe 2.1.3, PCR 2) als Matrize durchgeführt. Dabei wurden in der ersten PCR die Primer Ol *XhoI*-T7-NS2-ubi und Ol *ApaI*-ubi-3' R, in der zweiten PCR die Primer Ol Alfort-NS3-5'-*ApaI* und Ol Alfort-5690 R verwendet. Nach Klonierung eines spezifischen Produkts enthielt der von der ersten PCR erhaltene cDNA-Klon (1) Sequenzen, die einer *XhoI*-Schnittstelle entsprechen, gefolgt von einem T7-Promotor und Sequenzen von BVDV CP 14. Diese Sequenzen kodieren für die 5 C-terminalen AS von NS2 sowie für ein C-terminales Fragment und zwei komplette Monomere von zellulärem Ubiquitin. Daran schließt sich der 5'-terminale Teil des NS3-Gens von pAlfort-p447 an, in dem über den reversen Primer das nt 5145 von A zu C mutiert war. Diese stille Mutation generierte eine *ApaI*-Schnittstelle. Der von der zweiten PCR (s.o.) erhaltene cDNA-Klon (2) enthielt nach Klonierung des spezifischen Produkts den 5'-Bereich des NS3-Gens bis zu Nukleotid 5690 der cDNA-Sequenz von pAlfort-p447. In diesem Klon war über den kodierenden Primer wieder das nt 5145 von A zu C still mutiert worden, woraus eine *ApaI*-Schnittstelle resultierte. In einer anschließenden QC-PCR wurde bei diesem Klon eine zweite, im Polylinker des p-Drive-Vektors enthaltene *ApaI*-Schnittstelle unter Verwendung der Primer Ol p-Drive- Δ *ApaI* und Ol p-Drive- Δ *ApaI* R mutiert. In diesen Klon wurde nach *XhoI/ApaI*-Verdau das entsprechende Fragment aus cDNA-Klon (1) umgesetzt. Die verbleibende *ApaI*-

2. Material und Methoden

Schnittstelle im resultierenden cDNA-Klon (3) diene später als genetischer Marker M für Sequenzen von p+ubi-Alfort (Abb. 27 A). Für die Konstruktion von p+ubi-Alfort wurden abschließend die Sequenzen zwischen den singulären *Xho*I (214)/*Eco*RI (5560)-Schnittstellen von pAlfort-p447 durch das entsprechende Fragment von cDNA-Klon (3) ausgetauscht.

2.2.6 Proteinanalytische Methoden

2.2.6.1 Zellyse

Um Gesamtzellprotein zu gewinnen, wurden die Zellen einer „6-well“-Gewegekulturschalenvertiefung einmal mit PBS deficient gewaschen und dann nach Zugabe von 600 µl SDS-Lysispuffer für 10 min bei 4 °C geschüttelt. Die lysierten Zellen wurden dann in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 94 °C denaturiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung der SDS-PAGE orientierte sich an der Anleitung von Schägger und von Jagow, 1987.

Nach Reinigung und Einspannen der Glasplatten in eine vertikale Halteapparatur wurde zwischen diese zunächst 3 ml des Trenngels luftblasenfrei gegossen und bis zum Auspolymerisieren für 30 min mit Wasser überschichtet. Danach wurde auf das Trenngel das Sammelgel gegossen, das nach Einsetzen eines 10er Kamms für 15-30 min auspolymerisierte. Nach Entfernen des Kamms wurden die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, die anschließend mit 1 x Kathoden- und 1 x Anodenpuffer gefüllt wurde. Nach Ausspülen der Taschen wurden jeweils 10-15 µl der zuvor für 5 min bei 94 °C erhitzten Proben bzw. des Größenmarkers

2. Material und Methoden

aufgetragen und zunächst für 15-30 min bei 80 V (Sammellauf), dann für 1.5-2 h bei 120 V (Trennlauf) aufgetrennt.

2.2.6.3 Immunoblotanalyse nach Proteintransfer auf eine

Nitrozellulosemembran

Nach der SDS-PAGE wurde der Sammelgelanteil abgeschnitten und das verbleibende Trenngel in Kathodenpuffer gelegt. Auf den Boden der Trans-Blotapparatur wurden nun übereinander drei in Trenngelgröße geschnittene Filterpapiere und ein Stück Nitrozellulosemembran, die jeweils mit Anodenpuffer befeuchtet wurden, darauf das Trenngel und darüber drei mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. Unter regelmäßiger Kontrolle der Spannung wurde nach Auflegen des Deckels dann bei ca. 13 V für 30 min geblottet.

Die Nitrozellulosemembran wurde danach zur unspezifischen Absättigung freier Bindungsstellen für 1 h, 4 °C in einer Schale mit frisch angesetzter Magermilchlösung (1 g Trockenpulver auf 20 ml PBS/Tween) inkubiert, dreimal für je 10 min in PBS/Tween gewaschen und dann mit dem 1:8 in PBS/Tween verdünnten ersten Antikörper A18 über Nacht schwenkend inkubiert. Danach wurde wieder dreimal mit PBS/Tween gewaschen, mit dem zweiten, 1:10000 in PBS/Tween verdünnten, Meerrettichperoxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-Ak für eine Stunde inkubiert und wieder dreimal gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde das Renaissance[®] „Western Blot“-Kit der Fa. NEN nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Auswertung erfolgte durch spezifische Chemilumineszenz, die einen Röntgenfilm belichtete.

2.2.7 Analyse von Sequenzdaten

Sequenzvergleiche, Vorhersage der Restriktionsenzymchnittstellen, virtuelle Translation und RNA-Sekundärstrukturfaltung wurden mit dem Programm GCG

2. Material und Methoden

(Devereux et al., 1984), Softwarepaket HUSAR des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Charakterisierung eines *in vivo* RNA-Rekombinationssystems für BVDV

3.1.1 Etablierung eines RNA-Rekombinationssystems für BVDV

Um reproduzierbare Erkenntnisse über pestivirale RNA-Rekombination zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das erste *in vivo* RNA-Rekombinationssystem für BVDV entwickelt. In diesem System werden MDBK-Zellen zunächst mit dem nicht zytopathogenen (nzp) BVDV-Stamm NCP7 infiziert und anschließend mit dem subgenomischen, synthetischen RNA-Transkript +ubi SGT durch Elektroporation transfiziert. Das 5'-Ende von +ubi SGT besteht aus Genomanteilen des BVDV-Stamms CP14, die für die 5 C-terminalen Aminosäuren (aa) von NS2, ein C-terminales Fragment sowie zwei komplette Kopien von zellulärem Ubiquitin und N-terminale Anteile von NS3 kodieren (Tautz et al., 1993). An diese Sequenzen schließen sich linear und unter Einhaltung des ORFs der verbleibende Teil des NS3-Gens sowie die Gene für die weiteren viralen Nichtstrukturproteine NS4A, NS4B, NS5A und NS5B des BVDV-Stamms CP7-5A an. Das synthetische Transkript enthält darüber hinaus auch die 3'NTR von CP7-5A, nicht aber die 5'NTR, die essentielle *cis*-aktive Elemente für die virale Translation und Replikation enthält. Ebenfalls nicht vorhanden ist die genomische Region, die die NS N^{pro}, p7 und den überwiegenden Teil von NS2 sowie die Strukturproteine kodiert (Abb. 9 A). Durch mehrere unabhängig durchgeführte Transfektionen in nicht infizierte (n.i.) MDBK-Zellen konnte bestätigt werden, dass +ubi SGT nicht replikationskompetent ist (Abb. 18/S. 94, Daten nicht gezeigt).

Vorherige Untersuchungen zeigten bereits, dass die Anwesenheit Ubiquitin-kodierender Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen zur Expression von NS3 (Tautz et al., 1993) und zu pestiviraler Zytopathogenität führt (Becher et al., 2001b).

3. Ergebnisse

Entsprechend unserer Arbeitshypothese sollte RNA-Rekombination zwischen dem nicht replikationskompetenten Partner +ubi SGT und 5'-terminalen Anteilen des

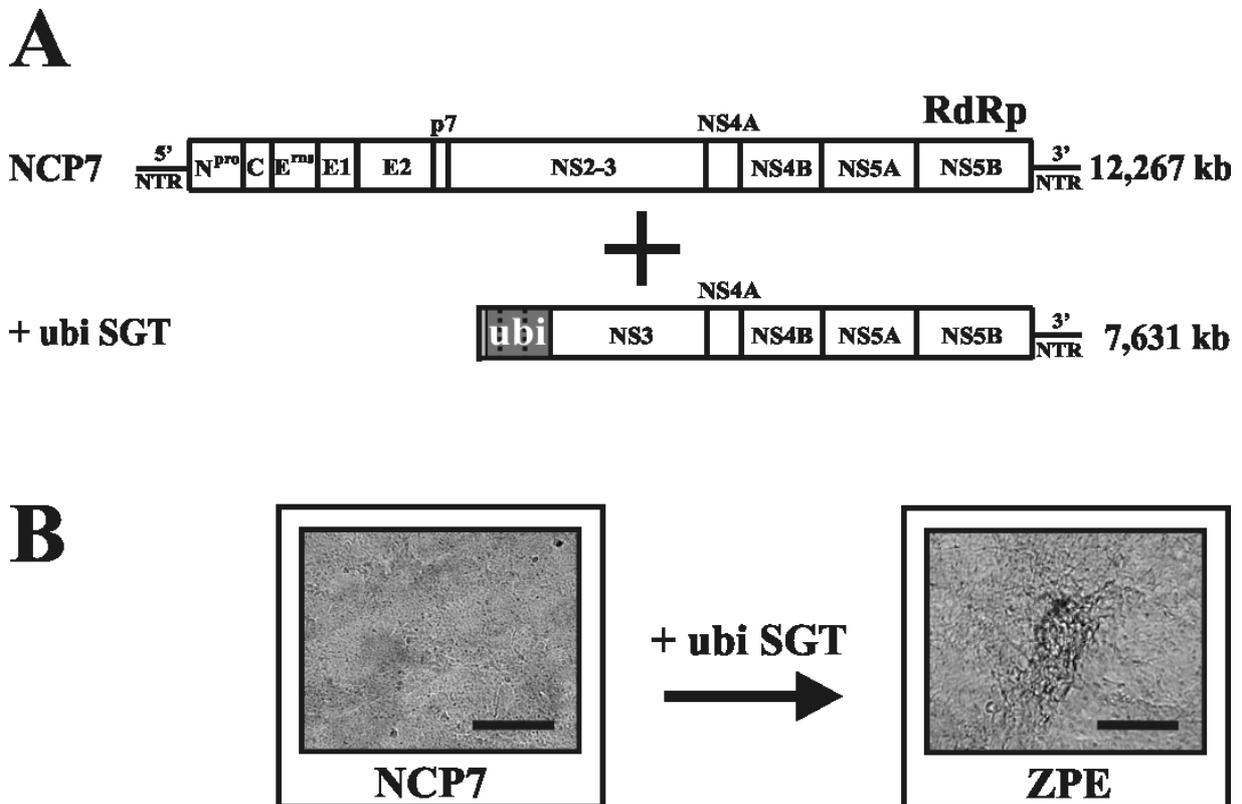


Abb. 9: *In vivo* RNA-Rekombinationssystem für BVDV

(A) Schematische Darstellung der Rekombinationspartner. Das RNA-Genom des nzp BVDV-Stamms NCP7 enthält einen großen offenen Leserahmen (Kasten), der von 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert wird. Die Positionen der viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine im viralen Polyprotein sind angezeigt. Das synthetische, replikationsinkompetente Transkript +ubi SGT kodiert für die C-terminalen fünf Aminosäuren des NS2 von BVDV-Stamm CP14 (hellgraue Box vor ubi), ein C-terminales Fragment sowie zwei komplette Monomere von zellulärem Ubiquitin (ubi; dunkelgraue Box), ein chimäres Nichtstrukturprotein (NS) 3, das im 5'-Bereich aus Sequenzen des BVDV-Stamms CP14 und im 3'-Bereich aus Sequenzen von BVDV CP7-5A besteht, sowie die NS NS4A bis NS5B. NS5B stellt die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) dar. Das Transkript +ubi SGT enthält außerdem die 3' NTR, nicht aber die 5' NTR, die essentielle cis-aktive Signale für die virale Translation und Replikation beinhaltet. Die Einteilung der Balken ist nicht maßstabsgetreu. Die Größe des Genoms von NCP7 und die Größe von +ubi SGT sind auf der rechten Seite in Kilobasen (kb) angezeigt.

(B) MDBK-Zellen sechs Tage nach Infektion mit NCP7 ohne Anzeichen eines ZPE (links), und NCP7-infizierte MDBK-Zellen vier Tage nach Transfektion mit +ubi SGT (rechts), die einen deutlichen zytopathischen Effekt (ZPE) zeigen. Der Balken entspricht 100 μ m.

3. Ergebnisse

replizierenden Plusstranggenoms von nzp BVDV NCP7 in der Entstehung von zp Virusgenomen und/oder viralen Subgenomen resultieren, solange dabei der ORF und mindestens eine komplette Kopie von Ubiquitin-kodierenden Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen von +ubi SGT erhalten bleiben. Die Entstehung replikationskompetenter Rekombinanten sollte über das Auftreten eines zytopathischen Effekts (ZPE) in Zellkultur nachgewiesen werden. Der von zp Pestiviren induzierte ZPE entspricht dem apoptotischen Untergang infizierter Zellen, der mit charakteristischen Veränderungen wie Abkugelung und Loslösen der Zellen vom Untergrund sowie Zellfragmentierung einhergeht und zur Bildung sichtbarer lytischer Plaques in Zellkultur führt. Tatsächlich war vier Tage nach der Transfektion von +ubi SGT-RNA in mit nzp BVDV NCP7 infizierte Zellen ein klarer ZPE zu erkennen (Abb. 9 B), nicht aber nach der Transfektion von n.i. Zellen oder nach der Elektroporation von mit nzp NCP7 infizierten Zellen ohne die Transfektion von +ubi SGT (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Einfluss der in den synthetischen Transkriptionsansätzen enthaltenen cDNA auf die Entstehung eines zytopathischen Effekts in Zellkultur

Die in den für die Rekombinationsexperimente verwendeten *in vitro*-Transkriptionsansätzen enthaltene, linearisierte cDNA p+ubi SGT macht im Vergleich zum synthetischen RNA-Transkript +ubi SGT nur einen Bruchteil der transfizierten Gesamtnukleinsäuremenge aus (Abb. 10, Spur 2). Unter Berücksichtigung einer möglichen Interaktion zwischen transfizierter cDNA und der genomischen RNA von NCP7 in elektroporierten Zellen konnte aber zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass diese relativ geringe cDNA-Menge und nicht das synthetische Transkript +ubi SGT für die Entstehung des beobachteten zytopathischen Effekts verantwortlich ist.

3. Ergebnisse

Um einen möglichen Einfluss der für die Transkription verwendeten cDNA auf die Entstehung eines ZPE in Zellkultur zu untersuchen, wurden in parallel zueinander durchgeführten Ansätzen entweder linearisierte p+ubi SGT-cDNA alleine oder unter Verwendung derselben cDNA-Mengen generierte, synthetische *in vitro*-Transkriptionsansätze ohne oder nach anschließendem DNaseI-Verdau in mit nzp BVDV NCP7 infizierte MDBK-Zellen transfiziert.

Direkt vor der Transfektion wurde jeweils ein Fünftel des eingesetzten Probenvolumens gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 10). Es zeigte sich, dass bei der Probe nach DNaseI-Verdau im Vergleich zu der Probe ohne DNaseI-Verdau (Abb. 10, Spur 2) sowohl die strukturelle Integrität als auch die Quantität der synthetischen RNA +ubi SGT erhalten war. Die parentale cDNA p+ubi SGT

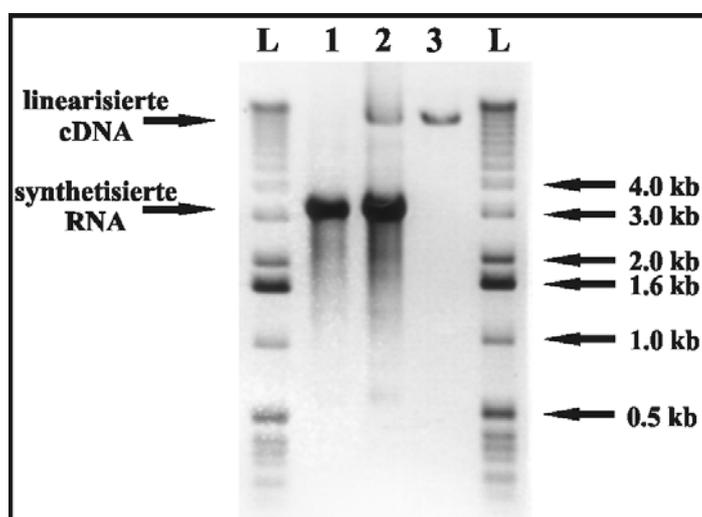


Abb. 10: Linearisierte cDNA p+ubi SGT und synthetisches Transkript +ubi SGT ohne und nach DNaseI-Verdau

Die Wanderungspositionen nach Gelelektrophorese von ca. 100 ng *Sma*I-linearisierter p+ubi SGT cDNA (Spur 2 und 3) sowie von der anschließend durch T7-Polymerase generierten, synthetischen RNA +ubi SGT (Spur 1 und 2) sind links durch Pfeile angezeigt. In Spur 2 sind 2 µl eines synthetischen *in vitro*-Transkriptionsansatzes ohne, in Spur 1 nach einem vollständigen Verdau mit DNaseI aufgetragen. Die Fragmentlängen des DNA-Markers (L) sind rechts in kb angezeigt. Die synthetische, einzelsträngige RNA +ubi SGT mit einer Länge von ca. 7,6 kb zeigt ein sich von doppelsträngiger DNA unterscheidendes Wanderungsverhalten.

3. Ergebnisse

hingegen war vollständig abgebaut (Abb. 10, Spur 1). Zum Vergleich wurde eine nur die cDNA p+ubi SGT enthaltende Probe aufgetragen (Abb. 10, Spur 3). Vier Tage nach Elektroporation war sowohl bei Zellen, die mit dem Transkriptionsansatz ohne DNaseI-Verdau transfiziert wurden, als auch bei Zellen, die mit dem Transkriptionsansatz nach vollständigem DNaseI-Verdau transfiziert wurden, das Auftreten eines ZPE feststellbar. Bei Zellen, die nur mit linearisierter p+ubi SGT cDNA transfiziert wurden, zeigten sich jedoch keine morphologischen Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Die hier beschriebenen Ergebnisse belegen, dass die in den *in vitro*-Transkriptionsansätzen enthaltene cDNA p+ubi SGT für die Entstehung eines ZPE in Zellkultur nicht verantwortlich ist.

3.1.3 Korrelation zwischen den Mengen an transfizierter +ubi SGT-RNA und der Anzahl voneinander unabhängig entstandener ZPEs in Zellkultur

Um untersuchen zu können, ob in einem Versuchsansatz mehrere ZPEs voneinander unabhängig entstehen, wurde der oben beschriebene experimentelle Ablauf modifiziert. Dazu wurden in vier unabhängig durchgeführten Versuchsreihen die mit NCP7 infizierten Zellen direkt nach der Transfektion mit +ubi SGT durch Aussäen in die Vertiefungen von zwei 24-Lochplatten aufgeteilt. Ausgehend von diesem Ansatz wurde dabei der Zusammenhang zwischen der transfizierten Menge des synthetischen Transkripts +ubi SGT und der Anzahl daraus resultierender, voneinander unabhängig entstandener ZPEs in Zellkultur untersucht. In allen entsprechenden Versuchen zeigte sich dabei eine direkte Korrelation zwischen der transfizierten Menge des synthetischen Transkripts und der Anzahl an beobachteten ZPEs. Durch eine einzige Transfektion ließen sich so bis zu 28 voneinander unabhängig entstandene ZPEs erzeugen (Abb. 11).

3. Ergebnisse

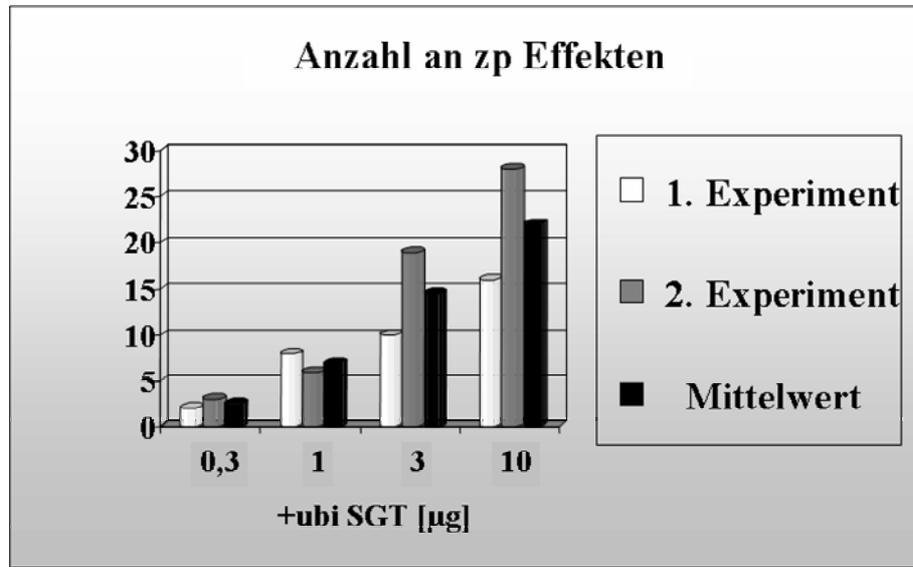


Abb. 11: Die Häufigkeit voneinander unabhängig entstandener zytopathischer Effekte in Zellkultur korreliert mit der Menge an transfiziertem +ubi SGT-RNA

Die Anzahl identifizierter, voneinander unabhängig entstandener ZPEs nach der Transfektion von mit nzp BVDV NCP7 infizierten MDBK-Zellen mit 0,3, 1, 3 oder 10 µg synthetischem Transkript +ubi SGT ist für zwei unabhängige Experimente (hell- und dunkelgraue Balken) zusammen mit den Durchschnittswerten (schwarze Balken) dargestellt.

Nur in zwei Versuchsreihen wurden Anteile von synthetischen *in vitro*-Transkriptionsansätzen in einer Bandbreite eingesetzt, die Gesamtnukleinsäuremengen von ca. 0,3 bis zu 10 µg entsprachen (Abb. 11).

3.1.4 Charakterisierung von zp BVDV-Rekombinanten

Von den zp Ereignissen, die aus den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Quantifizierungsexperimenten hervorgingen, wurden 46 zufällig ausgewählt und mit molekularbiologischen Methoden näher charakterisiert. Dazu wurde jeweils die Gesamt-RNA von Zellen, die einen ZPE zeigten, entweder direkt oder nach erster Zellkulturpassage des entsprechenden Überstandes geerntet und einer „Northern Blot“-Analyse unterzogen (Abb. 12). Die Analyse dieser RNAs zeigte im

3. Ergebnisse

Gegensatz zu RNA von Zellen, die nur mit NCP7 infiziert wurden, die Anwesenheit von rekombinanten BVDV-Genomen an, die in den meisten Fällen beträchtlich größer oder kleiner als das zum Vergleich herangezogene Genom von NCP7 waren (Abb.12, Daten nicht gezeigt). In vielen Proben war das Genom von NCP7 kaum oder gar nicht erkennbar.

Zur weiteren Untersuchung wurden die 46 voneinander unabhängig entstandenen pestiviralen Genome einer RT-PCR- und Nukleotidsequenzanalyse unterzogen. Für die RT-PCR-Analysen wurden Paare von Primern verwendet, die immer aus dem in der 5'-terminalen Region des NS3-Gens gelegenen, reversen Primer O1 CP7-NS3 R und einem von verschiedenen kodierenden Primern bestanden (Tab. 2 A). Zur Analyse jedes rekombinanten BVDV-Genoms wurde dabei der entsprechende kodierende Primer auf Grund der nach „Northern Blot“-Analyse geschätzten Größe der viralen genomischen RNA ausgewählt. Um auszuschließen, dass RT-PCR-Artefakte zur Generierung rekombinanter cDNA-Moleküle führen, wurde in entsprechenden Analysen immer auch Gesamtzell-RNA von mit NCP7 infizierten und von n.i. Zellen miteinbezogen. Auf diese Weise wurde für jedes der untersuchten 46 rekombinanten viralen Genome ein spezifisches Amplifikationsprodukt erhalten, nicht aber, wenn RNAs von mit NCP7 infizierten Zellen oder von n.i. Zellen für entsprechende RT-PCR-Analysen verwendet wurden. Nach dem Klonieren in einen bakteriellen Vektor wurden die Nukleotidsequenzen dieser spezifischen RT-PCR-Produkte durch Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen cDNA-Klonen bestimmt. Von jedem rekombinanten viralen Genom wurden dadurch abhängig von der Größe des jeweiligen Amplifikationsproduktes 0,7-2 kb sequenziert. Entsprechend der bei diesen Nukleotidsequenzanalysen ermittelten Rekombinations- („crossover“-) stellen beinhalten die 46 rekombinanten viralen Genome jeweils einzigartige

3. Ergebnisse

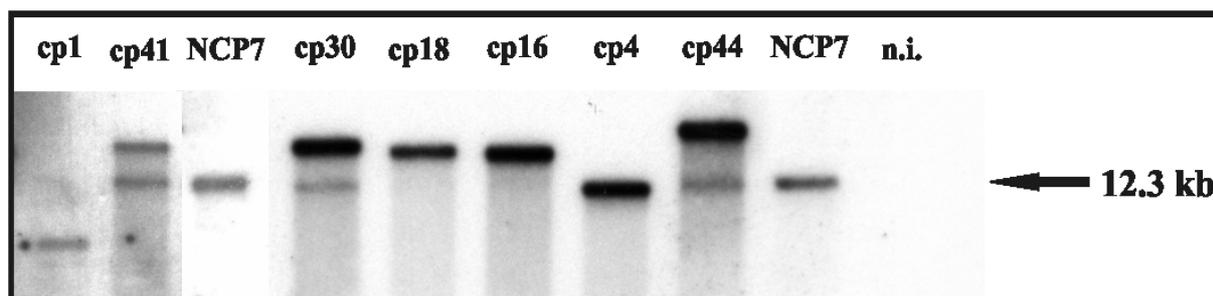
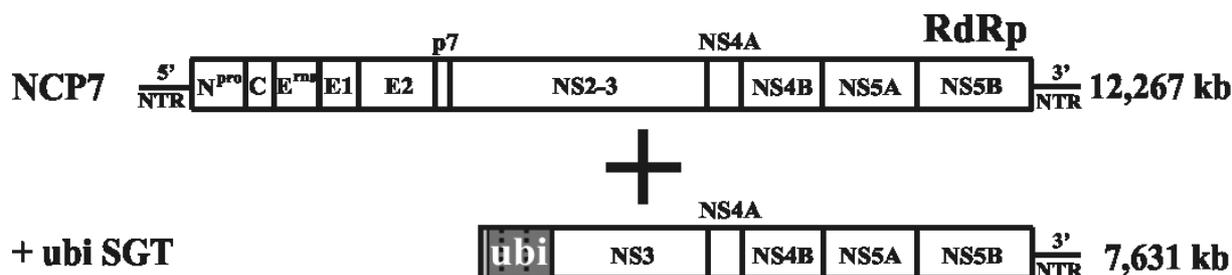


Abb. 12: „Northern Blot“-Analyse rekombinanter BVDV-Genome

Oben: Schematische Darstellung der Rekombinationspartner (s. Abb. 9A).

Unten: „Northern Blot“-Analysen der RNAs von nicht infizierten Zellen (n.i.), von mit NCP7 infizieren MDBK-Zellen und von mit NCP7 infizierten Zellen, in denen sieben rekombinante virale Genome ((R-) cp 1, (R-) cp 4, (R-) cp 16, (R-) cp 18, (R-) cp 30, (R-) cp 41 und (R-) cp 44) unabhängig voneinander nach Transfektion von +ubi SGT-RNA entstanden sind. Die Größen der rekombinanten viralen RNAs unterscheiden sich deutlich von der Größe der viralen RNA von NCP7. Für die Hybridisierung wurde ein radioaktiv markiertes cDNA-Fragment verwendet, das den Nukleotiden 11076 bis 12259 des Genoms von CP7-5A entspricht. Wanderungsposition und Größe der viralen RNA von NCP7 (in kb) sind rechts angezeigt.

Duplikationen oder Deletionen viraler Sequenzen (Abb. 13 bis 15). Das kürzeste rekombinante BVDV-Genom (R-cp 1) hat eine errechnete Länge von 8,010 kb, wohingegen das längste Genom (R-cp 46) 19,332 kb umfasst (Abb. 14). Bemerkenswerterweise stellt R-cp 46 somit das größte bisher beschriebene pestivirale Genom dar. Bei allen hier untersuchten rekombinanten Sequenzen war der ORF erhalten. Weiterhin zeigte sich, dass die 5'-Region von +ubi SGT in 13 von 46 Fällen vollständig in die rekombinanten BVDV-Genome integriert war. Die

3. Ergebnisse

R-cp 1	5' -AAAUGAACUUUUU- AC AAAACAUAACAAC 425 18 AGAGUCCACUCUGC AC CUGGUCCUCCGCC- 3'	R-cp 24	5' -GUAUAUGAAGAUUU- GGGACUUA AAAACCA 9205 73 AAGACCUUGACCGGC AAGACCAUCACCCUG- 3'
R-cp 2	5' -AGAAAAAGGAAAA- G UCAAGAGCAAGAAC 1075 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'	R-cp 25	5' -UAAAUGAGGAUUU- GG GACUUA AAAACCA 9205 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'
R-cp 3	5' -GUGAUCCACUCUG- G UGCCACUAGUCACU 3907 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'	R-cp 26	5' -GAUAUUGGGACUUA- AAACCAGUACUAGGA 9214 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'
R-cp 4	5' -AAUGGCAGAUUGG- UA UAUGGCUUAUCUA 4564 218 GCACCCUGUCUGAC UA CAACAUCAGAAA- 3'	R-cp 27	5' -UACUAGGAGAGAGA- G UGGUCCAGCCCA 9235 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'
R-cp 5	5' -CAGCACUUUAGAAU- UAAACUGGUCCAUGG 4676 266 UCCUCCGCCUCAGAG GUGGGAUGCAGAUUC- 3'	R-cp 28	5' -GGAGAGAGAGUGGUC- ACCGACCAGUGGUG 9241 187 AUCUUUGCCGGAAA CAGCUGGAAGAUGGC- 3'
R-cp 6	5' -GACCCUUCAGGCAG- GA AUACA AUGGGUUU 5044 158 AGGGCAUCCCCCA GA CCAGCAGAGGCUG- 3'	R-cp 29	5' -CCAGUGGUGGAUGUU- AACUUACAACCAGAA 9262 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'
R-cp 7	5' -CAACCAAAGUAAAA- UGAUCAUGGUAGGCA 5126 17 AAGAGUCCACUCUGC ACCUGGUCCUCCGCC- 3'	R-cp 30	5' -GGAUGUUAACUUAC- A ACCAGAAGUACAAG 9269 222 CCUGUCUGACUACA A CAUCCAGAAAGAGU- 3'
R-cp 8	5' -CUAUUGGUUUUGUGAC- AGUAUGGGUAGAACU 5431 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'	R-cp 31	5' -CACCCGUAUGCGAA- AA AACAGGCCCAAU 9361 59 UGCAGAUUCUCGUG AA GACCUAGCCCGC- 3'
R-cp 9	5' -AGUGGGAAGAAGA- GGAUCCA AACCCAC 5745 160 AGACAAGAGGGCAU CCCCCAGACCAGCA- 3'	R-cp 32	5' -UGGGUUGGAUGAA- GGA AGAUACCAGGAC 9419 1 GGA UGGGUACUGAGGA- 3'
R-cp 10	5' -UUAAGAGUGGUUUC- CAAACUGUUUCUAAA 5779 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'	R-cp 33	5' -ACAAAUAACAGAU- AGCUUGACCCUUUA 9997 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'
R-cp 11	5' -AAGAUACCAGCAUG- AACAGGGGGACUUU 5839 187 AUCUUUGCCGGAAA CAGCUGGAAGAUGG- 3'	R-cp 34	5' -UUGACCCUUUAUUU- GAGGAGCUAUUGCUA 10015 100 CUGGAGGUGGAGCC AGUGACCAUCAUGAG- 3'
R-cp 12	5' -GCAGUUUGCUUUUAU- AGGAAAAUUCACAG 6192 234 CAACAUCAGAAA GA GUCCACUCUGACCU- 3'	R-cp 35	5' -CUAAAAGCUUCAU- G AGGCAUCAGAGAU 10459 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'
R-cp 13	5' -UCUGAGAGCAUAAGA- GUGGUUGCAUGACU 6226 256 CUGCACCUGGUCCUC CGCCUCAGAGGUGG- 3'	R-cp 36	5' -GCAAUCAGAGAU- AAGAU AGACAAGAUGA 10476 130 AACGUCAGGCC AAGAU CCAAGACAAGA- 3'
R-cp 14	5' -CUGCCAGAUUUAGAU- ACAGUUGUAGACACA 6583 232 UACAACAUCAGAAA GAGUCCACUCUGCAC- 3'	R-cp 37	5' -UUCAUACAUAAGCC- CA ACCCAGCCUAGA 10549 188 UCUUUGCCGGAAA CA GCUGGAAGAUGGC- 3'
R-cp 15	5' -UGCCCCCGCUUUA- A AGAAAACUGGAAG 7541 6 GGUACUGAGGAAAG A GUCCACUCUGACC- 3'	R-cp 38	5' -UUCUAGAGAAGAA- GAA UGUUGGAGAUGA 10645 2 GAUGGGUACUGAG GAA AGAUCCACUCUG- 3'
R-cp 16	5' -CUGAAACCAACAGG- AAGGAAGGCGAUUCG 7829 11 UGAGGAAGAGUCCA CUCUGCACCUGGUCC- 3'	R-cp 39	5' -GAGAGAUGUCAGUGA- UGAUUGGCAUUCAGG 10773 252 CACUCUGCACCUGGU CCUCCGCCUCAGAGG- 3'
R-cp 17	5' -UUAGUACCACAAUUAU- ACAAACUUACCUCU 8018 257 UGCACCUGGUCCUC GCCUCAGAGGUGGA- 3'	R-cp 40	5' -UAAAACAAGACUAG- CC AUCACUAAAGUAA 10850 63 GAUCUUCGUGAAGA CC UUGACCGCAAGA- 3'
R-cp 18	5' -CCAGAGAAAAUAU- A AUGGCCUUUAUUGA 8277 187 AUCUUUGCCGGAAA A CAGCUGGAAGAUUG- 3'	R-cp 41	5' -GGAAUGGGAUUUUGU- U CAUUAACCAUAG 10967 171 AGACCAGCAGAGGC U GAUCUUUGCCGGAA- 3'
R-cp 19	5' -UGGGUUUACUACA- A AGGCUGGGAGCAA 8354 219 CACCCUGUCUGACU A CAUCCAGAAAGAGU- 3'	R-cp 42	5' -CAUAAGAAUUGGAC- A AAGGGUAGUGGCC 11165 90 GACCAUCACCCUGG A GGUGGAGCCAGUG- 3'
R-cp 20	5' -AAGGGAAGAUAGGA- ACCUGUCUGGAAUU 8468 251 CCACUCUGCACCUGG UCCUCCGCCUCAGAG- 3'	R-cp 43	5' -UAACAGAGAAGGGC- UGGGAUUAAGUUUG 11333 8 UACUGAGGAAGAGU CCAgUCUGCACCUGG- 3'
R-cp 21	5' -ACAAACAACUAUCUA- AGAGUAGAAACUAAG 8626 1 GGAUGGGUACUGAGG- 3'	R-cp 44	5' -UUUCACAGCAGCCA- G AGACAUCUCAUCA 11674 1 G GAUGGGUACUGAGG- 3'
R-cp 22	5' -UCAACUAUAGAGUCA- CAAAGUACUUAUGG 8765 191 UUGCCGGGAACAGC UGGAAGAUUGCCGCA- 3'	R-cp 45	5' -AGAUGAAUAGGUA- A GAAUUUGUGUGAAU 11750 18 AGAGUCCACUCUGC A CCUGGUCCUCCGCC- 3'
R-cp 23	5' -CAAUUUAACAGGUU- AAUUGAAUUGGUACA 9108 60 GCAGAUUCUGUGAA GACCUAGCCGGCAA- 3'	R-cp 46	5' -GUAAGAAUUUGUGU- GA AUUAAAAGGACG 11761 5 GGUACUGAGGAAA GA GUCCACUCUGCAC- 3'

Abb. 13: Nukleotidsequenzen der „crossover“-Regionen der zp BVDV-Rekombinanten R-cp 1 bis R-cp 46

3. Ergebnisse

Legende zu Abb. 13 (S. 88): Nukleotidsequenzen der „crossover“-Regionen der zp BVDV-Rekombinanten R-cp 1 bis R-cp 46

Für die rekombinanten BVDV-Genome R-cp 1 bis R-cp 46 sind die Sequenzen der beteiligten Rekombinationspartner NCP7 (oben) und +ubi SGT (unten) im Bereich der jeweiligen Rekombinationsstelle dargestellt. Flankierende Zahlen beziehen sich auf die Genome von CP7-5A (oben) und +ubi SGT (unten). Die resultierende rekombinante Sequenz ist durch hellgraue Boxen, Übereinstimmungen der Nukleotidsequenz zwischen den parental RNA-Molekülen im Übergangsbereich sind durch dunkelgraue Kästchen hervorgehoben. Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen den rekombinanten und ihren parental Sequenzen sind durch Kleinbuchstaben angezeigt (z.B. R-cp 12). Die Nummerierung der Rekombinanten entspricht der der „Northern Blot“-Analysen (Abb. 12, Daten nicht gezeigt).

verbleibenden 33 Rekombinanten enthielten eine 5'-verkürzte, aber immer noch mindestens ein komplettes Ubiquitinmonomer kodierende Version von +ubi SGT. Somit korrelierte bei allen 46 rekombinanten Genomen die Ausprägung eines zp Biotyps mit der Anwesenheit von Ubiquitin-kodierenden Sequenzen direkt vor dem viralen NS3-Gen (siehe 3.1.1). In Bezug auf den replizierenden Rekombinationspartner NCP7 waren die Rekombinationsstellen („crossover sites“) zwar über das ganze Genom verteilt, allerdings mit einer Präferenz für die Region, die die NS kodiert. Interessanterweise fanden sich 7 der 46 „crossover sites“ in einer 66 Nukleotide umfassenden Region des NS5A-Gens (Abb. 15). Obwohl die RT-PCR- und Sequenzanalysen keine Hinweise auf das Vorkommen multipler Rekombinationsereignisse lieferten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche genomische Duplikationen oder Deletionen außerhalb der analysierten genomischen Regionen der rekombinanten zp BVDV-Genome vorlagen. Bei 23 Rekombinanten waren bei beiden Rekombinationspartnern in der Nähe der jeweiligen Rekombinationsstelle Nukleotide identisch, weshalb hier die „crossover sites“ nicht eindeutig bestimmt werden konnten. Ein identisches Nukleotid wurde bei 12 Rekombinanten (R-cp 2 und 11 weitere), zwei und drei identische Nukleotide wurden bei jeweils acht (R-cp 1 und sieben weitere) bzw. zwei Rekombinanten (R-cp 32 und R-cp 38) und fünf identische Nukleotide wurden bei

3. Ergebnisse

einer Rekombinanten (R-cp 36) gefunden (Abb. 13, dunkle Kästchen). Bei den anderen 23 rekombinanten Sequenzen waren die Rekombinationsstellen exakt bestimmbar.

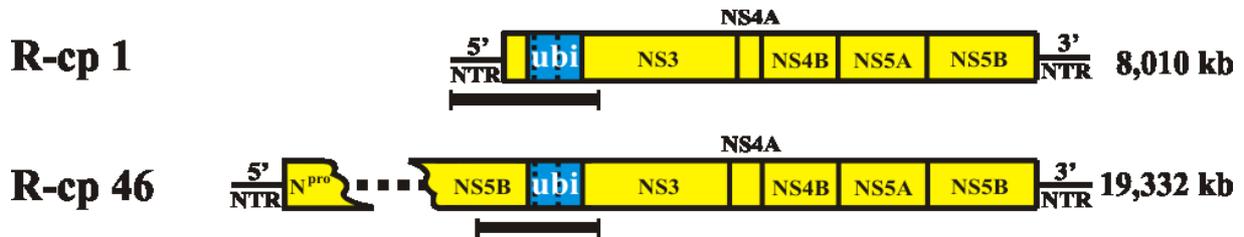


Abb. 14: Genomorganisation von R-cp 1 und R-cp 46

Schematische Genomorganisation und errechnete Länge des kürzesten Subgenoms (R-cp 1, oben) und des größten Genoms mit duplizierten Sequenzen (R-cp 46, unten), die aus RNA-Rekombination zwischen dem Genom von NCP7 und +ubi SGT hervorgegangen sind. R-cp 46 stellt das größte bislang beschriebene pestivirale Genom dar. Beide RNAs enthalten von +ubi SGT stammende Ubiquitin-kodierende Sequenzen (blau). Für R-cp 46 ist die Region zwischen der 5' NTR und der Insertion Ubiquitin-kodierender Sequenzen teilweise durch Punkte ersetzt. Die mit schwarzen Linien unterlegten Genomabschnitte wurden sequenziert.

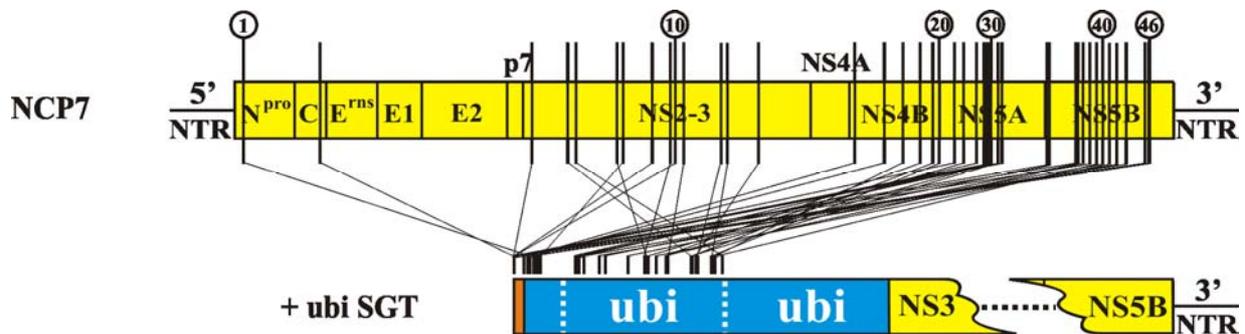


Abb. 15: Lage der Rekombinationsstellen von R-cp 1 bis R-cp 46 in beiden parentalen RNAs

Die mittels Sequenzanalysen erhaltenen „crossover sites“ der 2p Rekombinanten R-cp 1 bis R-cp 46 (siehe Abb. 13) sind durch Linien zwischen den beteiligten Rekombinationspartnern NCP7 (oben) und +ubi SGT (unten) dargestellt. Die eingekreisten Zahlen über dem Genom von NCP7 beziehen sich auf die Nummerierung der Rekombinanten R-cp 1 bis R-cp 46. Die fünf Kodons des NS2-Gens sind in orange, die das Polyubiquitinfragment kodierende 5'-Region von +ubi SGT ist in blau hervorgehoben. Für +ubi SGT ist die Region zwischen den Ubiquitin-kodierenden Sequenzen und dem NS5B-Gen teilweise durch Punkte ersetzt. Die relative Größe der Genomabschnitte zueinander ist nicht maßstabsgetreu.

3.2 Mechanistische Studien zur RNA-Rekombination

3.2.1 Einfluss der Polarität des synthetischen Transkripts +ubi SGT

Um den Einfluss der Polarität der transfizierten RNA-Moleküle auf die im etablierten System beobachtete RNA-Rekombination zu untersuchen, wurden entsprechende Studien mit dem synthetische Transkript –ubi SGT durchgeführt; –ubi SGT repräsentiert den zu +ubi SGT korrespondierenden Minusstrang (Abb. 16). Durch mehrere unabhängig durchgeführte Transfektionen in n.i. MDBK-Zellen konnte bestätigt werden, dass -ubi SGT allein nicht replikationskompetent ist (Daten nicht gezeigt). Auch entwickelte sich in mehreren Experimenten nach der Transfektion von ca. 10 µg –ubi SGT-Transkript in mit BVDV NCP7 infizierte Zellen kein ZPE (Abb. 16).

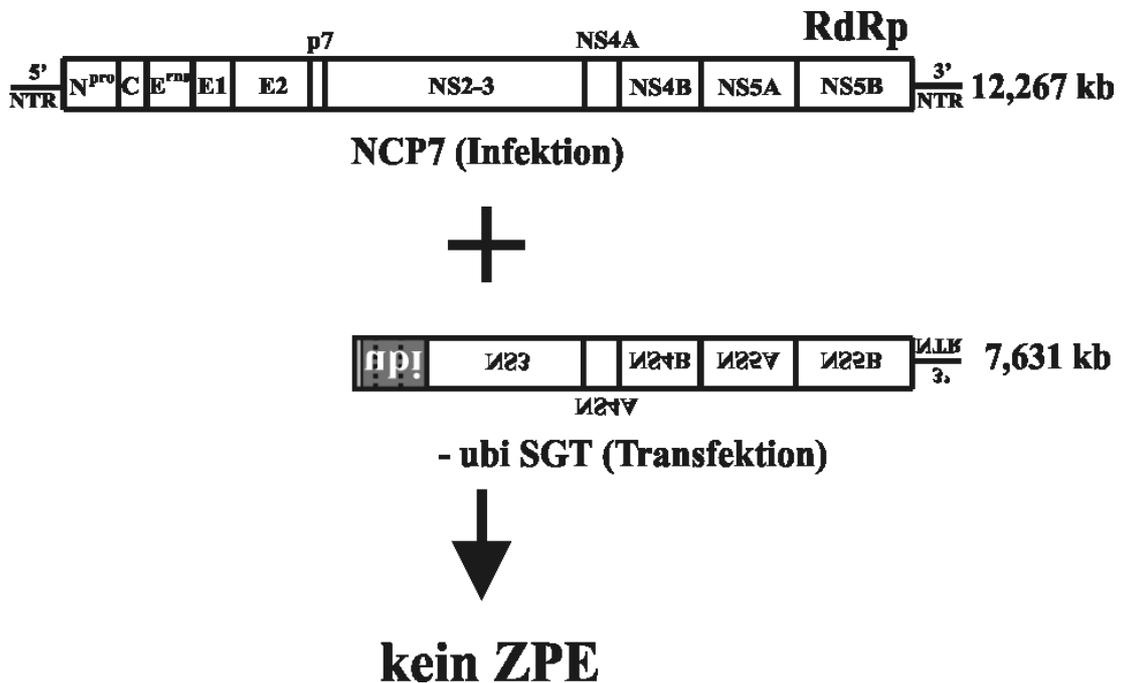


Abb. 16: Transfektion von –ubi SGT in mit BVDV NCP7 infizierte Zellen

Nach Transfektion von –ubi SGT-RNA in mit nzp BVDV NCP7 infizierte Zellen konnte kein ZPE beobachtet werden. Die dargestellte Spiegelung von +ubi SGT verdeutlicht die negative Polarität der synthetischen RNA -ubi SGT.

3. Ergebnisse

Im Unterschied dazu hatte bei entsprechenden mit +ubi SGT durchgeführten Experimenten bereits weniger als ein Dreißigstel dieser Transkriptmenge zum Entstehen mehrerer zp BVDV-Rekombinanten in Zellkultur geführt (Abb. 11).

3.2.2 Untersuchungen zur Replikationsinitiation des Minusstrangs von zp BVDV CP7-5A

Dass in dem oben beschriebenen Experiment kein ZPE auftrat, schließt das Entstehen rekombinanter Virusgenome von negativer Polarität nicht aus. Es sollte daher untersucht werden, ob von einem replikationskompetenten BVDV-Genom der Minustrang eines zweiten zp BVDV-Genoms *in trans* repliziert werden kann. Nur dann könnte es im vorliegenden System nach der Entstehung von rekombinanten, zp Virusgenomen negativer Polarität überhaupt zur Ausbildung eines ZPE in mit NCP7 infizierten Zellen kommen. Im Folgenden wurde dazu zunächst das synthetische Transkript des replikationskompetenten nzp BVDV-Subgenoms NCP413 in n.i. MDBK-Zellen elektroporiert. Der Genomaufbau von NCP413 basiert auf dem von NCP7-5A, der den in unserem Labor verwendeten cDNA-Klon des BVDV-Stamms NCP7 darstellt. Allerdings weist NCP413 eine interne Deletion von ca. 3 kb im Bereich der für N^{pro} bis E2 kodierenden Sequenzen auf (s. 2.1.3). Die für die pestivirale Replikation essentiellen Genomabschnitte, die aus den für NS3 bis NS5B kodierenden Sequenzen und den ORF flankierenden viralen 5'- und 3'-NTRs bestehen, sind jedoch vorhanden (Abb. 17, oben). Die elektroporierten Zellen wurden anschließend mehrfach passagiert, um eine Ausbreitung von NCP413 durch Zellteilung von erfolgreich transfizierten Zellen zu gewährleisten. Im Anschluss konnte durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) die Anwesenheit von pestiviralem NS3 in nahezu allen Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Es wurde nun das synthetische Transkript -CP7-5A erzeugt, das dem vollständigen Minustrang des zp BVDV-Stamms CP7-5A entspricht. Abgesehen von wenigen

3. Ergebnisse

Punktmutationen und einer im NS2-Gen gelegenen Duplikation viraler Sequenzen entspricht das Genom von CP7-5A dem von NCP7-5A (Abb. 17). Im Folgenden wurde das synthetische Transkript –CP7-5A entweder in n.i. MDBK-Zellen oder in die mit NCP413 persistent transfizierte MDBK-Zellpopulation transfiziert. In beiden Fällen konnte nach mehrtägiger Inkubation der transfizierten Zellen kein

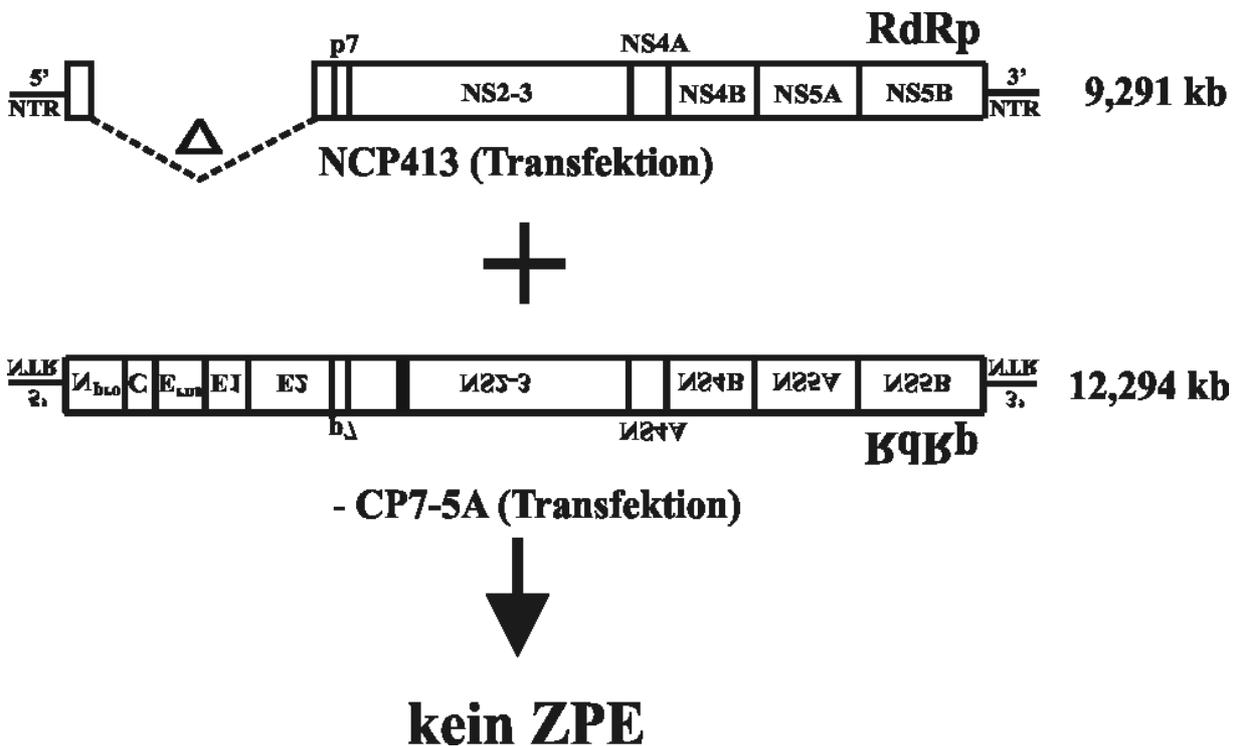


Abb. 17: Untersuchung zur Initiation der Replikation des Minusstrangs -CP7-5A

Schematische Darstellung der transfizierten RNAs.

Oben: Das nzp BVDV-Subgenom NCP413 enthält einen großen offenen Leserahmen (Kasten), der von viralen 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert wird. Die Positionen der viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine im abgeleiteten Polyprotein sind gezeigt. Die im Bereich der für N^{pro} bis E2 kodierenden Sequenzen eingefügte genomische Deletion von ca. 3 kb ist durch ein Δ gekennzeichnet.

Mitte: Die dargestellte Spiegelung der Genomorganisation von CP7-5A verdeutlicht die negative Polarität der synthetischen, replikationsinkompetenten RNA –CP7-5A. Ein schwarzer Balken zeigt eine Duplikation viraler Sequenzen von 27 Nukleotiden im NS2-Gen an, die im Kontext des infektiösen Plusstranggenoms ursächlich für virale Zytopathogenität ist (s. Abb. 7 B). Die Einteilung der Genomabschnitte ist nicht maßstabsgetreu. Die Größen des Genoms von NCP413 und die Größe von –CP7-5A sind auf der rechten Seite in Kilobasen (kb) angegeben.

Unten: Nach Transfektion von mehreren μ g –CP7-5A-RNA in eine mit BVDV NCP413 transfizierte MDBK-Zellpopulation konnte kein ZPE beobachtet werden.

3. Ergebnisse

ZPE beobachtet werden. Eine „Northern Blot“-Analyse der RNA von Zellen, die zuvor mit NCP413 transfiziert worden waren und 6 Tage nach der Transfektion mit -CP7-5A-RNA geerntet wurden, bestätigte die Anwesenheit einer subgenomischen BVDV-RNA, nicht aber die der genomischen RNA von CP7-5A von etwa 12.3 kb (Abb. 18, rechte Spur, SG). Dies beweist einerseits die fehlende Infektiosität der -CP7-5A-RNA, legt andererseits aber auch nahe, dass die Replikation des Minusstrangs -CP7-5A auch durch den Replikationsapparat des zusätzlich anwesenden, replikationskompetenten BVDV-Subgenoms NCP413 *in trans* nicht initiiert werden konnte. Ein ZPE trat auch nicht auf, wenn -CP7-5A-RNA in mit NCP7 infizierte Zellen transfiziert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Stabilität von +ubi SGT nach Transfektion

Desweiteren wurde untersucht, welche Stabilität die in n.i. Zellen transfizierte +ubi SGT-RNA aufweist und ob die Stabilität durch die Anwesenheit des replizierenden Genoms von NCP7 beeinflusst wird.

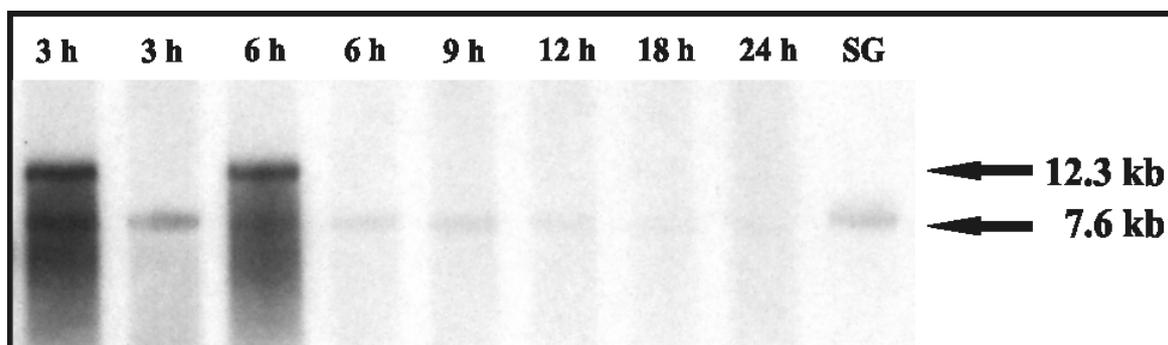


Abb. 18: Stabilität von +ubi SGT nach Transfektion

„Northern Blot“-Analyse von Gesamtzell-RNA aus mit NCP7 infizierten Zellen (von links: Spuren 1 und 3) und aus nicht infizierten Zellen, die alle jeweils mit der identischen Menge von +ubi SGT transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten post transfectionem geerntet wurden (von links: Spuren 2 und 4 bis 8). Als Größenmarker wurde zusätzlich eine Probe von mit dem BVDV-Subgenom NCP 413 (SG) transfizierten Zellen aufgetragen. Das Genom von NCP413 hat eine Länge von ca. 9.3 kb (s. Abb. 17). Rechts sind die Laufhöhe und die Größe von +ubi SGT und vom NCP7-Genom angegeben.

3. Ergebnisse

Dazu wurden (i) mit BVDV NCP7 infizierte Zellen und (ii) nicht infizierte Zellen mit jeweils gleichen Mengen von +ubi SGT (ca. 10 µg Transkript) transfiziert und jeweils ein Sechstel der Zellen 3 h und 6 h, bei (ii) auch noch 9 h, 12 h, 18 h und 24 h post transfectionem (p.t.) geerntet und einer „Northern Blot“-Analyse unterzogen. Es zeigte sich, dass die Mengen an +ubi SGT in n.i. und infizierten Zellen zu den beprobten Zeitpunkten etwa vergleichbar waren. Desweiteren konnte eine deutliche Abnahme der Mengen an +ubi SGT-RNA im Zeitraum von 3 h bis 24 h p.t. beobachtet werden (Abb. 18). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die +ubi SGT-RNA von NCP7 *in trans* nicht repliziert wird.

3.2.4 RNA-Rekombination nach Kotransfektion von zwei synthetischen RNAs in nicht infizierte Zellen

Es sollte experimentell überprüft werden, ob RNA-Rekombination auch nach Kotransfektion von zwei synthetischen Transkripten in n.i. Zellen auftritt. Dazu wurden zunächst infektiöse und replikationskompetente, vom cDNA-Gesamtklon des nzp BVDV-Stamms NCP7-5A transkribierte RNA zusammen mit +ubi SGT-RNA in n.i. MDBK-Zellen transfiziert. Dies führte zum Auftreten eines die Entstehung von zp BVDV-Rekombinanten durch RNA-Rekombination anzeigenden ZPE in Zellkultur (Abb. 19 A, oben). Ausgehend von der Beobachtung, dass RNA-Rekombination auch nach der Kotransfektion von zwei synthetischen Transkripten in n.i. Zellen beobachtet werden kann, wurde das Rekombinationssystem weiter modifiziert. Die Einführung genetischer Veränderungen in beide Rekombinationspartner erlaubte es, den Zusammenhang zwischen RNA-Rekombination und der Replikationskompetenz der beteiligten Partner genauer zu untersuchen. Im Folgenden wurden so verschiedene Derivate beider Rekombinationspartner erzeugt und Paare entsprechender RNAs in n.i. Zellen kotransfiziert.

3.2.5 RNA-Rekombination nach Kotransfektion von zwei replikationsinkompetenten RNAs

Um zu untersuchen, ob die Replikationskompetenz der beteiligten Partner für die in diesem System beobachtete RNA-Rekombination notwendig ist, wurde eine im Kontext des infektiösen Gesamtklons pCP7-5A letale Deletion von 4 Nukleotiden (Pankraz, A., mündliche Mitteilung) in die 3' NTR des nzp Gesamtklons pNCP7-5A eingefügt (Abb. 19, Marker M1). Ein von diesem cDNA-Konstrukt (pNCP7-M1) erhaltenes synthetisches Transkript wurde mehrfach in Mengen von bis zu 10 µg in n.i. Zellen transfiziert. Jeweils 4 Tage danach konnte durch IF pestivirales NS3 nicht nachgewiesen werden; dies belegt die fehlende Infektiosität von NCP7-M1 (Daten nicht gezeigt). Hingegen konnte in drei unabhängigen Experimenten

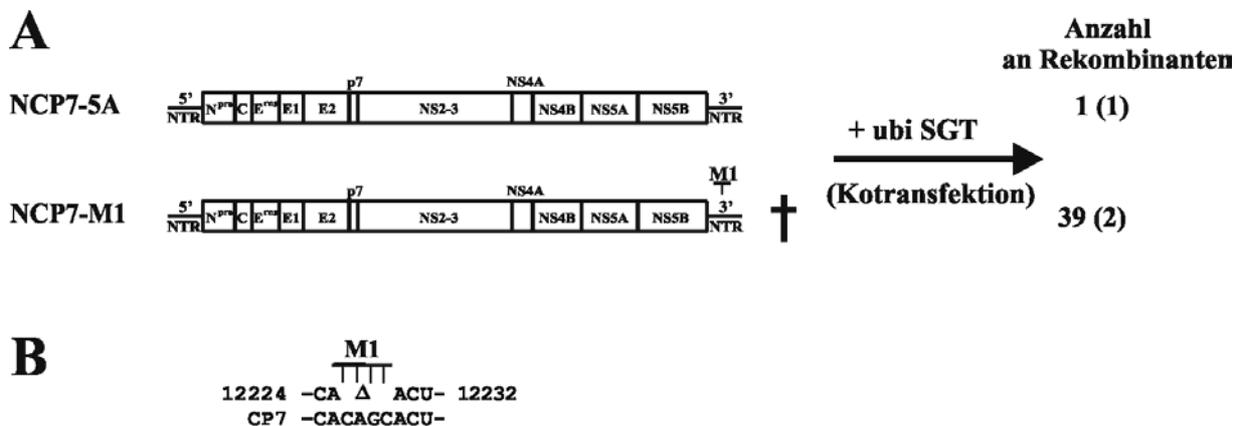


Abb. 19: RNA-Rekombination in nicht infizierten Zellen nach Kotransfektion von zwei synthetischen Transkripten

(A) Schematischer Genomaufbau von NCP7-5A und der Mutante NCP7-M1. Das Kreuz zeigt die fehlende Infektiosität der NCP7-M1-RNA an. M1: Lokalisation des genetischen Markers. Rechts ist die Anzahl der entstandenen Rekombinanten nach Kotransfektion von +ubi SGT-RNA und RNA von NCP7-5A oder NCP7-M1 in n.i. MDBK-Zellen angegeben. Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Anzahl der jeweils unabhängig durchgeführten Experimente.

(B) Vergleich von Nukleotidsequenzen des Genoms von NCP7-M1, das eine letale Deletion (Δ) von vier Nukleotiden (genetischer Marker M1) in der 3' NTR enthält (oben), mit dem entsprechenden Genomabschnitt von CP7 (unten). Zahlen beziehen sich auf das Genom von CP7-5A.

3. Ergebnisse

nach Kotransfektion von NCP7-M1- und +ubi SGT-RNA in n.i. Zellen durch lichtmikroskopische und IF-Analysen (Abb. 20) das Auftreten von insgesamt 39 rekombinanten, autonom replizierenden zp (2) und nzp (37) Viren beobachtet werden (Abb. 19 A, unten). Zusammengefasst belegt dieses Experiment, dass die in unserem System nach Kotransfektion synthetischer RNAs auftretenden Rekombinationsereignisse von der autonomen Replikationskompetenz der beteiligten Rekombinationspartner unabhängig sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass die funktionelle Integrität der 3'NTR von NCP7 für die Entstehung replizierender Rekombinanten nicht notwendig ist. Aus dieser Beobachtung und der Tatsache, dass eine funktionelle virale 3'NTR für replikationskompetente Rekombinanten

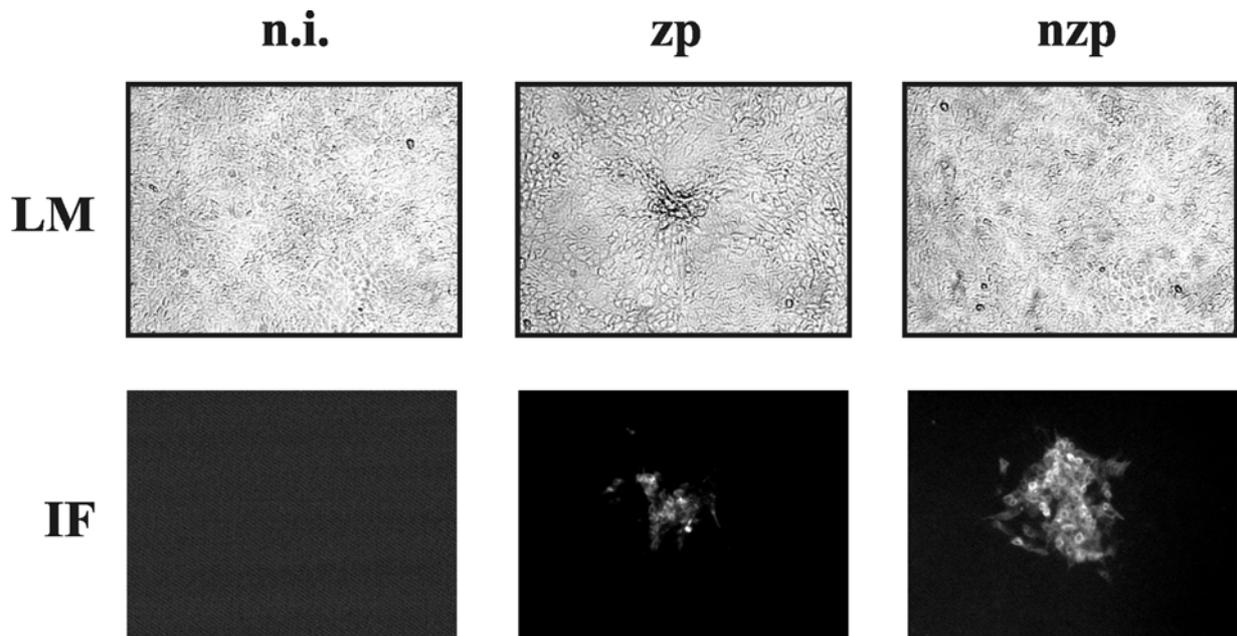


Abb. 20: Vergleichende lichtmikroskopische und Immunfluoreszenzanalysen von MDBK-Zellen, die mit rekombinanten zp und nzp BVD-Viren infiziert wurden

Lichtmikroskopische (LM) und Immunfluoreszenzanalysen (IF) von MDBK-Zellen. Die Zellen wurden 43 h nach Infektion mit rekombinanten, aus der Kotransfektion von NCP7-M1- und +ubi SGT-RNA in n.i. Zellen hervorgegangenen BVD-Viren fixiert. Nicht infizierte Zellen (n.i.) dienen als Negativkontrolle. Zur Infektion wurden ein nicht näher charakterisiertes zp BVDV (zp) und das nzp BVDV R-ncp 1 (nzp) verwendet (vgl. auch Abb. 19 und Abb. 21). Vergrößerung: 100x.

3. Ergebnisse

essentiell ist, kann indirekt abgeleitet werden, dass die funktionelle 3'NTR der replizierenden rekombinanten Genome von der +ubi SGT-RNA stammt.

3.2.6 Charakterisierung von nzp BVDV-Rekombinanten

Die Experimente, bei denen +ubi SGT-RNA in mit NCP7 infizierte Zellen transfiziert wurde, ermöglichten durch Auswertung eines ZPE die Identifizierung rekombinanter zytopathogener BVD-Viren (Abb. 9 B). Die Versuche, bei denen zwei nicht infektiöse RNAs in n.i. Zellen transfiziert wurden, erlaubten darüber hinaus nun auch den Nachweis von rekombinanten, nicht zytopathogenen BVD-Viren durch indirekte IF (Abb. 20). Fünf solcher nach Kotransfektion von NCP7-M1 und +ubi SGT-RNA in n.i. Zellen isolierte nzp Viren wurden näher charakterisiert. „Northern Blot“-Hybridisierung (Daten nicht gezeigt), RT-PCR- (verwendete Primer s. Tab. 2 B) und Sequenzanalysen zeigten, dass die Genome der nzp Viren aus einzigartigen, nicht homologen Rekombinationsereignissen zwischen dem Genom von NCP7-M1 und +ubi SGT hervorgegangen waren und unterschiedliche Duplikationen viraler Sequenzen beinhalten. In keiner dieser Rekombinanten liegen Ubiquitin-kodierende Sequenzen von +ubi SGT vor, was indirekt das Vorliegen eines nzp Biotyps bestätigt (Abb. 21, bzw. Daten nicht gezeigt). Bei der Rekombinanten R-ncp 1 wurde eine Rekombinationsstelle zwischen der NS5B-kodierenden Region von NCP7-M1 und der NS4B-kodierenden Region von + ubi SGT gefunden (Abb. 21). Bei R-ncp 2 und drei weiteren nzp BVDV-Rekombinanten wurden jeweils zwei Rekombinationsstellen identifiziert (Abb. 21, bzw. Daten nicht gezeigt). Die im Genom von R-ncp 2 5'-wärts gelegene Rekombinationsstelle entstand durch Rekombination von Sequenzen der 3'NTR von NCP7-M1 mit NS3-kodierenden Sequenzen von +ubi SGT. Die daraus resultierende, erheblich vergrößerte virale 3'NTR weist auch nach

3. Ergebnisse

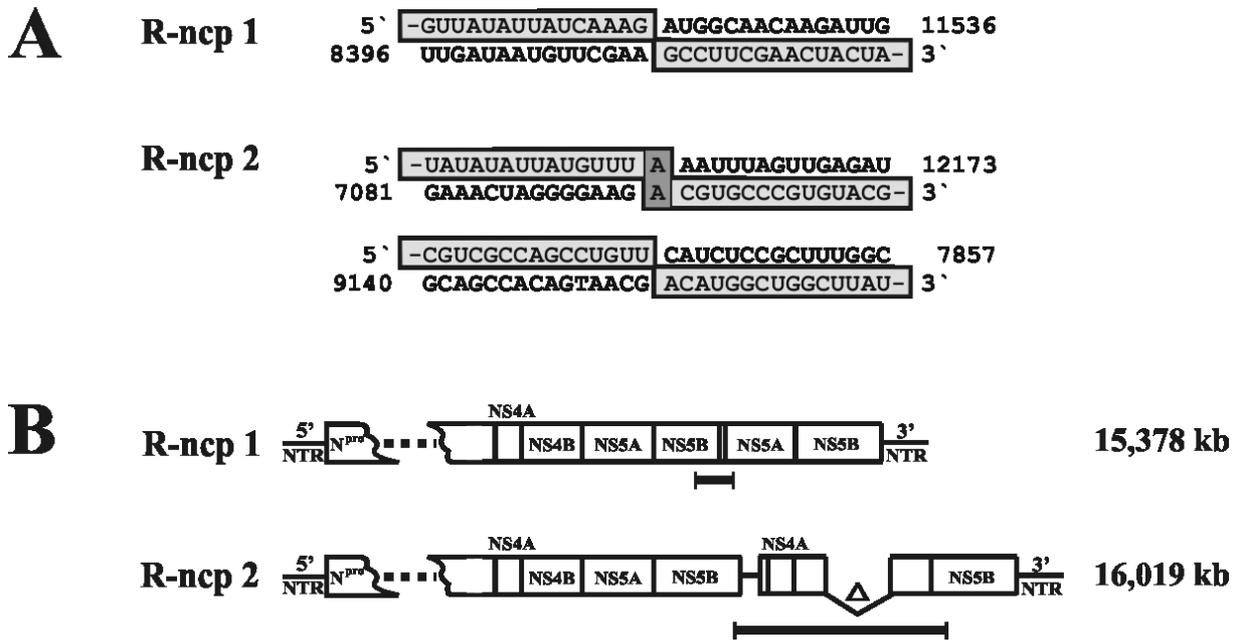


Abb. 21: Sequenzanalyse und Genomaufbau der ncp BVDV-Rekombinanten R-ncp 1 und R-ncp 2

(A) „Crossover“-Regionen der rekombinanten ncp BVDV-Genome R-ncp1 und R-ncp 2, die aus Kotransfektion von NCP7-M1 und +ubi SGT-RNA in n.i. MDBK-Zellen hervorgegangen sind (siehe Abb. 19). Bei R-ncp 1 wurde eine, bei R-ncp 2 wurden zwei Rekombinationsstellen gefunden. Die Sequenzen der beteiligten Rekombinationspartner NCP7-M1 (oben) und +ubi SGT (unten) sowie der resultierenden rekombinanten Sequenzen (hellgraue Boxen) sind jeweils dargestellt. Die flankierenden Zahlen beziehen sich auf die Genome von CP7-5A (oben) und +ubi SGT (unten). Eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen beider parentaler RNA-Moleküle im Übergangsbereich ist durch ein dunkelgraues Kästchen hervorgehoben.

(B) Genomorganisation und errechnete Länge von R-ncp 1 (oben) und R-ncp 2 (unten). Bei beiden ist die Region zwischen der 5'NTR und dem 5'-terminalen NS4A-Gen teilweise durch Punkte ersetzt. Die unterstrichenen Genomabschnitte wurden sequenziert. Beide RNAs enthalten in den entsprechenden Bereichen keine von +ubi SGT stammenden Ubiquitin-kodierenden Sequenzen. Das Genom von R-ncp 2 enthält eine mit einer Länge von fast 4 kb erheblich vergrößerte 3' NTR, die zusätzlich eine interne Deletion (Δ) viraler Sequenzen aufweist.

einer durch ein zweites Rekombinationsereignis verursachten internen Deletion viraler Sequenzen immer noch eine bemerkenswerte Größe von ca. 4 kb auf. Im Vergleich dazu beträgt die Größe der 3'NTR von BVDV NCP7 weniger als 200 Nukleotide.

3.2.7 Ursprung der viralen 3'NTR in rekombinanten BVDV-Genomen

Um den Ursprung des 3'-Teils von im Rekombinationssystem erzeugten rekombinanten BVDV-Genomen bestimmen zu können, die aus RNA-Rekombination zwischen zwei Rekombinationspartnern mit intakter 3'NTR hervorgegangen sind, wurden zwei genetische Marker in das Genom von +ubi SGT eingeführt. Der Marker M2 stellt eine „stille“ Mutation zweier Kodons im 3'-terminalen Bereich des RdRp-Gens NS5B dar. Der Marker M3 repräsentiert eine nicht letale Deletion von vier nt innerhalb der viralen 3'NTR (Pankraz, A., mündliche Mitteilung). Nach Transfektion des entsprechenden Konstrukts +ubi SGT-M2M3 in mit NCP7 infizierte Zellen entstanden in zwei unabhängigen Experimenten 13 zp Rekombinanten (Abb. 22). Weitergehende RT-PCR- (verwendete Primer s. Tab. 2 C) und Sequenzanalysen von drei dieser Rekombinanten zeigten nach DNA-Sequenzierung von jeweils mindestens zwei cDNA-Klonen die Anwesenheit von beiden genetischen Markern (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden wurde untersucht, ob im hier etablierten Rekombinationssystem eine intakte 3'NTR von +ubi SGT für die Generierung rekombinanter Genome notwendig ist. Dazu wurde der letale Marker M1 (Abb. 19 B) zusammen mit dem Marker M2 in das cDNA-Plasmid p+ubi SGT eingeführt. 5 µg der vom resultierenden Plamid p+ubi SGT-M1M2 transkribierten RNA wurden in mit NCP7 infizierte Zellen transfiziert. In zwei unabhängigen Experimenten konnte danach kein ZPE entdeckt werden (Abb. 22).

Aus den Resultaten der hier durchgeführten Experimente ergibt sich, dass die 3'NTR der Rekombinanten von +ubi SGT stammt. Weiterhin belegen unsere Resultate, dass die Anwesenheit der intakten viralen 3'NTR von +ubi SGT für die Generierung replizierender BVDV-Rekombinanten essentiell ist.

3. Ergebnisse

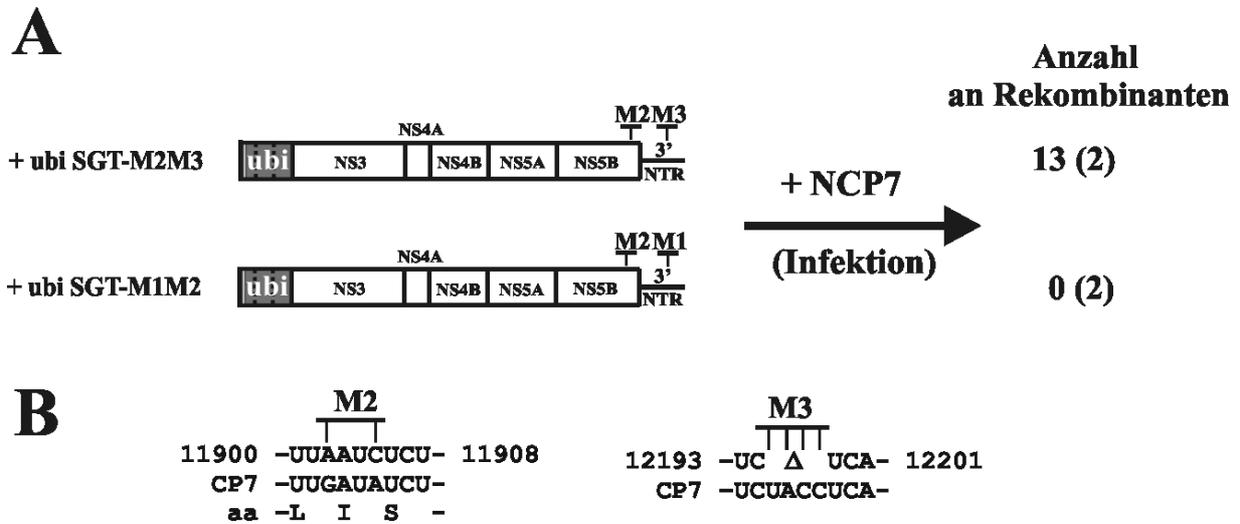


Abb. 22: Rekombinationsexperimente mit 3'NTR-Mutanten von +ubi SGT

(A) Schematische Abbildung von +ubi SGT M2M3 und +ubi SGT M1M2. M1 (siehe Abb. 19), M2, und M3 zeigen die Lokalisation der genetischen Marker an. Rechts ist die Anzahl der entstandenen Rekombinanten nach Transfektion von +ubi SGT M2M3 oder +ubi SGT M1M2-RNA in NCP7-infizierte MDBK-Zellen angegeben. Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Anzahl der unabhängig durchgeführten Experimente.

(B) Vergleich der Nukleotidsequenzen von CP7 (unten) und den Sequenzen der in +ubi SGT eingeführten genetischen Marker M2 (links) und M3 (rechts). Für den Bereich der „stillen“ Mutation M2 sind darunter die kodierte Aminosäuren angegeben. Beide Mutationen sind im Kontext eines replizierenden Genoms nicht letal. Zahlen beziehen sich auf das Genom von CP7-5A.

3.2.8 Kotransfektionen von +ubi SGT mit RdRp-Mutanten von NCP7-5A

Wie bereits geschildert, wird von den meisten Autoren angenommen, dass RNA-Rekombination bei Viren das Resultat eines „template switch“ der viralen RNA-Polymerase während der Replikation darstellt. Nach Transfektion von +ubi SGT-RNA in mit NCP7 infizierte Zellen fanden die nachgewiesenen Rekombinationen in Anwesenheit von funktionellen Replikationskomplexen des replizierenden Rekombinationspartners NCP7 statt. Auch für die Versuche, die auf der Transfektion von zwei synthetischen Transkripten in n.i. Zellen basieren, wiesen das Genom von NCP7-5A und die NCP7-M1-RNA sowohl ein vollständiges IRES-

3. Ergebnisse

Element, das die virale Translation auch für nichtreplizierende Rekombinationspartner zumindest initial nach Transfektion vermitteln sollte, als auch ein intaktes NS5B (RdRp)-Gen auf (Abb.19). In der Tat konnte im Lysat von n.i. Zellen, die 4 h nach Transfektion mit der nicht replikationskompetenten, genomischen RNA von zp BVDV CP7-5A, in die der letale Marker M1 eingeführt worden war, geerntet wurden, durch Immunoblotanalyse die Bildung geringer Mengen von viralem Protein (NS3) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Bedeutung der Anwesenheit einer funktionellen RdRp von BVDV für RNA-Rekombination im vorliegenden *in vivo*-System zu überprüfen, wurden verschiedene Letalmutationen in die RdRp-kodierende Region des Genoms von NCP7-5A eingeführt. Bei dem Konstrukt NCP7-GAA wurde das hochkonservierte Aminosäuremotiv GDD, das einen essentiellen Bestandteil des aktiven Zentrums viraler RdRps darstellt, durch das Motiv GAA ersetzt (Abb. 23). Diese Mutation führt zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der BVDV-Polymerase (Lai et al., 1999). Bei dem zweiten Konstrukt NCP7- Δ NaeI/SmaI fehlen die 3'-terminale Hälfte des RdRp-Gens zusammen mit der viralen 3'NTR, wohingegen sich das dritte Konstrukt NCP7- Δ ClaI/ClaI durch eine große interne Deletion von ca. 1 kb im 3'-terminalen Bereich des RdRp-Gens auszeichnet (Abb. 23). Alle drei RdRp-Mutanten erwiesen sich nach Transfektion in n.i. Zellen als nicht infektiös (Daten nicht gezeigt).

Überraschenderweise resultierte eine Kotransfektion von jedem dieser Konstrukte zusammen mit +ubi SGT in n.i. Zellen in mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten in der Entstehung von zp und nzp BVDV-Rekombinanten (Abb. 23). Auf Grund der Tatsache, dass die virale RdRp des ersten Rekombinationspartners (NCP7-GAA, NCP7- Δ NaeI/SmaI oder NCP7- Δ ClaI/ClaI) jeweils letal mutiert war und dem zweiten (ein intaktes RdRp-Gen tragenden) Rekombinationspartner +ubi SGT ein translationsvermittelndes IRES-Element fehlt (Abb. 9),

3. Ergebnisse

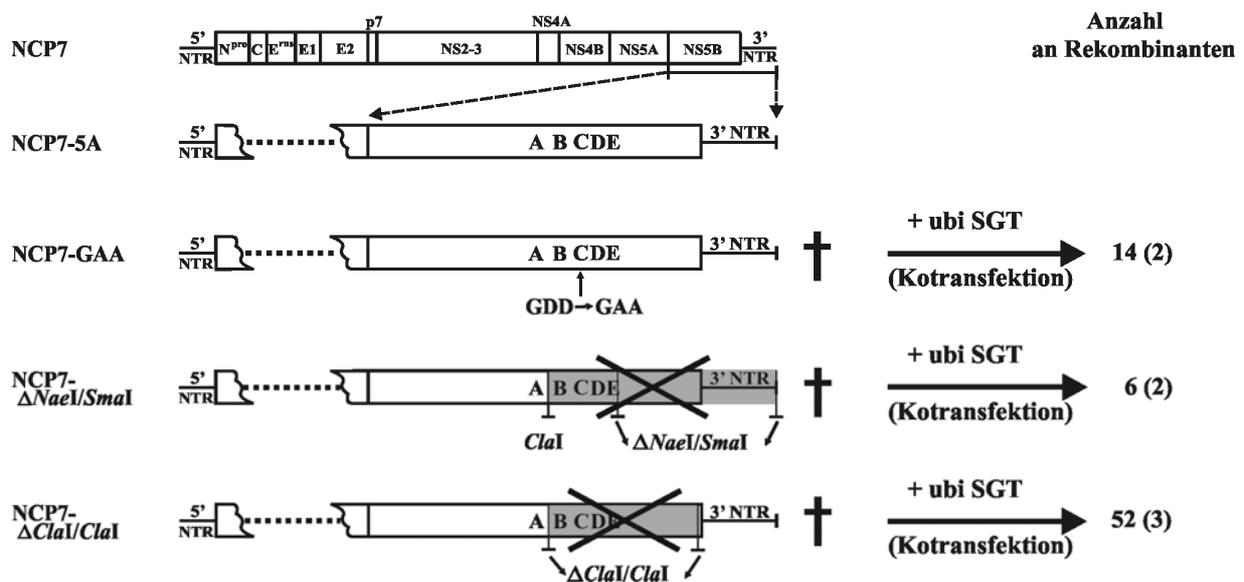


Abb. 23: Rekombinationsexperimente mit RdRp-Mutanten von NCP7-5A

Schematische Darstellung der Genome von NCP7, NCP7-5A und ihrer nicht infektiösen Derivate NCP7-GAA, NCP7- Δ NaeI/SmaI und NCP7- Δ ClaI/ClaI, die unterschiedliche letale Mutationen in der RdRp-kodierenden Region aufweisen. Die Region zwischen der 5'NTR und dem NS5B-Gen ist teilweise durch Punkte ersetzt. In den vergrößerten NS5B-Kästen ist die Position von fünf hochkonservierten Domänen der viralen RdRp (Lai et al., 1999) durch die Buchstaben A bis E angegeben. Deletierte Teile der RNAs sind grau gekennzeichnet. Kreuze zeigen fehlende Infektiosität entsprechender RNAs an. Rechts ist die Anzahl der entstandenen Rekombinanten nach Kotransfektion von NCP7-GAA, NCP7- Δ NaeI/SmaI oder NCP7- Δ ClaI/ClaI mit +ubi SGT- RNA in n.i. MDBK-Zellen angegeben. Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Anzahl der unabhängig durchgeführten Experimente.

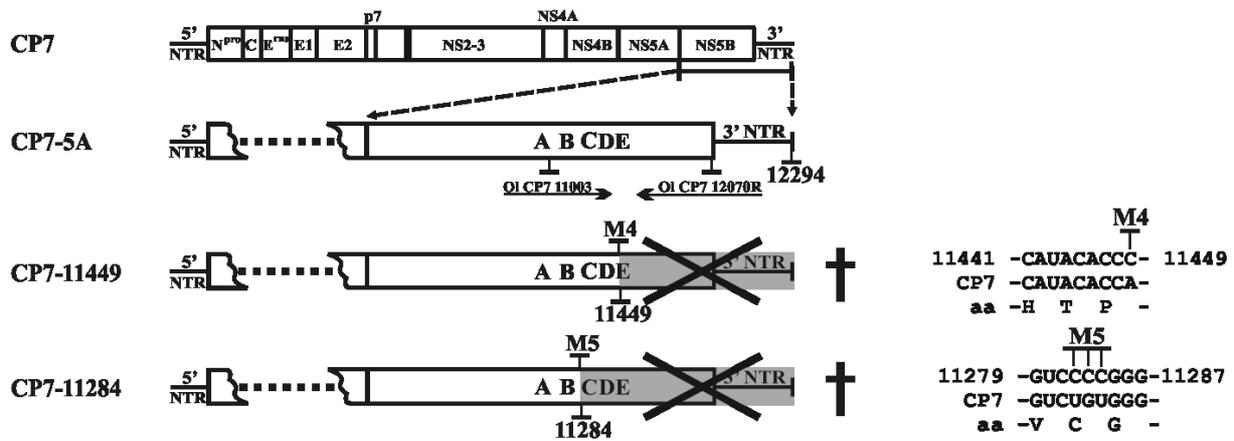
lassen diese Experimente vermuten, dass für die beobachteten Rekombinationsereignisse die Anwesenheit einer funktionellen viralen RdRp nicht essentiell ist. Weiterhin konnten IF-Analysen von mit +ubi SGT transfizierten Zellen 24 h p.t. die Bildung von viralem Protein (NS3) nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Allerdings lässt sich selbst in Abwesenheit des für die virale Translation so wichtigen IRES-Elements nicht ausschließen, dass eine sehr geringe Translationsaktivität zur Synthese der von +ubi SGT kodierten RdRp führt und somit replikative RNA-Rekombination ermöglicht wurde.

3.2.9 RNA-Rekombination *in vivo* in Abwesenheit einer funktionellen pestiviralen RdRp

Zur abschließenden Klärung der Frage, ob die Anwesenheit einer funktionellen viralen RdRp für die beobachteten RNA-Rekombinationsereignisse in Zellkultur essentiell ist, musste ein neuer experimenteller Ansatz erarbeitet werden. Dieser sollte die Generierung replizierender Viren durch RNA-Rekombination zwischen zwei Rekombinationspartnern erlauben, obwohl beide kein vollständiges RdRp-Gen beinhalten. Um das Entstehen rekombinanter pestiviraler Genome auch hier durch die Ausbildung eines ZPE in Zellkultur identifizieren zu können, wurden Transkriptpaare von subgenomischen Derivaten des zp BVDV-Stamms CP7-5A in n.i. Zellen kotransfiziert, denen jeweils essentielle Bestandteile des viralen RdRp-Gens fehlten. Dafür wurden als 5'-Rekombinationspartner die Konstrukte CP7-11449 und CP7-11284 und als 3'-Rekombinationspartner die Konstrukte +SGT-CP7-11201 und +SGT-CP7-11450 erstellt. Den 5'-Rekombinationspartnern fehlt zusammen mit der viralen 3'NTR die genomische Region, die für die C-terminalen 218 (CP7-11449) bzw. 273 (CP7-11284) aa der viralen RdRp kodiert (Abb. 24 A). Es wurde bereits in einer früheren Studie belegt, dass eine C-terminale Deletion von 218 aa zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der RdRp von BVDV führt (Lai et al., 1999). Auch den RNAs der 3'-Rekombinationspartner, die mit Sequenzen der 3'-terminalen Hälfte des RdRp-Gens beginnen und den sich stromabwärts anschließenden Teil des viralen Genoms von CP7-5A vollständig beinhalten, fehlen essentielle Anteile der viralen RdRp (Abb. 24 B). Um nach der Isolierung rekombinanter Viren Kontaminationen ausschließen zu können, wurden die genetischen Marker M2 und M4 bis M7 in die entsprechenden Konstrukte eingefügt (Abb. 24). Abgesehen von Marker M5 entsprechen die am 3'-Ende der 5'-Rekombinationspartner (M4 und M5) bzw. am 5'-Ende der 3'-Rekombinationspartner (M6 und M7) integrierten Marker M4 bis M7 „stillen“

3. Ergebnisse

A



B

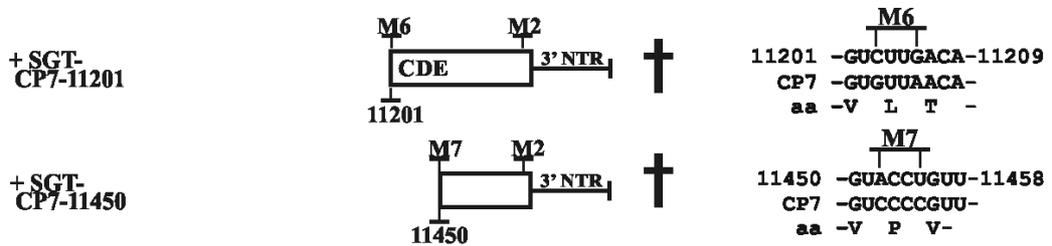


Abb. 24: 3'- und 5'-terminal verkürzte Konstrukte von BVDV CP7-5A

(A) Schematische Darstellung der zp BVDV-Genome CP7 und CP7-5A sowie der nicht infektiösen, 3'-terminal verkürzten Konstrukte CP7-11449 und CP7-11284. Die Region zwischen der viralen 5'NTR und dem NS5B-Gen ist teilweise durch Punkte ersetzt. Deletierte Teile der RNAs sind grau gekennzeichnet. Kreuze zeigen fehlende Infektiosität der RNAs an. Die Positionen von fünf hochkonservierten Domänen (A-E) der viralen RdRp (Lai et al., 1999) sowie die der genetischen Marker M4 und M5 sind angegeben. Die Längen von CP7-5A und die der beiden Konstrukte sind ebenso wie die Positionen der für spätere RT-PCR-Analysen verwendeten Primer OI CP7-11003 und OI CP7-12070R unter den Genomen angegeben. Für beide Konstrukte sind auf der rechten Seite die Sequenzen der eingeführten genetischen Marker M4 und M5 (jeweils oben) den entsprechenden Nukleotidsequenzen von CP7 (Mitte) gegenübergestellt. Unten sind die von der jeweiligen CP7-Sequenz kodierte Aminosäuren (aa) angegeben. Die flankierenden Zahlen beziehen sich auf das Genom von CP7-5A.

(B) Schematische Darstellung der 5'-terminal verkürzten Konstrukte +SGT-CP7-11201 und +SGT-CP7-11450. Kreuze zeigen fehlende Infektiosität der RNAs an. Die Positionen von drei hochkonservierten Domänen der viralen RdRp (C bis E), der genetischen Marker M2, M6 und M7 sowie das 5'-terminale Nukleotid sind für beide Konstrukte angegeben. Für beide Konstrukte sind auf der rechten Seite die Sequenzen der eingeführten genetischen Marker M6 und M7 (jeweils oben) den entsprechenden Nukleotidsequenzen von CP7 (Mitte) gegenübergestellt. Unten sind die von der jeweiligen CP7-Sequenz kodierte Aminosäuren (aa) angegeben. Die flankierenden Zahlen beziehen sich auf das Genom von CP7-5A.

3. Ergebnisse

Nukleotid austauschen in der NS5B-kodierenden Region, die im Kontext eines infektiösen Virus nicht letal sind (Daten nicht gezeigt).

Um in den hier durchgeführten Versuchen eine mögliche Beeinflussung der Rekombination auf DNA-Ebene ausschließen zu können, wurden die Transkripte zunächst einem DNaseI-Verdau unterzogen (s. 3.1.3). Danach wurden die Transkripte einer Phenol-/Chloroformreinigung unterworfen, wodurch die im Transkriptionsansatz enthaltenen Proteine, vor allem aber die zur Transkription verwendete DNA-abhängige RNA-Polymerase entfernt wurden.

Bemerkenswerterweise konnten nach einer Kotransfektion von n.i. Zellen mit den so behandelten synthetischen Transkripten CP7-11449 und +SGT-CP7-11201, deren Sequenzen in 249 Nukleotiden überlappen, in drei unabhängigen Experimenten 11 rekombinante zp Viren isoliert werden (Tab. 6). RT-PCR- und Nukleotidsequenzanalysen (Abb. 25, verwendete Primer s. Tab. 2 D) zeigten, dass eine Rekombinante (R1) aus einer präzisen homologen, die verbleibenden 10 Rekombinanten (R2 bis R11) aber aus jeweils einzigartigen, nicht homologen Rekombinationsereignissen zwischen CP7-11449 und +SGT-CP7-11201 hervorgegangen sind (Abb. 25, Daten nicht gezeigt). Diese führten bei R2 zur Deletion von 18 Nukleotiden, bei R3 bis R11 zu Duplikationen von 21 bis 135 Nukleotiden (Abb. 26 A). Eine Kotransfektion der Rekombinationspartner CP7-11284 und +SGT-CP7-11201, die in 84 Nukleotiden überlappten, erbrachte in drei unabhängigen Experimenten nur ein rekombinantes zp Virus (R12), das eine Duplikation von 3 Nukleotiden aufwies (Tab. 6, Abb. 25 B, Abb. 26 B). Bei allen hier beschriebenen Rekombinanten war der ORF erhalten. Eine „Northern Blot“-Analyse viraler genomischer RNA-Moleküle mit einer Größe von etwa 12,3 kb erschien nicht geeignet, um die beschriebenen geringen Größenunterschiede der Rekombinanten R1 bis R12 (-18 bis +135 Nukleotide) aufzuzeigen. Daher wurden

3. Ergebnisse

	CP7-11284	CP7-11449
+ SGT-11201	1 (3)	11 (3)
+ SGT-11450	nicht durchgeführt	0 (2)

Tab. 6: Anzahl von zp Rekombinanten nach Kotransfektion verschiedener Paare von 5'- und 3'-terminal verkürzten Genomteilen von CP7-5A in nicht infizierte Zellen

Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Anzahl der jeweils unabhängig durchgeführten Experimente.

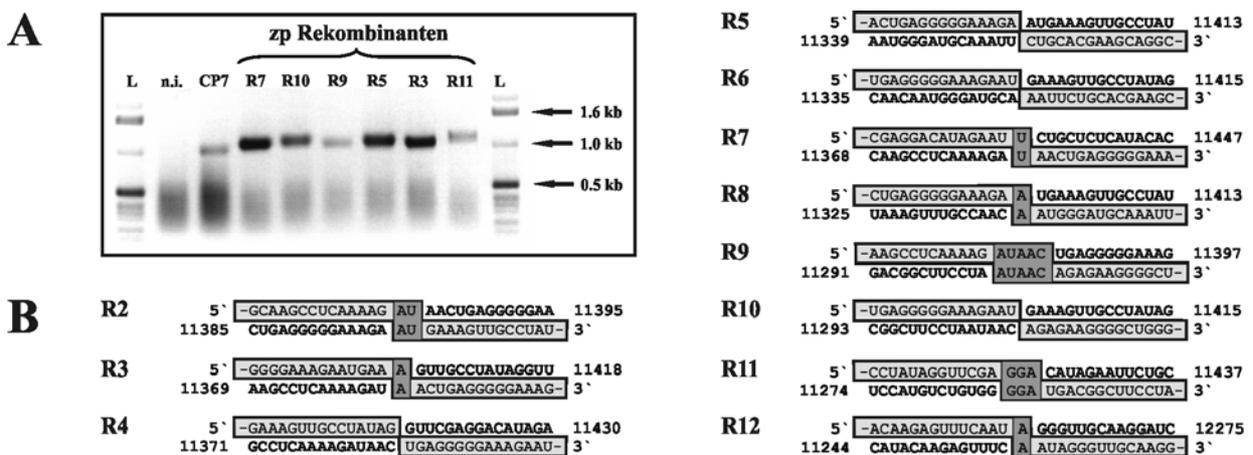


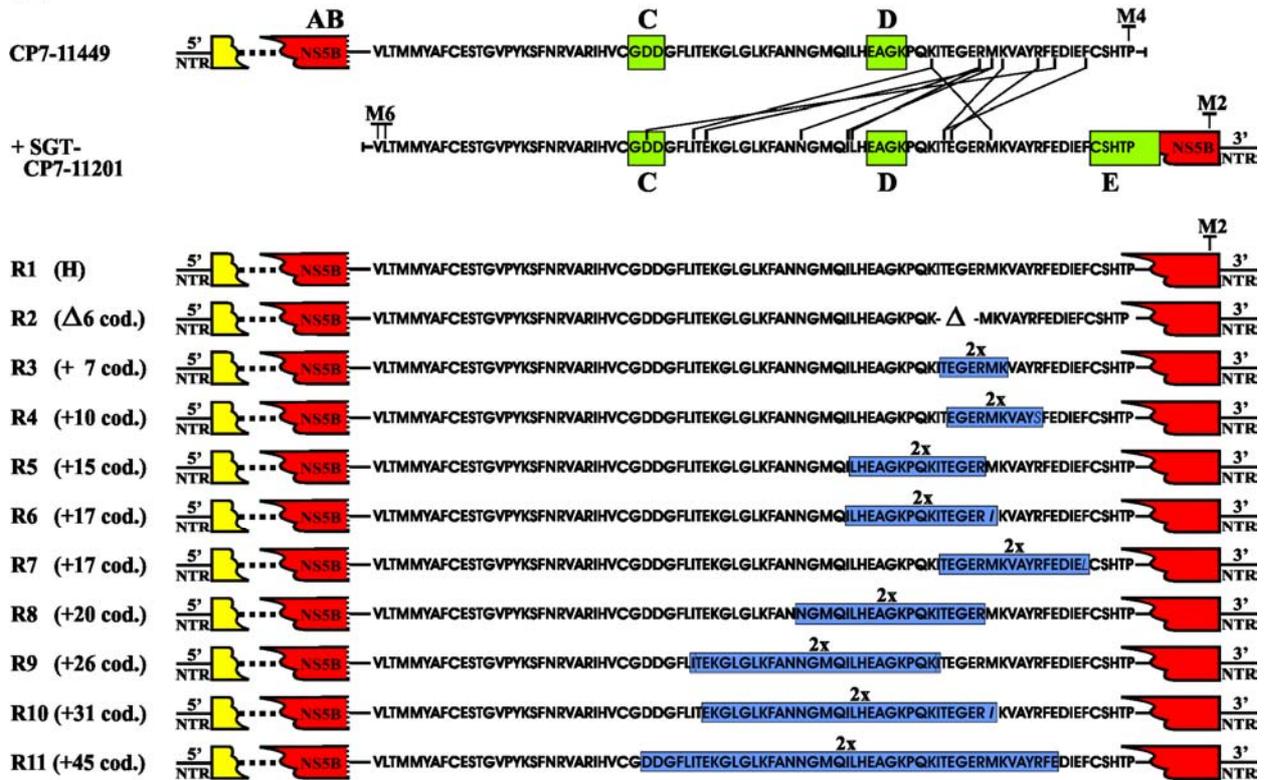
Abb. 25: Analyse der nach Kotransfektion von 5'- und 3'-terminal verkürzten Genomteilen von CP7-5A aufgetretenen zp BVDV-Rekombinanten

(A) RT-PCR-Analyse von sechs ausgewählten zp BVDV-Rekombinanten (R3, R5, R7, R9, R10 und R11), die nach Kotransfektion von CP7-11449 und +SGT-CP7-11201 in nicht infizierte MDBK-Zellen entstanden sind. Die genomischen Positionen und Orientierungen der verwendeten Primer OI CP7-11003 und OI CP7-12070R sind in Abb. 24 A unter dem Genom von CP7-5A angegeben. Als Kontrollen wurden RNAs von nicht infizierten (n.i.) Zellen und von mit CP7 infizierten Zellen in die Analyse einbezogen. Die Größen der von den Rekombinanten erhaltenen PCR-Produkte weichen von dem von CP7 erhaltenen ab. Die Fragmentlängen des DNA-Markers (L) sind rechts in kb angegeben.

(B) „Crossover“-Regionen der rekombinanten zp BVDV-Genome R2 bis R12. Die Sequenzen der beteiligten Rekombinationspartner CP7-11449 (R2-R11, oben), CP7-11284 (R12, oben) und +SGT-CP7-11201 (jeweils unten) sowie der resultierenden rekombinanten Sequenzen (hellgraue Boxen) sind jeweils dargestellt. Die flankierenden Zahlen beziehen sich auf das Genom von CP7-5A. Übereinstimmungen der Nukleotidsequenz zwischen den parentalen RNA-Molekülen im Übergangsbereich (z.B. bei R2) sind durch dunkelgraue Kästchen hervorgehoben.

3. Ergebnisse

A



B

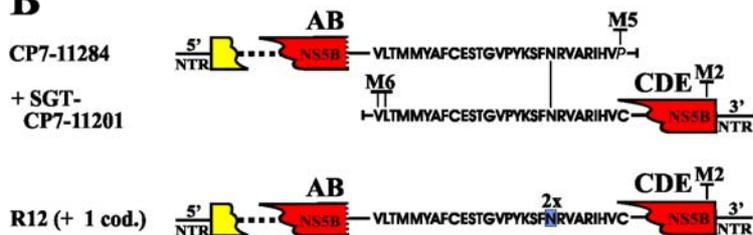


Abb. 26: „Crossover sites“ und Aminosäuresequenzen der aus Kotransfektion von 3'- und 5'-terminal verkürzten Genomteilen von CP7-5A hervorgegangenen zp BVDV-Rekombinanten R1 bis R12

(A) Schematische Abbildung der Rekombinationspartner CP7-11449 und +SGT-CP7-11201 (oben) sowie der entstandenen zp Rekombinanten R1 bis R11 (unten). Die Region zwischen der 5'NTR und der 3'NTR ist teilweise durch Punkte ersetzt. Die 83 überlappenden Kodons der Rekombinationspartner sind als Aminosäuresequenzen übereinandergestellt. Die „crossover“-Regionen von R2 bis R11 sind durch Linien zwischen den Sequenzen der Rekombinationspartner gezeigt. Die Positionen der genetischen Marker M2, M4 und M6 sowie die der fünf Domänen A bis E (grüne Kästen) der viralen RdRp (rot) sind kenntlich gemacht. Domäne E enthält 22 aa, nur der N-terminale Teil ist als aa-Sequenz angegeben. R1 ist durch präzise homologe RNA-Rekombination entstanden, wohingegen R2 bis R11 aus einzigartigen, nicht homologen RNA-Rekombinationen hervorgingen. Bei R2 ist eine Deletion von sechs Kodons durch ein Δ , bei R2 bis R11 sind duplizierte Sequenzen durch blaue Boxen (2x) kenntlich gemacht. Bei R4, R6, R7 und R10 führte die RNA-

3. Ergebnisse

Rekombination außerdem zu einem Kodonaustausch an der Übergangsstelle zwischen den parentalen Sequenzen. Die dadurch veränderten, abgeleiteten aa sind kursiv gedruckt. Marker M2 ist in allen, Marker M4 und M6 sind in keiner der Rekombinanten vorhanden.

(B) Schematische Darstellung der nach Kotransfektion von CP7-11284 (oben) und +SGT-CP7-11201 (Mitte) entstandenen Rekombinante R12 (unten). Die Positionen der genetischen Marker M2, M5 und M6 sowie die der fünf Domänen A bis E der viralen RdRp sind angezeigt. Die dargestellten Aminosäuresequenzen entsprechen den 28 überlappenden Kodons der Rekombinationspartner. Als Resultat des Klonierungsprozesses ist die von CP7-11284 kodierte C-terminale Aminosäure Prolin (P) statt Cystein (C). Die „crossover“-Region von R12 ist durch eine Linie zwischen den Rekombinationspartnern angezeigt. Das duplizierte (2x) Asparagin (N) ist blau hervorgehoben. Nur Marker M2 ist vorhanden.

entsprechende Größenunterschiede durch vergleichende RT-PCR-Analysen der jeweiligen RdRp-Gene dargestellt (Abb. 25 A, bzw. Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise tragen alle hier beschriebenen Rekombinanten zwar den internen Marker M2 des jeweiligen 3'-Rekombinationspartners, jedoch wurden alle anderen endständigen genetischen Marker (M4 bis M6) der 5'- und 3'-Rekombinationspartner durch RNA-Rekombination eliminiert (Abb. 26). Somit sind die erhaltenen Rekombinanten R1 bis R12 nie durch Rekombination unter Beteiligung endständiger Nukleotide, sondern immer aus einer Verknüpfung zwischen internen Nukleotiden der beiden Rekombinationspartner hervorgegangen (Abb. 26).

Darüber hinaus entstanden in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten keine Rekombinanten nach Kotransfektion von CP7-11449 und +SGT-CP7-11450 (Tab. 6). Theoretisch hätte es hier nur nach präziser Rekombination zwischen dem 3'-terminalen Nukleotid des 5'-Rekombinationspartners (CP7-11449) und dem 5'-terminalen Nukleotid des 3'-Rekombinationspartners (+SGT-CP7-11450) zum Entstehen eines vollständigen, infektiösen viralen Genoms kommen können (Abb. 24). Offensichtlich spielt zumindest in unserem System eine solche End- zu Endligation zwischen den beteiligten Rekombinationspartnern keine Rolle bei der Entstehung infektiöser rekombinanter Virusgenome.

3. Ergebnisse

Da alle in den hier beschriebenen Kotransfektionsexperimenten verwendeten synthetischen Transkripte lediglich inaktive Teile der viralen RdRp kodieren und entsprechende Kontrollen Kontaminationen oder eine Beteiligung der zur Transkription verwendeten Polymerasen ausschlossen, zeigt das Entstehen der rekombinanten BVD-Viren R1 bis R12, dass die RNA-Rekombination vor der Synthese einer funktionsfähigen viralen RdRp stattgefunden hat. Zusammenfassend beweisen diese Experimente eindeutig die Existenz eines von der viralen Replikation unabhängigen Mechanismus der RNA-Rekombination *in vivo*.

3.3 Gezielte Anwendung des Rekombinationssystems:

Erzeugung und Charakterisierung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV

3.3.1 Etablierung eines *in vivo* RNA-Rekombinationssystems für KSPV

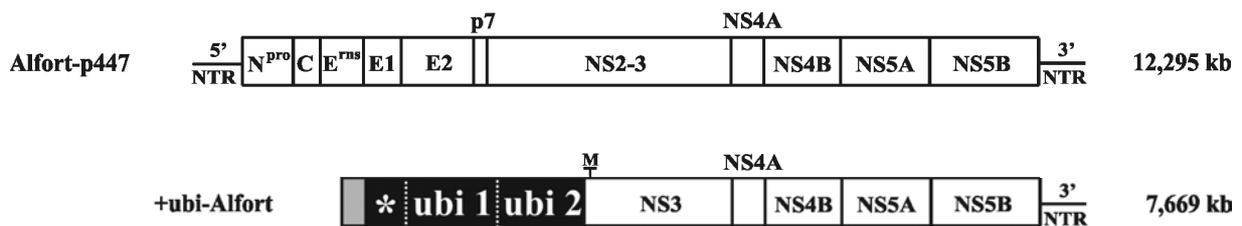
Als gezielte Anwendung des im Rahmen dieser Arbeit für BVDV etablierten Rekombinationssystems (Gallei et al., 2004) sollte versucht werden, ein bei Feldisolaten bisher noch nicht identifiziertes, von einem Helfervirus unabhängiges zp Virus der klassischen Schweinepest zu erzeugen und es anschließend genauer zu charakterisieren.

Zur Adaptation des BVDV-Rekombinationssystems an das Virus der klassischen Schweinepest wurde zunächst das synthetische, subgenomische Transkript +ubi-Alfort erzeugt. In Analogie zu +ubi SGT beinhaltet das 5'-Ende von +ubi-Alfort Genomanteile des BVDV-Stamms CP14, die die 5 C-terminalen aa von NS2, ein C-terminales Fragment sowie zwei komplette Kopien von zellulärem Ubiquitin (ubi 1 und ubi 2) kodieren (s. Abb. 9 A, Abb. 27 A). An diese Sequenzen schließen sich direkt und unter Erhaltung des ORFs die Gene für die viralen Nichtstrukturproteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B des nzp KSPV-Stamms Alfort-p447 an. Das synthetische Transkript enthält darüber hinaus auch die virale 3'NTR von Alfort-p447, nicht aber die 5'NTR mit essentiellen *cis*-aktiven Elementen für die virale Translation, Transkription und Replikation. Ebenfalls nicht vorhanden ist die genomische Region, die die NS N^{pro}, p7 und NS2 sowie die Strukturproteine kodiert (Abb. 27 A). Durch IF-Analysen nach mehreren unabhängig durchgeführten Transfektionen von +ubi-Alfort in n.i. porcine SK6-Zellen konnte bestätigt werden, dass +ubi-Alfort nicht replikationskompetent ist (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

Entsprechend unserer Arbeitshypothese sollte eine Rekombination zwischen dem nicht replikationskompetenten Partner +ubi-Alfort und dem 5'-terminalen Teil des replizierenden Plusstranggenoms von nzp KSPV Alfort-p447 in der Generierung von zp KSPV-Genomen resultieren, solange dabei der ORF und mindestens eine

A



B

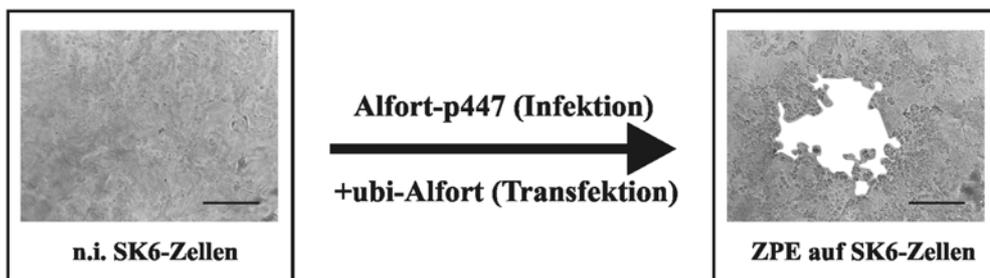


Abb. 27: *In vivo* RNA-Rekombinationssystem für KSPV

(A) Schematische Abbildung der Rekombinationspartner. Das RNA-Genom des nzp KSPV-Stamms Alfort-p447 (oben) enthält einen großen offenen Leserahmen (Kasten), der von 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankiert wird. Die Positionen der viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine im viralen Polyprotein sind gezeigt. Das synthetische, replikationsinkompetente, subgenomische Transkript +ubi-Alfort (unten) kodiert die C-terminalen fünf Aminosäuren des NS2-Gens von BVDV-Stamm CP14 (grau), ein C-terminales Fragment (*) sowie zwei komplette Monomere von zellulärem Ubiquitin (ubi 1, ubi 2; schwarz) und die viralen Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5B von Alfort-p447. Das Transkript +ubi-Alfort enthält außerdem die virale 3'NTR, nicht aber die 5'NTR mit essentiellen cis-aktiven Signalen für die virale Translation, Transkription und Replikation. M zeigt die Position einer als genetischer Marker eingeführten *ApaI*-Schnittstelle an. Die Größen des Genoms von Alfort-p447 und die von +ubi-Alfort sind auf der rechten Seite in Kilobasen (kb) angezeigt. Die Einteilung der Genomabschnitte ist nicht maßstabsgetreu.

(B) SK6-Zellen wurden mit nzp KSPV Alfort-p447 infiziert und später mit dem synthetischen Transkript +ubi-Alfort transfiziert. Links: Nicht infizierte SK6-Zellen (n.i.) ohne Anzeichen eines ZPE. Rechts: SK6-Zellen 24 h nach der Infektion mit Überstand von Alfort-p447-infizierten Zellen, die fünf Tage nach Transfektion mit +ubi-Alfort einen ZPE zeigten. Das erneute Auftreten eines ZPE ist erkennbar. Bereiche mit aufgetretener Zelllyse: weiß. Der Balken entspricht 200 μ m.

3. Ergebnisse

komplette Kopie von Ubiquitin-kodierenden Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen von +ubi-Alfort erhalten bleiben. Der Nachweis von replikationskompetenten Rekombinanten sollte wie im beschriebenen BVDV-Rekombinationssystem über das Auftreten eines zytopathischen Effekts (ZPE) in Zellkultur erfolgen.

Im Rahmen unserer Experimente wurden die ca. $2,5 \times 10^7$ porzinen SK6-Zellen einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm zunächst mit nzp KSPV Alfort-p447 infiziert und drei Tage später mit ca. 10 µg +ubi-Alfort transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in die 24 Vertiefungen von zwei „12-well“-Zellkulturgefäßen ausgesät. 5 Tage post transfectionem (p.t) wurden die aufgeteilten Zellen jeweils trypsinisiert und in eine Vertiefung eines „6-well“-Zellkulturgefäßes ausgesät. Bei einer „6-well“-Vertiefung konnte 24 h später ein ZPE in Zellkultur entdeckt werden. Der von diesen Zellen geerntete Überstand wurde für die Infektion von n.i. Zellen verwendet. 24 h p.i. konnte erneut ein deutlicher ZPE beobachtet werden (Abb. 27 B). Von dieser ersten Zellkulturpassage wurden sowohl die Gesamtzell-RNA als auch der Überstand (ZPE 1.P) geerntet.

Begleitende Kontrollexperimente, für die identische Zellzahlen und Transkriptmengen verwendet wurden, beinhalteten die Transfektion von +ubi-Alfort in n.i. Zellen sowie die Elektroporation von n.i. oder mit Alfort-p447 infizierten Zellen in Abwesenheit von +ubi-Alfort und führten zu keinem ZPE. Dabei konnte durch IF virales Antigen nur bei mit Alfort-p447 infizierten Zellen nachgewiesen werden, nicht aber bei n.i. Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Biologische Klonierung und Genomanalyse des rekombinanten zp KSPV CP G1

Die Identifizierung eines ZPE nach der Transfektion von +ubi-Alfort in mit nzp KSPV Alfort-p447 infizierte Zellen führte zu der Annahme, dass ein

3. Ergebnisse

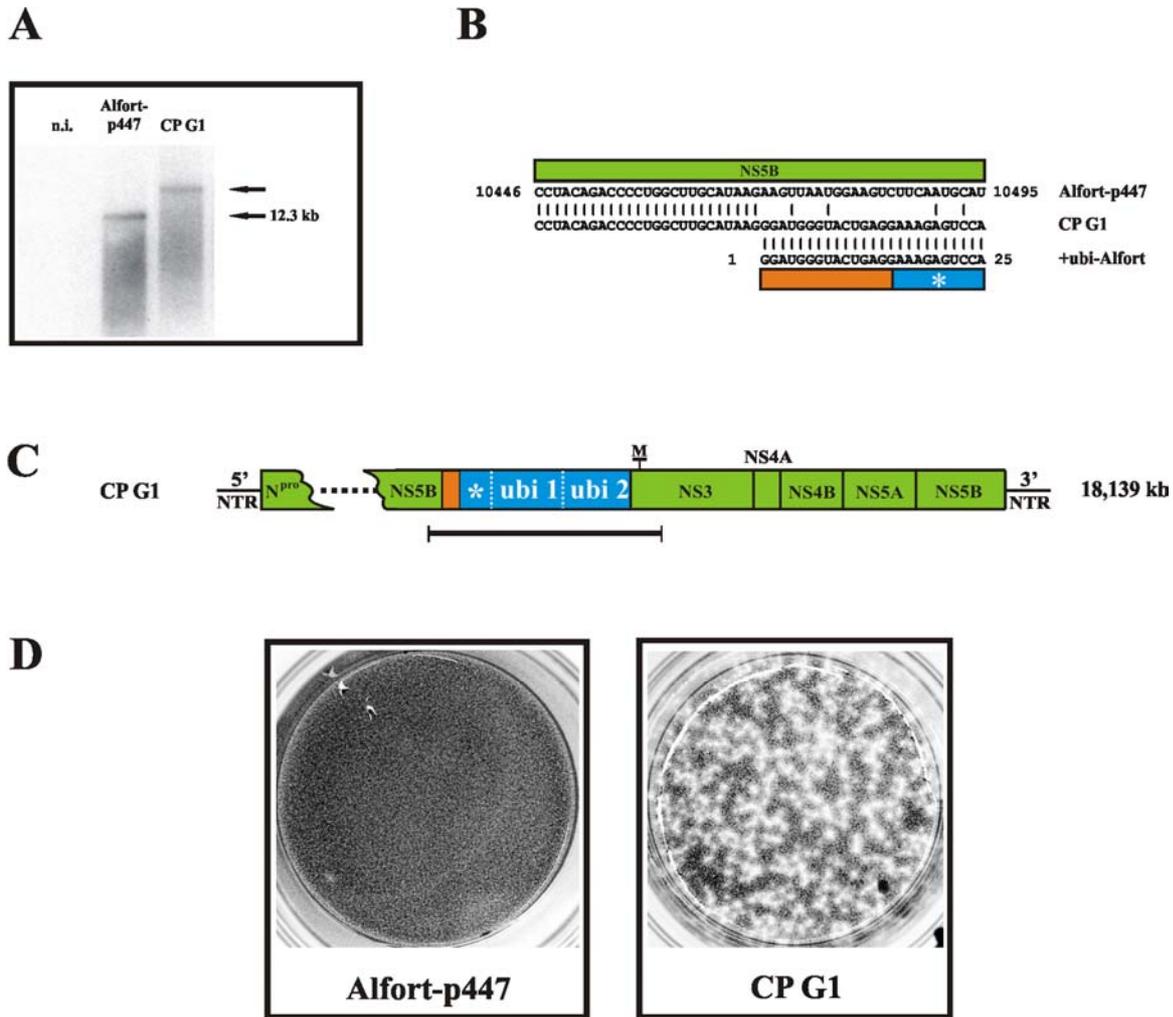


Abb. 28: Analyse des rekombinanten zp KSPV-Stamms CP G1

(A) „Northern Blot“-Analyse von Gesamt-RNA von nicht infizierten (n.i.) SK6-Zellen, von mit nzp KSPV Alfort-p447 infizierten SK6-Zellen und von SK6-Zellen infiziert mit KSPV CP G1 (erste Passage nach biologischer Klonierung). Für die Hybridisierung wurde ein radioaktiv markiertes cDNA-Fragment verwendet, das den Nukleotiden 5560 bis 8340 des Genoms von Alfort-p447 entspricht. Die Wanderungsposition und Größe des Genoms von Alfort-p447 sind rechts gezeigt. Bei der CP G1-RNA ist ein stark vergrößertes Genom erkennbar.

(B) Die Gesamtzell-RNA aus der ersten Zellkulturpassage von KSPV CP G1 wurde einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Ein die Anwesenheit von duplizierten viralen Sequenzen anzeigendes spezifisches Produkt wurde kloniert und sequenziert. Als Resultat entsprechender Sequenzanalysen zeigt das Modell einen Vergleich der rekombinanten Sequenz von CP G1 (Mitte) mit ihren parentalen RNAs Alfort-p447 (oben) und +ubi-Alfort (unten). Sequenzübereinstimmungen zwischen der rekombinanten und den parentalen Sequenzen sind durch vertikale Linien angezeigt. Die genomischen Regionen der parentalen Sequenzen sind in den entsprechenden Kästchen über und unter dem Sequenzvergleich angegeben. Die Nummerierungen an den Seiten beziehen sich auf das Genom von Alfort-p447 (oben) und auf +ubi-Alfort (unten).

3. Ergebnisse

(C) Genomorganisation von CP G1, das aus RNA-Rekombination zwischen dem Genom von Alfort-p447 und +ubi-Alfort hervorging. Die rekombinante RNA enthält eine komplette Kopie von +ubi-Alfort, die an Nukleotid 10470 des Alfort-p447-Genoms fusioniert ist. Der unterlegte Teil von CP G1 wurde sequenziert. Die Region zwischen der 5'NTR und der Insertion Ubiquitin-kodierender Sequenzen (blau) ist teilweise durch Punkte ersetzt. Die errechnete Genomgröße ist rechts in kb angegeben. Der genetischer Marker M, eine eingeführte *ApaI*-Schnittstelle, zeigt die Anwesenheit von +ubi-Alfort entstammenden Sequenzen an. Die Genomeinteilung ist nicht maßstabsgetreu.

(D) Kristallviolett-Färbung von Zellen. Links wurden SK6-Zellen mit nzp KSPV Alfort-p447 infiziert, rechts mit biologisch kloniertem zp KSPV CP G1 in zweiter Zellkulturpassage. Nach Infektion wurden die Zellen mit 0,6 % „low melting point“-Agarose enthaltendem Medium überschichtet, inkubiert und nach 96 h fixiert und gefärbt. Das Auftreten eines ZPE bei mit CP G1 infizierten Zellen ist makroskopisch erkennbar.

rekombinantes, replikationskompetentes zp KSPV entstanden war. Daher wurde ein nach Infektion mit dem ZPE 1.P-Zellkulturüberstand (s. 3.3.1) entstandener Plaque einer dreifachen Plaquereinigung auf SK6-Zellen unterzogen, um das putative zp KSPV von dem nzp KSPV-Stamm Alfort-p447 zu trennen. Danach wurde Gesamtzell-RNA von der ersten Zellkulturpassage (CP G1-RNA) durch für KSPV spezifische „Northern Blot“-Hybridisierung analysiert. Dabei zeigte eine einzelne, spezifische Bande die Anwesenheit einer beträchtlich vergrößerten pestiviralen RNA mit einer Länge von ca. 18 kb an. Davon abgesehen gab es keine Hinweise auf die Anwesenheit des Genoms von Alfort-p447 oder anderer (Sub)-Genome (Abb. 28 A). Der biologisch klonierte KSPV-Stamm wird im Folgenden CP G1 genannt.

Zur weiteren molekularbiologischen Charakterisierung von CP G1 wurde die CP G1-RNA (s.o.) unter Verwendung verschiedener Primerpaare (s. Tab. 3 A) einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Mittels der mit Primerpaar 1 durchgeführten PCR wurde ein die Anwesenheit von duplizierten viralen Sequenzen anzeigendes spezifisches Produkt erhalten. Die Klonierung dieses Produkts und eine anschließende Nukleotidsequenzierung führte zur Identifizierung einer rekombinanten Sequenz, die auf nicht homologe RNA-Rekombination zwischen dem Genom von Alfort-p447 und +ubi-Alfort zurückzuführen ist (Abb 27 B). Die

3. Ergebnisse

daraus abgeleitete Genomorganisation von KSPV CP G1 ist durch eine Duplikation viraler Sequenzen sowie eine Insertion Ubiquitin-kodierender Sequenzen gekennzeichnet (Abb. 28 C). Das vergrößerte, rekombinante virale Genom erhält dabei den ORF und besteht aus einer vollständigen Version von +ubi-Alfort, die an das in der NS5B-kodierenden Region gelegene Nukleotid 10470 des Genoms von Alfort-p447 fusioniert ist. Die errechnete Genomgröße von CP G1 beträgt 18,139 kb und ist damit ungefähr 50 % größer als alle vorher beschriebenen KSPV-Genome. Diese Größe entspricht der vergrößerten viralen RNA, die in der „Northern Blot“-Analyse nachgewiesen wurde (Abb. 28 A). Desweiteren wurde auch ZPE 1.P-RNA (siehe oben) unter Verwendung von Primerpaar 2 einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Die nach Klonierung und Sequenzierung erhaltene Sequenz eines spezifischen PCR-Produkts bestätigte, dass das Genom von CP G1 schon vor der Plaquereinigung vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Für die RNA aus erster Gewebekulturpassage des biologisch klonierten zp KSPV CP G1 jedoch konnten auch unter Verwendung verschiedener Primerpaare durchgeführte RT-PCR-Analysen die Anwesenheit zusätzlicher, KSPV-spezifischer RNAs nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass auch sich anschließende Zellkulturpassagen von CP G1 zu einer Lyse von SK6-Zellen führten (Abb. 28 D), demonstrierte die Eigenschaft von CP G1, in SK6-Zellen einen ZPE unabhängig von einem Helfervirus zu verursachen.

3.3.3 Eigenschaften von CP G1 auf verschiedenen Zelllinien

Um zu überprüfen, ob KSPV CP G1 in der Lage ist, einen ZPE auch in anderen Zellen als der SK6-Zelllinie zu verursachen, wurden auch Infektionen von porzinen PK15- und bovinen MDBK-Zellen durchgeführt. Für eine vergleichende Analyse wurden diese Zelllinien entweder mit nzp KSPV Alfort-p447 oder mit zp CP G1 (in zweiter Zellkulturpassage nach bK) infiziert. Drei Tage später wurden die Zellen

3. Ergebnisse

lichtmikroskopisch untersucht und einer IF-Analyse unterzogen. Bei Infektionen mit CP G1 traten Plaques nicht nur bei SK6-Zellen, sondern auch bei PK15- und MDBK-Zellen auf (Abb. 29). Das Auftreten eines ZPE korrelierte dabei mit dem Nachweis von viralem Antigen (NS3) durch indirekte IF-Analyse (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu porzinen SK6- und PK15-Zellen resultierte eine Infektion von bovinen MDBK-Zellen mit CP G1 in einer deutlich geringeren Anzahl von Plaques (Daten nicht gezeigt). Desweiteren waren die in MDBK-Zellen auftretenden Plaques deutlich kleiner als die in den porzinen Zelllinien (Abb. 29).

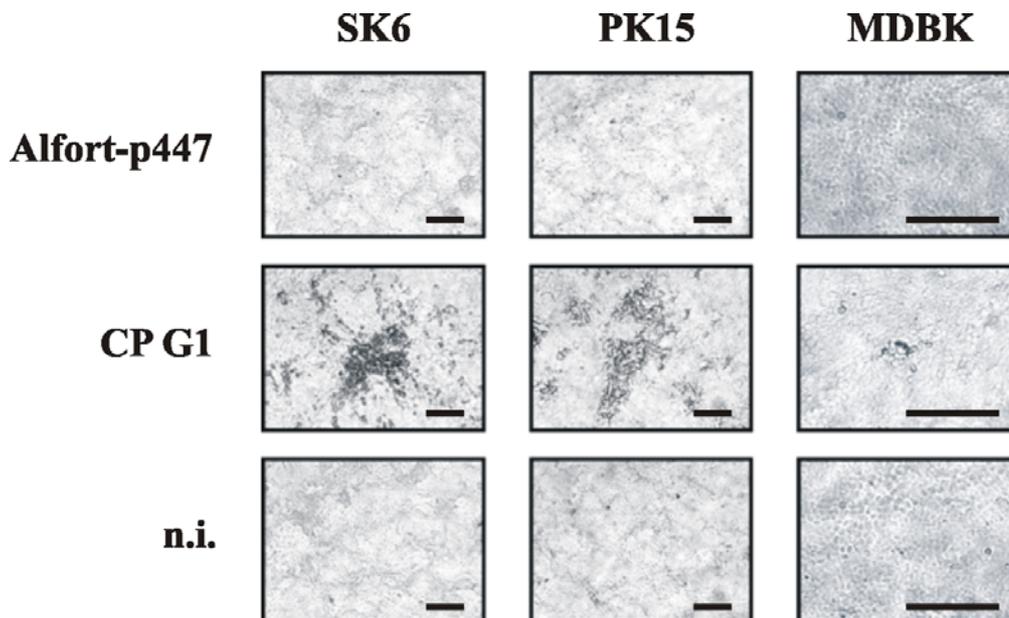


Abb. 29: Die Infektion mit KSPV CP G1 führt zu ZPE auf verschiedenen Zelllinien

Porzine SK6- (links) und PK15-Zellen (Mitte) sowie bovine MDBK-Zellen (rechts) wurden mit nzp KSPV Alfort-p447 (oben) oder mit KSPV CP G1 in der zweiten Zellkulturpassage (Mitte) infiziert. Nicht infizierte (n.i.) Zellen (unten) dienten als Negativkontrolle. Nach der Infektion wurden nur die porzinen Zellen mit 0,6 % „low melting agarose“ enthaltendem Medium überschichtet. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von 66 h bei 37 °C wurden die Zellen fixiert. Nur nach Infektion mit CP G1 war ein ZPE erkennbar. Die Balken entsprechen jeweils 200 µm.

3. Ergebnisse

Diese Beobachtungen bestätigen eine zuvor publizierte Studie, nach der bovine Zellen für Infektionen mit KSPV weniger empfänglich sind als porcine (Roehle & Edwards, 1994). Sowohl n.i. Zellen als auch mit nzp KSPV Alfort-p447 infizierte Zellen zeigten keinen ZPE (Abb. 29). Zusammengefasst belegen die vorliegenden Experimente, dass KSPV CP G1 einen ZPE in unterschiedlichen porcinen Zelllinien sowie auf einer bovinen Zelllinie verursacht.

3.3.4 Wachstumskinetik von CP G1

Zur weiteren Charakterisierung von zp KSPV CP G1 wurde eine Wachstumskurve erstellt. Dazu wurden während der bei einer m.o.i. von 0,3 durchgeführten dritten Zellkulturpassage von CP G1 zu definierten Zeitwerten über einen Zeitraum von 3 Tagen Teile des Zellkulturüberstands geerntet und durch neues Medium ersetzt. Die Menge von freigesetztem, infektiösem Virus in diesen Proben wurde anschließend durch lichtmikroskopische Auswertung und indirekte IF-Analyse von Titrationen auf SK6-Zellen bestimmt. Zum Vergleich wurde bei gleicher m.o.i. auch die Wachstumskinetik des parentalen nzp KSPV Alfort-p447 bestimmt (Abb. 30 A). Bei diesem wurde der maximale Virustiter (2.3×10^7 TCID₅₀/ml Zellüberstand) 43 h p.i. erreicht. Der dazu mit einem Wert von 1.3×10^7 TCID₅₀/ml ähnlich hohe maximale Virustiter wurde bei der Infektion mit CP G1 36 h p.i. erreicht. Als Folge der durch das zp Virus verursachten Zelllyse fielen die Titer zu späteren Zeitpunkten ab. Zusammengefasst zeigen die Infektionen mit CP G1 und Alfort-p447 bis 36 h p.i. eine ähnliche Wachstumskinetik.

3.3.5 NS3-Expression von CP G1

Die Zytopathogenität von Pestiviren korreliert mit einer starken Expression von NS3, dem C-terminalen Teil von NS2-3 (z.B. Aoki et al., 2004, Becher et al., 1996,

3. Ergebnisse

Meyers & Thiel, 1995). Die genetische Basis für eine starke Expression von NS3 und virale Zytotoxigenität wurde für viele Pestivirusstämme aufgeklärt (Baroth et al., 2000, Becher et al., 2001b, Becher et al., 2002, Kümmerer & Meyers, 2000, Mendez et al., 1998, Meyers et al., 1996a, Meyers et al., 1996c, Meyers et al., 1998). Für pestivirale Genome mit Ubiquitin-kodierenden Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen konnte gezeigt werden, dass die Insertion von Ubiquitin eine zusätzliche Spaltstelle in das virale Polyprotein einführt.

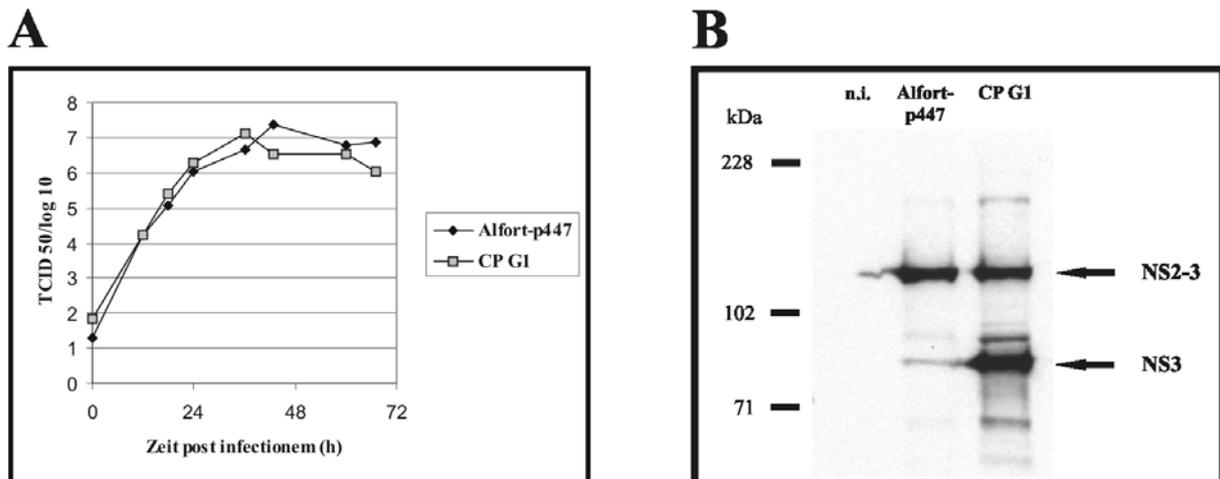


Abb. 30: Wachstumskinetik und NS2-3/NS3-Expression der KSPV-Stämme CP G1 und Alfort-p447

(A) Wachstumskinetik von zp KSPV CP G1 im Vergleich mit nzp KSPV Alfort-p447. SK6-Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 infiziert. Die Infektiositätstiter der zu den angezeigten Zeitpunkten und über einen Zeitraum von 72 h geernteten Überstände wurden durch Titration ermittelt.

(B) Immunoblotanalyse. SK6-Zellen wurden mit CP G1 und nzp Alfort-p447 bei jeweils einer m.o.i. von 0,3 infiziert und 24 h später lysiert. Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen einer „SDS-PAGE“ unterzogen, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und unter Verwendung eines monoklonalen anti-NS3-Antikörpers analysiert. Bei der Probe von mit CP G1 infizierten Zellen sind große Mengen an NS3 erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigen mit Alfort-p447 infizierte Zellen nur eine geringe Expression an NS3. Die Mengen an ungespaltenem NS2-3 sind bei beiden Proben vergleichbar. Nicht infizierte Zellen (n.i.) dienen als Negativkontrolle. Die Größen der Markerproteine sind links in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Positionen von NS2-3 und NS3 sind durch Pfeile auf der rechten Seite markiert.

3. Ergebnisse

Dieser Prozessierungsschritt führt zu einer effizienten Freisetzung von NS3 (Abb. 7, Tautz et al., 1993). Eine entsprechende Studie für KSPV belegte, dass die Einführung von Ubiquitin-kodierenden Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen bei einem über reverse Genetik erzeugten, von einem Helfervirus abhängigen Subgenom zur starken Expression von NS3 und dem Auftreten eines damit korrelierenden ZPE in Zellkultur führt (Moser et al., 1999). Im Gegensatz zu nzp BVDV, wo NS3 nur in den ersten Stunden p.i., nicht aber zu späteren Zeitpunkten nachweisbar ist (Lackner et al., 2004), kann nach Infektionen mit nzp BDV und nzp KSPV eine relativ geringe Menge NS3 auch zu späteren Zeitpunkten gefunden werden (Becher et al., 1994, Meyers et al., 1995).

Um die Expression von NS3 und ungespaltenem NS2-3 nach Infektion mit KSPV CP G1 zu untersuchen, wurden SK6-Zellen bei einer m.o.i. von 0,3 infiziert, 24 h p.i. lysiert und die so gewonnene Probe einer Immunoblotanalyse unter Verwendung eines NS3-spezifischen Antikörpers unterzogen. Zum Vergleich wurde eine entsprechende Probe von mit nzp KSPV Alfort-p447 infizierten Zellen einbezogen (Abb. 30 B). Diese Analyse zeigte nur für die Infektion mit CP G1 große Mengen an freiem NS3. Nach Infektion mit nzp KSPV Alfort-p447 war die nachgewiesene Menge an NS3 deutlich geringer. Die Mengen an ungespaltenem NS2-3 waren für die nach Infektionen mit dem nzp Virus und dem zp Virus erhaltenen Proben etwa gleich (Abb. 30 B).

3.3.6 Eignung von CP G1 für Serumneutralisationstests

Der Serumneutralisationstest (SNT) stellt den Goldstandard für den indirekten Nachweis von Infektionen mit dem Virus der Klassischen Schweinepest dar. In zu untersuchenden Serumproben werden gegen KSPV gerichtete, neutralisierende Antikörper (Ak) durch die Hemmung der Infektion von Zellkulturen mit bestimmten KSPV-Stämmen nachgewiesen. Da die hierfür eingesetzten KSPV-

3. Ergebnisse

Stämme nzp sind, muss die Auswertung der SNTs durch IF-Analyse oder Immunoperoxidasetests erfolgen, die arbeits- und zeitintensive Prozesse darstellen. Um zu überprüfen, ob zp KSPV CP G1 geeignet ist, die Durchführung solcher SNTs zu erleichtern, wurden entsprechende Versuche durchgeführt, die vergleichend auch das parentale nzp KSPV Alfort-p447 einbezogen. Als Serumproben für diese Experimente wurden ein Hyperimmunserum eines mit KSPV infizierten Schweins (pkS- α KSPV) und ein Serum von einem mit BDV X818 infizierten Schaf verwendet (pkS- α BDV), das kreuzneutralisierende Ak gegen KSPV enthält (Avalos-Ramirez, 2002). Bei den mit CP G1 durchgeführten SNTs stimmten die Titer an neutralisierenden Antikörpern, die auf relativ einfache Weise nach lichtmikroskopischer Auswertung des virusinduzierten ZPEs bestimmt wurden, mit denen überein, die über eine Auswertung durch indirekte IF-Analyse erhalten wurden (Tab. 7). Für beide untersuchten Seren resultierten die mit CP G1 oder Alfort-p447 durchgeführten SNTs in sehr ähnlichen, durch indirekte IF-Analyse erhaltenen Titern an neutralisierenden Ak-Titern (Tab. 7).

	Serumtiter (LM)	Serumtiter (IF)
pkS-αKSPV + nzp Alfort-p447	nicht möglich	3793
pkS-αKSPV + zp CP G1	2900	2900
pkS-αBDV + nzp Alfort-p447	nicht möglich	6,1
pkS-αBDV + zp CP G1	9,6	9,6

Tab. 7: Antikörpertiter aus Serumneutralisationstests

Titer an KSPV-neutralisierenden Antikörpern des Schweineserums pkS- α KSPV und des Schafserums pkS- α BDV. Die Serumneutralisationstests wurden unter Verwendung von nzp KSPV Alfort-p447 und zp KSPV CP G1 durchgeführt und, falls möglich, mit dem Lichtmikroskop (LM) sowie durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) bestimmt. Die TCID₅₀ der beiden Virusgebrauchslösungen betrug jeweils 279 infektiöse Einheiten/50 μ l. Die angegebenen Titer entsprechen den reziproken Werten der höchsten Serumverdünnung, die eine Virusreplikation in 50% der Replikate vollständig verhinderte.

3. Ergebnisse

Zusammengefasst konnte hier gezeigt werden, dass zp KSPV CP G1 für die Durchführung von SNTs zur Diagnose der Infektion mit KSPV geeignet erscheint. Allerdings erübrigt sich im Gegensatz zu mit nzp KSPV durchgeführten SNTs für die Testauswertung der arbeitsaufwändige Nachweis von viralem Protein.

3.3.7 Genetische Stabilität von CP G1

Genome von zp BVD-Viren, die Duplikationen viraler Sequenzen beinhalten, können durch RNA-Rekombination sekundären genetischen Veränderungen unterliegen, die zu verschiedenen genomischen Deletionen führen. Als Ergebnis solcher Prozesse wurde das Entstehen von nzp BVD-Viren oder viraler Subgenome aus zp BVD-Viren während Zellkulturpassagen beschrieben (Baroth et al., 2000, Becher et al., 2001b). Es wurde daher als wichtig angesehen, die genetische Stabilität des zp KSPV-Stamms CP G1 zu untersuchen, der in seinem Genom neben einer Insertion zellulärer Sequenzen eine Duplikation viraler Sequenzen von mehr als 5 kb beinhaltet. Das mögliche Auftreten von nzp Viren während fortlaufender Zellkulturpassagen von CP G1 wurde durch lichtmikroskopische Auswertung und indirekte IF-Analyse von infizierten Zellen kontrolliert. Auch nach 10 Passagen ergaben IF-Analysen von Zellen, die mit verdünntem Zellkulturüberstand infiziert wurden, keine Hinweise auf die Anwesenheit eines nzp Virus (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde Gesamtzell-RNA aus der 10. Zellkulturpassage von CP G1 (CP G1-P10) einer „Northern Blot“-Analyse unterzogen. Interessanterweise zeigte die Verwendung einer KSPV-spezifischen, radioaktiv markierten Probe die Anwesenheit einer viralen genomischen RNA, die zwar kürzer als das Genom von CP G1 war, aber mit einer geschätzten Größe von 15 kb immer noch deutlich größer war als die genomische RNA von nzp Alfort-

3. Ergebnisse

p447. Außerdem war auch eine spezifische und breite Bande sichtbar, die deutlich kleiner als das Genom von nzp Alfort-p447 war (Abb. 31 A).

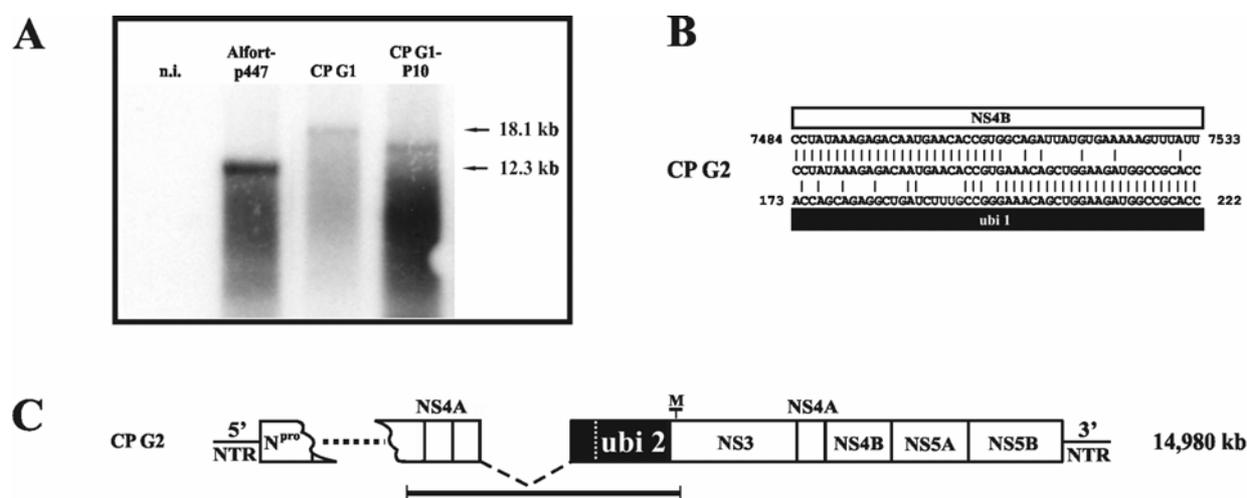


Abb. 31: Genetische Stabilität des zp KSPV-Stamms CP G1 nach Zellkulturpassagen

(A) „Northern Blot“-Analyse von Gesamtzell-RNA von mit nzp KPSV Alfort-p447 infizierten und nicht infizierten (n.i.) SK6-Zellen, sowie von der 1. (CP G1-P1) und 10. Zellkulturpassage (CP G1-P10) von biologisch kloniertem zp KSPV CP G1. Für die Hybridisierung wurde ein radioaktiv markiertes cDNA-Fragment verwendet, das den Nukleotiden 5560 bis 8340 des Genoms von Alfort-p447 entspricht. Positionen und Größen der viralen genomischen RNAs von Alfort-p447 sowie von CP G1 sind rechts in kb angegeben. Bei der CP G1-P10 RNA sind ein vergrößertes Genom von ca. 15 kb und eine breite, subgenomische Bande erkennbar.

(B) „crossover“-Region von CP G2. CP G1-P10 RNA wurde einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Ein die Anwesenheit von duplizierten viralen Sequenzen anzeigendes, spezifisches Produkt wurde kloniert und sequenziert. Als Resultat entsprechender Sequenzanalysen zeigt das Modell einen Vergleich der rekombinanten Sequenz CP G2 (Mitte) mit ihren parental RNAs, die Sequenzen von CP G1 entsprechen und für Teile von NS4B (oben) oder ubi 1 (unten, s. Abb. 28 C) kodieren. Sequenzübereinstimmungen zwischen der rekombinanten und den parental Sequenzen sind durch vertikale Linien gekennzeichnet. Die genomischen Regionen der parental Sequenzen sind als Kästchen über und unter dem Sequenzvergleich angegeben. Die flankierenden Nummerierungen beziehen sich auf die Genome von KSPV CP G1 (oben) und auf +ubi-Alfort (unten).

(C) Genomorganisation von KSPV CP G2. Die Region zwischen der 5'NTR und dem 5'-terminalen NS4A-Gen ist teilweise durch Punkte ersetzt. Die rekombinante RNA besteht aus Sequenzen, die in ihrem 5'-Bereich einem 3'-verkürztem Genom von CP G1 entsprechen (links). Dieser Genomanteil ist an Sequenzen fusioniert, die dem 3'-Bereich des Genoms von CP G1 entsprechen (rechts). Diese Sequenzen sind durch gestrichelte Linien miteinander verbunden. Der unterlegte Teil von CP G2 wurde sequenziert. Die errechnete Genomgröße ist rechts in kb angegeben. M zeigt den genetischen Marker (eingeführte *ApaI*-Schnittstelle) für Sequenzen, die +ubi-Alfort entstammen. Die Balkenlängen sind nicht maßstabsgetreu.

3. Ergebnisse

Zur weiteren Charakterisierung wurde die CP G1-P10 RNA mehreren RT-PCR-Analysen unterzogen. Unter Verwendung von Primerpaar 2 konnte ein für das Genom von CP G1 spezifisches Produkt nicht mehr nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte eine RT-PCR unter Verwendung von Primerpaar 3 zu einem die Anwesenheit duplizierter viraler Sequenzen anzeigenden, spezifischen Produkt, das kloniert und sequenziert wurde. Gemäß anschließender, vergleichend durchgeführter Sequenzanalysen sind in der rekombinanten RNA Sequenzen, die den ersten 7509 Nukleotiden von CP G1 entsprechen, an Sequenzen fusioniert, die einem deutlich 5'- verkürzten Genom von CP G1 entsprechen, die die ubi 2-kodierenden Sequenzen aber immer noch vollständig enthalten (Abb. 31 B). Der ORF bleibt dabei erhalten. Die errechnete Gesamtgröße von 14,980 kb dieses rekombinanten KSPV-Genoms (CP G2), das nach 10 Zellkulturpassagen von CP G1 entstanden ist, passt gut zu der verkleinerten genomischen RNA aus der „Northern Blot“-Analyse (Abb. 31 A).

Um auch die in der „Northern Blot“-Analyse entdeckte subgenomische virale Bande charakterisieren zu können, wurde eine RT-PCR-Analyse der CP G1-P10 RNA unter Verwendung des Primerpaares 4 durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedlich große, spezifische Produkte erhalten, die einer grösseren Anzahl viraler, subgenomischer RNAs entsprechen. Im Gegensatz dazu wurden keine Produkte erhalten, wenn für eine entsprechende RT-PCR Gesamtzell-RNA von n.i. Zellen oder von entweder mit nzp KSPV Alfort-p447 infizierten Zellen oder CP G1-RNA (erste Zellkulturpassage nach biologischer Klonierung) verwendet wurde. Die Sequenzanalyse der klonierten spezifischen Produkte führte zur Identifikation von 12 viralen subgenomischen RNAs. Diese KSPV-Rekombinanten (Subgenome 1 bis 12) gingen jeweils aus der Fusion von N^{pro}- oder C-kodierenden Sequenzen mit Sequenzen hervor, die dem BVDV CP14-spezifischen Genomabschnitt von CP G1 entsprechen. Alle Subgenome erhalten dabei den ORF und beinhalten

3. Ergebnisse

individuelle Rekombinationsstellen, wobei sie mindestens eine vollständige Kopie Ubiquitin-kodierender Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen enthalten (ubi 2, Abb. 32 und 33). Die errechnete Genomgröße der Subgenome 1 bis 12 reicht von 7,888

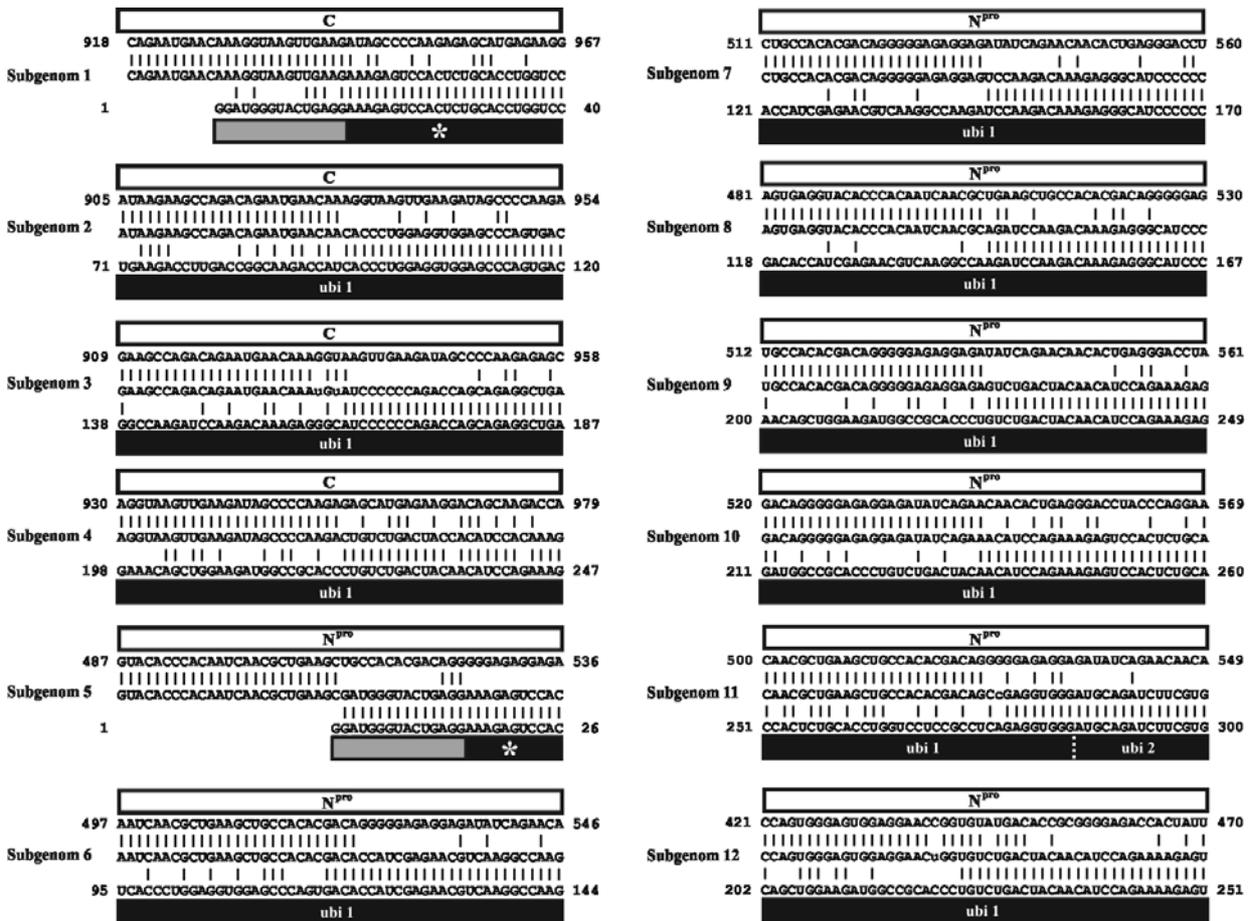


Abb. 32: Rekombinationsregionen der KSPV-Subgenome 1 bis 12

CP G1-P10-RNA wurde einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Spezifische Produkte, die die Anwesenheit von subgenomischen viralen Sequenzen anzeigten, wurden kloniert und sequenziert. Als Resultat entsprechender Sequenzanalysen werden die rekombinanten Sequenzen der Subgenome 1 bis 12 (Mitte) jeweils mit ihren parental Sequenzen verglichen, die der N^{pro}- oder C-kodierenden Region (oben) und dem BVDV CP14 entstammenden Genomanteil von CP G1 (unten) entsprechen. Sequenzübereinstimmungen zwischen den rekombinanten und den parental Sequenzen sind durch vertikale Linien gekennzeichnet. Die genomischen Regionen der parental Sequenzen sind als Kästchen über und unter den Sequenzvergleichen angegeben. Die flankierenden Nummerierungen an den Seiten beziehen sich auf das Genom von KSPV CP G1 (oben) und +ubi-Alfort (unten).

3. Ergebnisse

kb bis 8,596 kb (Abb. 33). Wie aus vorherigen Studien über pestivirale Subgenome abgeleitet werden kann (Meyers et al., 1996, Mittelholzer et al., 1997), sind die Subgenome 1 bis 12 von einem Helfervirus abhängig. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass nach der 10. Zellkulturpassage von CP G1 zusätzliche, nicht identifizierte Subgenome vorhanden waren. Zusammengefasst resultierte die Passagierung des zp KSPV-Stamms CP G1 in verschiedenen internen genomischen Deletionen, die zur Entstehung der viralen genomischen RNA CP G2 sowie zu der von mindestens 12 verschiedenen viralen Subgenomen führten.

Um zu bestimmen, ob die KSPV-Subgenome oder deren Vorläufer schon vor der 10. Passage entstanden waren, wurde eine Subgenom-spezifische RT-PCR-Analyse (s.o.) durchgeführt, die RNAs von der 1. Zellkulturpassage von CP G1 (CP G1-RNA) und RNAs von Zellen beinhaltete, die mit dem Zellkulturüberstand der 1. bis 9. Zellkulturpassage von CP G1 infiziert worden waren (P2-P10). Spezifische Produkte, die die Anwesenheit von Subgenomen anzeigten, wurden nur für die RNAs P2-P10, nicht aber bei der Analyse der CP G1-RNA erhalten (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass KSPV-Subgenome schon während der 2. Zellkulturpassage von CP G1 entstanden waren.

Um die genetische Stabilität von KSPV CP G2 zu bestimmen, wurden 5 aus einer 11. Zellkulturpassage von CP G1 erhaltene Plaques einer mindestens dreifachen Plaquareinigung unterzogen und anschliessend passagiert. Wieder blieb der zp Biotyp erhalten. RT-PCR- und „Northern Blot“-Analysen von RNAs aus der jeweils 11. Zellkulturpassage zeigten bei 3 von 5 Proben die Anwesenheit einer genomischen RNA an, die in ihrer Größe dem Genom von CP G2 entspricht. Bei 2 von 5 RNAs war das CP G2-Genom durch eine virale genomische RNA mit einer Länge von 14-14,5 kb ersetzt. Bei allen Proben lagen virale subgenomische RNAs

3. Ergebnisse

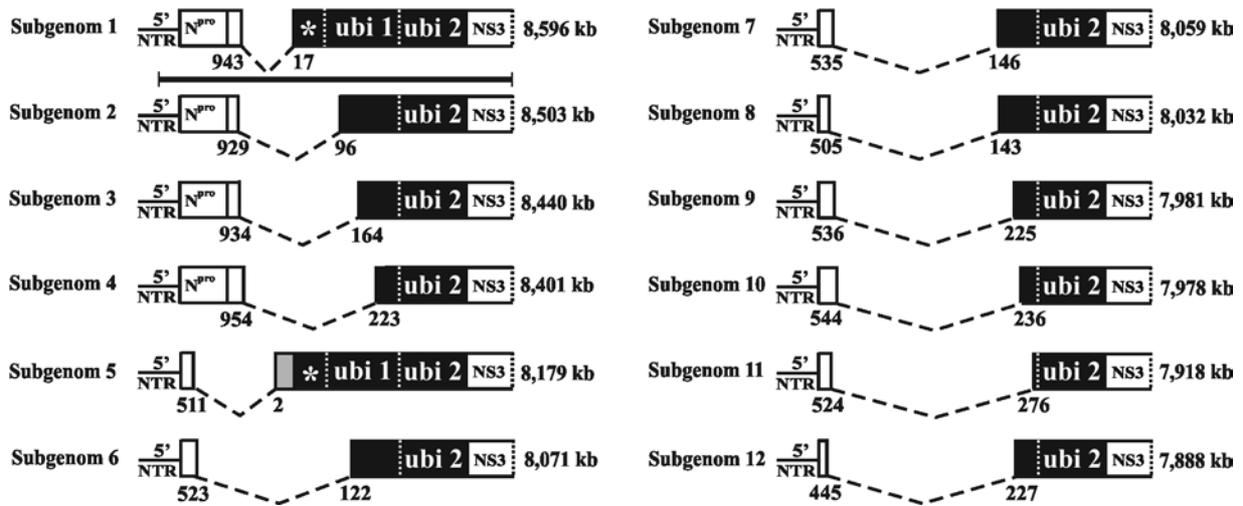


Abb. 33: Genomorganisationen der rekombinanten KSPV-Subgenome 1 bis 12

Genomorganisationen und errechnete Größen der rekombinanten KSPV-Subgenome 1 bis 12, die aus nicht homologer RNA-Rekombination zwischen Sequenzen hervorgingen, die jeweils einem 5'- und einem 3'-Anteil des Genoms von KSPV CP G1 entsprechen. Diese Genomanteile sind jeweils durch gestrichelte Linien miteinander verbunden. Die stromabwärts vom 5'-Anteil des NS3-Gens gelegene Region ist nicht dargestellt. Die Zahlen unter den rekombinanten Genomen beziehen sich jeweils auf das Genom von KSPV CP G1 (links) und +ubi-Alfort (rechts) und zeigen die Position der durch RNA-Rekombination verknüpften Nukleotide an. Im Falle einer Sequenzübereinstimmung der parentalen Sequenzen an der Rekombinationsstelle (z.B. Abb. 32, Subgenom 1), wurden die Zahlen unter Annahme der maximalen Integration der 5'-Sequenz angegeben. Wie für Subgenom 1 durch eine Linie unter der Genomorganisation angedeutet, wurde bei allen Subgenomen die genomische Region vom ersten Nukleotid der viralen 5'NTR bis zum 5'-Teil des NS3-Gens sequenziert. Die errechnete Genomgröße ist für jedes Subgenom rechts in kb angegeben. Die Genomeinteilung ist nicht maßstabsgetreu.

mit einer Länge von etwa 7,5 bis 8,5 kb vor (Daten nicht gezeigt). Damit repräsentiert ähnlich zu CP G1 auch CP G2 ein von einem Helfervirus unabhängiges zp KSPV, das während Zellkulturpassagierung genetisch nicht stabil ist.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung und Charakterisierung eines in vivo RNA-Rekombinationssystems für BVDV

Die Bedeutung von RNA-Rekombination für die Evolution und Genomkonservierung einer großen Anzahl an RNA-Viren von Tieren, Pflanzen und Bakterien ist in diesbezüglichen Studien gut belegt (Agol, 1997, Dolja & Carrington, 1992, Lai, 1992, Nagy & Simon, 1997, Strauss & Strauss, 1988, Worobey & Holmes, 1999). In der Veterinärmedizin spielt RNA-Rekombination bei einer letal verlaufenden Erkrankung des Rindes, der „Mucosal Disease“ (MD), eine wichtige Rolle. Wie zuvor ausgeführt (1.2.3), konnte durch eine Vielzahl von Studien die Ätiologie dieser Erkrankung, bei der aus einem mit nzp BVDV persistent infizierten Rind immer auch ein antigenetisch sehr ähnliches zp BVDV isoliert werden kann (Abb. 6), aufgeklärt werden. Diese Studien zeigten, dass das MD-auslösende zp BVDV meist endogen aus dem persistierenden nzp BVDV durch RNA-Rekombination entsteht. Detaillierte Untersuchungen isolierter Paare aus jeweils einem nzp und einem zp Pestivirus leisteten einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der genetischen Grundlage des zytopathogenen Biotyps (Abb. 7) und führten dabei unter anderem zur Identifizierung und Charakterisierung einer großen Anzahl zellulärer mRNA-Insertionen in zp Pestivirusgenomen (Tab. 1). Allerdings lassen diese deskriptiven, auf der Analyse der Rekombinationsstellen von zp pestiviralen Genomen beruhenden Studien keine allgemeingültige Aussage über den der RNA-Rekombination zugrundeliegenden Mechanismus zu, da die rekombinanten Genome von zp Pestiviren in der Regel auf jeweils unterschiedliche Paare von Rekombinationspartnern zurückzuführen sind. Die experimentelle Erzeugung von MD im Tier stellt neben ethischen Gesichtspunkten vor allem wegen der schlechten Beeinflussbarkeit des Versuchsansatzes und dem erheblichen

4. Diskussion

materiellen und zeitlichen Aufwand keine relevante Option für die Etablierung eines pestiviralen Rekombinationssystems dar.

Um eine gezielte Überprüfung der aus Sequenzanalysen rekombinanter Virusgenome abgeleiteten Arbeitshypothesen zu ermöglichen und grundlegende Aspekte der RNA-Rekombination studieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das erste *in vivo* RNA-Rekombinationssystem für BVDV in Zellkultur etabliert. Der Ansatz beruht auf der Transfektion des synthetischen, nicht replikationskompetenten Transkripts +ubi SGT in mit nzp BVDV NCP7 infizierte Zellen. Der 5'-Teil von +ubi SGT besteht aus Genomanteilen des zp BVDV-Stamms CP14. Vorherige Untersuchungen belegten bereits, dass diese Sequenzen, die unter anderem für Polyubiquitin kodieren und direkt vor dem NS3-Gen liegen (Abb. 9 A), zur Expression von NS3, dem Markerprotein für pestivirale Zytopathogenität, führen (Tautz et al., 1993). Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass eine Insertion Ubiquitin-kodierender Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen die genetische Basis für pestivirale Zytopathogenität darstellt (Becher et al., 2001b). Die Identifizierung eines ZPE in Zellkultur nach Transfektion von +ubi SGT in mit nzp NCP7 infizierte Zellen (Abb. 9 B) stellte daher das phänotypische Selektionsmerkmal für eine zwischen dem 5'-Ende von +ubi SGT und dem Genom von NCP7 stattgefundene RNA-Rekombination dar, aus der replikationskompetente, zp virale Genome hervorgingen. Die Generierung von BVDV-Rekombinanten mit zp Biotyp durch RNA-Rekombination in mit nzp BVDV infizierten bovinen Zellen ahmt dabei die Situation nach, die im persistent mit nzp BVDV infizierten Tier bei der Entstehung von MD vorliegt. Entsprechende Kontrollen belegen, dass in diesem System die Anwesenheit der für die synthetische Transkription verwendeten, linearisierten cDNA für das Auftreten eines ZPE in Zellkultur keine Rolle gespielt hat (Abb. 10).

4. Diskussion

Im Prozess der sich anschließenden Optimierung dieses Rekombinationssystems zur Quantifizierung und Analyse unabhängig entstandener ZPEs in Zellkultur konnte gezeigt werden, dass deren Anzahl unmittelbar von den transfizierten Mengen des synthetischen Transkripts +ubi SGT abhängt (Abb. 11). Damit konnte experimentell die Hypothese bestätigt werden, dass die Häufigkeit der RNA-Rekombination mit der Menge der beteiligten Partner korreliert (Agol, 1997).

Die detaillierte Analyse der Rekombinationsregionen von 46 im Rahmen dieser Quantifizierungsstudien isolierten zp BVDV-Genome zeigte in allen Fällen, dass die rekombinanten Genome aus nicht homologer Rekombination zwischen dem Genom von NCP7 und dem 5'-terminalen Teil von +ubi SGT hervorgegangen sind (Abb. 13). Die Rekombinationsstellen im Genom von NCP7 waren über nahezu das gesamte Genom verteilt, ein echter „hot spot“ für RNA-Rekombination konnte nicht identifiziert werden (Abb. 14). Allerdings lag eine Häufung der Rekombinationsorte in der für die NS kodierenden Region, insbesondere in einem 66 Nukleotide umfassenden Sequenzabschnitt vor. Dieses Phänomen könnte das Ergebnis einer sekundären, funktionellen Selektion der durch RNA-Rekombination entstandenen Virus-Genome auf ihre Replikationseffizienz darstellen. Bestimmte Genomorganisationen könnten dadurch anderen gegenüber bevorteilt gewesen sein, wodurch solche Rekombinanten eher isoliert wurden. Diese Hypothese bedarf aber noch weiterer Abklärung.

Bemerkenswerterweise konnte mit Hilfe des *in vivo* Rekombinationssystems das größte bislang beschriebene, replizierende Pestivirusgenom (R-cp 46) erzeugt werden (Abb. 15). Darüber hinaus stellten die vorliegenden zp BVDV-Genome R-cp 1 bis R-cp 46 die größte bisher analysierte Anzahl von rekombinanten Pestivirussequenzen dar, die aus RNA-Rekombination zwischen jeweils demselben Paar zweier definierter parentaler RNA-Moleküle hervorgegangen sind (Abb. 13 und 14). Eine detaillierte Analyse dieser Rekombinationsstellen war daher

4. Diskussion

bezüglich der gegebenen Möglichkeit zum Nachweis von RNA-Rekombination beeinflussenden Sequenzmotiven von besonderer Bedeutung. Die Tatsache, dass mindestens ein Nukleotid unklaren Ursprungs in 50 % der 46 Rekombinationsstellen zu finden war, liefert Hinweise auf einen Einfluss der Primärsequenzen der parentalen Moleküle auf die RNA-Rekombination. Bei zufälliger Rekombination wäre dies statistisch gesehen nur in 25 % der Fälle zu erwarten gewesen. Darüber hinaus waren Rekombinationsstellen mit 2 bis 5 Nukleotiden unklarer Herkunft zwischen 3.8 und 22 Mal häufiger als auf einem Zufallsmodell basierende Berechnungen ergaben (Abb. 13). Unter Annahme eines replikativen Mechanismus der RNA-Rekombination deuten solche kurzen, identischen Sequenzbereiche in der Nähe des Rekombinationsortes darauf hin, dass eine Basenpaarung zwischen einem zum ersten Rekombinationspartner komplementären Strang, der „nascent“-RNA, und dem zweiten Rekombinationspartner (Akzeptor-RNA) einen „template switch“ der viralen RdRp begünstigt hat (Abb. 3). Allerdings zeigt die exakte Bestimmbarkeit von 23 Rekombinationsstellen, dass mindestens 50 % der Rekombinationsereignisse unabhängig von einer solchen Basenpaarung stattgefunden haben. Obwohl Hinweise vorliegen, dass die Ausbildung von Heteroduplexstrukturen zwischen den Rekombinationspartnern (Abb. 4) manche Rekombinationsereignisse begünstigt haben könnten (Daten nicht gezeigt), sind sie dafür aber nicht notwendig. Auf der Grundlage von Analysen der Rekombinationsregionen von *zp* pestiviralen Genomen, die aus an MD erkrankten Tieren isoliert worden waren, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass Basenpaarung bei der RNA-Rekombination von Pestiviren eine wichtige Rolle spielen könnte (Becher et al., 1999a). Die ersten mit dem *in vivo* RNA-Rekombinationssystem für BVDV gewonnenen Ergebnisse unterstützen diese Hypothese.

4.2 Mechanistische Studien zur RNA-Rekombination *in vivo*

Ein großer Vorteil des etablierten Rekombinationssystems lag darin, dass es zunächst die gezielte Modifikation des Rekombinationspartners +ubi SGT erlaubte. Dadurch konnten grundlegende Aspekte der RNA-Rekombination in Zellkultur genauer untersucht werden.

Die Studie zum Einfluss der Polarität des in mit NCP7 infizierte Zellen transfizierten, synthetischen Transkripts +ubi SGT ergab, dass bei Verwendung eines entsprechenden Transkripts negativer Polarität (-ubi SGT) selbst dann keine zytopathogenen Rekombinanten entstanden, wenn die eingesetzte RNA-Menge das Dreißigfache der verwendeten Menge überstieg, bei der nach Transfektion von +ubi SGT noch ein ZPE beobachtet werden konnte (Abb. 16). Dies belegte, dass in diesem Experiment keine replikative RNA-Rekombination (durch einen nicht homologen „template switch“ während der viralen Plusstrangsynthese; Abb. 1 H) zwischen dem replizierenden Partner NCP7 und dem nicht replizierenden Partner -ubi SGT stattgefunden hat. Die daraus resultierenden rekombinanten viralen Plusstränge wären direkt infektiös gewesen.

Durch nicht replikative Rekombination zwischen den Minussträngen der beiden Partner (Abb. 2 C) hätten allerdings sehr wohl rekombinante Minusstranggenome entstanden sein können, die als Matrize für die Synthese genomischer, replizierender und infektiöser Plusstränge nur nicht zur Verfügung standen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden mit dem nzp BVDV-Subgenom NCP413 transfizierte Zellen mit dem Minusstrang des zp BVDV CP7-5A transfiziert. Trotz der Anwesenheit des funktionell aktiven viralen Replikationsapparates des Subgenoms konnte aber mehrere Tage nach Transfektion kein ZPE entdeckt werden (Abb. 17). Als sehr wichtiges Resultat zeigt dieses Experiment, dass der pestivirale Replikationskomplex die virale Plusstrangsynthese an einem (synthetischen) Minusstrang *in trans* nicht initiieren kann, da sonst infektiöse

4. Diskussion

Genome von zp BVDV CP7-5A entstanden wären. Daraus lässt sich ableiten, dass mit unserem Zellkultursystem für RNA-Rekombination, das auf der Identifizierung replizierender zp Genome basiert, möglicherweise stattfindende Rekombinationsereignisse zwischen pestiviralen Minusstrangsequenzen nicht detektierbar sind. Obwohl die vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass die analysierten Rekombinationsereignisse ausschließlich zwischen Sequenzen positiver Polarität erfolgten, konnte daher im Rahmen dieses Systems die Frage nicht beantwortet werden, ob auch pestivirale RNA-Minusstränge miteinander rekombinieren.

Aus der Transfektion von -CP7-5A, dem Minusstrang des zp BVDV-Genoms von CP7-5A, in mit nzp NCP7 infizierte Zellen resultierte ebenfalls kein ZPE. Dadurch konnte die Aussage getroffen werden, dass, obwohl in einem Bereich von mehreren kb eine hundertprozentige Sequenzhomologie zwischen dem Minusstrang des replizierenden Genoms von NCP7 und der -CP7-5A-RNA vorlag, während der Plusstrangsynthese von NCP7 homologe RNA-Rekombination nicht stattgefunden hat. Durch diese Untersuchung konnte für Pestiviren die für Poliovirus aufgestellte These bestätigt werden, dass replikative RNA-Rekombination nicht oder nur sehr eingeschränkt während der viralen Plusstrangsynthese stattfindet (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Falls der RNA-Rekombination bei Pestiviren tatsächlich ein replikativer Mechanismus zu Grunde liegt, so belegt bereits die häufig beobachtete Insertion zellulärer mRNA-Sequenzen in zp Pestivirusgenomen, dass replikative Rekombination zumindest auch während der Minusstrangsynthese stattfindet (Becher et al., 1999a, Abb. 8).

Die Untersuchungen zur Stabilität des synthetischen Transkripts +ubi SGT zeigten, dass diese RNA in infizierten wie in nicht infizierten Zellen 3 und 6 h post transfectionem (p.t.) in ähnlichen Mengen vorliegt (Abb. 18). Dieses Ergebnis legt nahe, dass, obwohl eine Initiation der Minusstrangsynthese am 3'-Ende von +ubi

4. Diskussion

SGT durch den viralen Replikationskomplex von NCP7 *in trans* nicht ausgeschlossen werden kann, die replikationsinkompetente RNA +ubi SGT auch *in trans* nicht repliziert wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass die zum Zeitpunkt von 3 h p.t. in n.i. Zellen vorliegende Menge an transfizierter +ubi SGT-RNA bis 24 h p.t. wahrscheinlich durch zelluläre RNasen fast vollständig abgebaut wurde (Abb. 18). Da die Häufigkeit von RNA-Rekombination von der Menge an transfizierter RNA abhängt (Abb. 11), kann angenommen werden, dass die Rekombinationsereignisse, die in den mit +ubi SGT durchgeführten Experimenten beobachtet wurden, hauptsächlich in den ersten Stunden p.t. stattgefunden haben.

Durch das in Kapitel 3.2.4 geschilderte Experiment konnte gezeigt werden, dass im etablierten RNA-Rekombinationssystem auch dann noch das Entstehen eines ZPE beobachtet werden kann, wenn beide Partner als synthetische Transkripte (NCP7-5A und +ubi SGT) generiert und in nicht infizierte Zellen koelektroporiert wurden (Abb. 19 A). Dies ermöglichte die gezielte Veränderung beider Rekombinationspartner. Nach einer Koelektroporation mit +ubi SGT konnten sogar dann noch rekombinante Viren isoliert werden, wenn eine letale Mutation in die 3'NTR von NCP7-5A eingeführt wurde (Abb. 19). Dieses Experiment belegte, dass die in unserem System nach Kotransfektion synthetischer RNAs auftretenden Rekombinationsereignisse von der autonomen Replikationskompetenz der dabei beteiligten Rekombinationspartner unabhängig sind. Interessanterweise erlaubte dieser modifizierte Versuchsansatz auch den Nachweis und die Isolierung von nzp BVDV-Rekombinanten, die teilweise einen äußerst ungewöhnlichen Genomaufbau mit einer erheblich vergrößerten viralen 3'NTR aufwiesen (Abb. 21). Weiterhin leitete sich aus diesem Experiment ab, dass die funktionelle Integrität der viralen 3'NTR von NCP7 für das Entstehen replizierender Rekombinanten nicht notwendig ist. Aus dieser Beobachtung und der Tatsache, dass eine funktionelle virale 3'NTR für Replikationskompetenz essentiell ist, konnte abgeleitet werden, dass die

4. Diskussion

funktionelle 3'NTR der rekombinanten nzp Genome von +ubi SGT abstammen musste. Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese konnte in entsprechenden Experimenten durch eine Markierung der 3'NTR von +ubi SGT eindeutig nachgewiesen werden, dass die 3'NTR rekombinanter viraler Genome tatsächlich von +ubi SGT erhalten wurde (Abb. 22). Dieses Ergebnis schließt einen doppelten „template switch“ nach Initiation der viralen Minusstrangsynthese an der 3'NTR des replizierenden Genoms von NCP7 zu +ubi SGT und zurück zu dem Genom von NCP7 mit größter Wahrscheinlichkeit aus.

Replikative RNA-Rekombination zwischen diesen beiden Partnern war daher nur noch nach einer von einem funktionellen Replikationskomplex an der 3'NTR des 3'-Rekombinationspartners (+ubi SGT) initiierten Minusstrangsynthese mit anschließendem „template switch“ zum 5'-Partner (NCP7) möglich. In einer vergleichbaren Studie bei Sindbis-Virus wurden ähnliche Schlussfolgerungen gezogen (Raju et al., 1995). Dass die dort beobachteten Rekombinationsereignisse nach Transfektion von Plusstrang-RNA-Molekülen auch auf nicht replikative RNA-Rekombination zurückzuführen sein könnten, wurde allerdings nicht in Betracht gezogen (Raju et al., 1995). Um dieser Fragestellung nachzugehen und um die Bedeutung der Anwesenheit einer funktionellen RdRp für RNA-Rekombination im etablierten *in vivo*-System für BVDV zu überprüfen, wurden zunächst verschiedene letale Mutationen in das RdRp-Gen des 5'-Rekombinationspartners NCP7-5A eingeführt (Abb. 23). Nach Kotransfektion dieser Konstrukte mit +ubi SGT in n.i. Zellen konnte in allen Fällen das Entstehen von zp und nzp Rekombinanten beobachtet werden. Da die virale RdRp des ersten Rekombinationspartners (NCP7-GAA, NCP7- Δ NaeI/SmaI oder NCP7- Δ Clal/Clal) jeweils letal mutiert war und dem zweiten Rekombinationspartner +ubi SGT ein translationsvermittelndes IRES-Element fehlte (Abb. 9), scheint für die beobachteten Rekombinationsereignisse die Anwesenheit einer funktionellen

4. Diskussion

viralen RdRp nicht essentiell gewesen zu sein. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine minimale Translation von +ubi SGT zur Synthese einer funktionellen viralen RdRp geführt hat, was replikative RNA-Rekombination ermöglicht haben könnte. Bislang lieferten eine *in vivo*- und zwei *in vitro*-Studien Hinweise auf das Vorliegen eines nicht replikativen Mechanismus für RNA-Rekombination. Allerdings konnte in diesen Studien entweder durch das Vorliegen einer aktiven Polymerase oder eines intakten Polymerasegens ein RdRp-abhängiger, replikativer Mechanismus nicht sicher ausgeschlossen werden (Chetverin et al., 1997, Chetverina et al., 1999, Gmyl et al., 1999). Entsprechend gab es bislang keinen endgültigen Beweis für die Existenz eines von der viralen Replikation unabhängigen Mechanismus der RNA-Rekombination. Dies führte in den vergangenen Jahren zu kontroversen Diskussionen über grundlegende Aspekte der RNA-Rekombination.

Um abschließend aufzuklären, ob die Anwesenheit eines vollständigen RdRp-Gens für die in unserem System beobachtete Rekombination notwendig ist, wurden verschiedene Paare von replikationsinkompetenten RNAs, denen jeweils essentielle Anteile des viralen Polymerasegens fehlten, in nicht infizierte Zellen kotransfiziert (Abb. 24). Bemerkenswerterweise belegte das Entstehen von rekombinanten Viren in diesen Experimenten (Tab. 6), dass RNA-Rekombination vor der Translation einer aktiven viralen Polymerase stattgefunden haben musste. Um auszuschließen, dass andere Phänomene als RNA-Rekombination zur Entstehung von rekombinanten Genomen führen, wurden zuvor umfassende Kontrollen durchgeführt, die die Einführung genetischer Marker in die verwendeten RNAs, einen DNaseI-Verdau der synthetischen Transkripte und eine anschließende Phenol/Chloroformreinigung mit Ethanol-fällung vor der Transfektion beinhalteten. Durch letztere Schritte wurden Reaktionen auf DNA-Ebene ausgeschlossen und die zur synthetischen Transkription verwendeten DNA-abhängigen RNA-Polymerasen

4. Diskussion

entfernt (siehe 2.2). Zusammengefasst belegen diese Kontrollen, dass die nachgewiesenen Rekombinationsereignisse nicht auf Kontaminationen oder Artefakte zurückzuführen waren, sondern auf RNA-Ebene in Zellkultur stattgefunden haben.

Unsere Studien belegten weiterhin, dass eine End- zu Endligation der transfizierten RNAs für die von der viralen Replikation unabhängige RNA-Rekombination offensichtlich keine Rolle gespielt hat (3.2.9). Aus der Analyse der Rekombinationsorte ergab sich vielmehr, dass die Rekombination der eingesetzten RNAs immer zwischen internen Nukleotiden stattfand (Abb. 26). Dies steht im Gegensatz zur Analyse der aus einer Transfektion von +ubi SGT in mit NCP7 infizierte Zellen hervorgegangenen 46 Rekombinanten, bei denen in 13 von 46 Fällen der 5'-Rekombinationspartner vollständig integriert wurde (Abb. 13 und 14). Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass bei diesen sich unterscheidenden experimentellen Ansätzen unterschiedliche Mechanismen für RNA-Rekombination verantwortlich waren. Für Studien, die mit NCP7-infizierten Zellen durchgeführt wurden, ist es durch das Vorhandensein einer replizierenden viralen RNA als einem der Rekombinationspartner allerdings nicht möglich, zwischen replikativer und nicht replikativer RNA-Rekombination zu unterscheiden. Von einer homologen Rekombination abgesehen führten die in 3.2.9 beschriebenen nicht homologen Rekombinationen zur Generierung einer genomischen Deletion bzw. Duplikationen von bis zu 135 Nukleotiden (Abb. 26). Interessanterweise liegen die Mutationen der Rekombinanten R2-R12 in dem hochkonservierten Sequenzabschnitt des Polymerasegens, der für die Handflächenregion der pestiviralen RdRp kodiert, die das aktive Zentrum des Enzyms beinhaltet (Choi et al., 2004). Im Hinblick auf die hohe Konservierung des Polymerasegens bei Pestiviren ist die Entstehung rekombinanter RdRps, die in der Lage sind, die virale Replikation zu unterhalten, sehr bemerkenswert. Weiterführende Studien werden

4. Diskussion

sich mit der räumlichen Struktur und der Syntheseleistung dieser Polymerasen sowie dem möglichen Grad der Attenuierung der rekombinanten BVD-Viren, die diese mutierten RdRp-Gene exprimieren, befassen.

Entgegen der in der RNA-Rekombinationsforschung mehrheitlich vertretenen Meinung beweisen die vorliegenden Ergebnisse die Existenz eines von der viralen Replikation unabhängigen Mechanismus für RNA-Rekombination *in vivo*. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass nahezu gleichzeitig und unabhängig von der hier vorliegenden Arbeit die Generierung replizierender Poliovirusgenome durch Rekombination zwischen Poliovirus-Genomfragmenten, denen ebenfalls jeweils essentielle 5' oder 3'-terminale Anteile des RdRp-Gens fehlten, beschrieben wurde (Gmyl et al., 2003). Diese Studie und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine von der viralen Replikation unabhängige RNA-Rekombination nicht auf ein bestimmtes Virussystem beschränkt ist, sondern höchstwahrscheinlich einen weitverbreiteten Mechanismus darstellt.

Die von der viralen Replikation unabhängige RNA-Rekombination könnte auf nicht replikative Reaktionen zurückzuführen sein. Die Analyse der Rekombinanten R1 bis R12 ergab, dass die Rekombinationsstellen einzigartig sind und daher wahrscheinlich nicht auf sequenzspezifische Reaktionen zurückzuführen sind. Dies steht im Gegensatz zu nicht replikativen, zellulären (*trans*)-Splicingreaktionen, die sequenzspezifisch sind (Abelson et al., 1998, Bruzik & Maniatis, 1992, Doudna & Cech, 2002, Eul et al., 1995, Singh, 2002). Alternativ zu (*trans*)-Splicingreaktionen wäre nicht replikative RNA-Rekombination auch durch eine aus einer intrinsischen, kryptischen RNase-Aktivität resultierende Selbstspaltung (Chetverin et al., 1997, Gmyl et al., 1999) oder eine RNA-Spaltung durch zelluläre Ribonukleasen erklärbar („breakage“). Allerdings müsste sich zur Generierung eines rekombinanten RNA-Moleküls an beide Prozesse noch eine Ligationsreaktion anschließen („ligation“). Darüber hinaus könnten andere, bis jetzt noch unbekannt

4. Diskussion

nicht replikative Mechanismen zu den hier beschriebenen RNA-Rekombinationsereignissen geführt haben.

Obwohl es naheliegt, die von der pestiviralen RdRp unabhängige RNA-Rekombination nicht replikativen Prozessen zuzuordnen, schließt die Abwesenheit einer viralen RdRp eine Beteiligung zellulärer Polymerasen und damit einen replikativen Rekombinationsprozess nicht aus. Einige zelluläre Polymerasen, die eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulation spielen, sind in der Lage, RNA von einzelsträngigen RNA-Matrizen zu synthetisieren (Ahlquist, 2002, Nishikura, 2001, Schiebel et al., 1998, Sijen et al., 2001). Allerdings sind solche RNA-abhängigen RNA-Polymerasen bislang nicht in Säugerzellen entdeckt worden. Auch wurde nicht berichtet, dass sie RNAs von der Größe eines pestiviralen Genoms synthetisieren könnten. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass diese zellulären Enzyme an den hier beschriebenen RNA-Rekombinationsprozessen beteiligt sind. Mehrere Studien legen aber nahe, dass zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerasen wie die RNA-Polymerase II die RNA-Genome von Hepatitis-Delta-Virus und von Pflanzenviroiden replizieren können (Chang & Taylor, 2002, Diener, 1991, Fu & Taylor, 1993, Rackwitz et al., 1981). Entsprechende, für eine solche Replikation notwendige promotorähnliche Elemente wurden jedoch bislang in pestiviralen Genomen nicht entdeckt. Es bleibt allerdings erwähnenswert, dass die Analyse der rekombinanten Sequenzen von R1 bis R12, die durch von pestiviraler Replikation unabhängige Rekombination entstanden sind, das Vorliegen einer homologen Rekombination (R1) aufzeigte. Desweiteren konnten bei 7 von 11 der aus nicht homologer Rekombination hervorgegangenen Rekombinationsstellen ein bis fünf Nukleotide den parentalen Sequenzen nicht zweifelsfrei zugeordnet werden (Abb. 25 B, z.B. R2). Ähnlich zu den in Abb. 13 gezeigten Rekombinationsregionen unterstützt dies die Annahme, dass die Auswahl der Rekombinationsstelle im Rahmen eines replikativen

4. Diskussion

Prozesses durch Basenpaarung zwischen einem entstehenden RNA-Strang („nascent“-RNA) und der Akzeptor-RNA beeinflusst worden ist. Ein replikativer, durch zelluläre Polymerasen vermittelter Mechanismus der RNA-Rekombination kann also durchaus in Betracht gezogen werden. Es bleibt aber zunächst unklar, ob die beobachtete, von der pestiviralen Replikation unabhängige RNA-Rekombination auf replikative oder nicht replikative Prozesse zurückzuführen ist. Die Untersuchung der an diesem Mechanismus der RNA-Rekombination beteiligten Faktoren jedenfalls erschließt ein gänzlich neues Forschungsfeld.

Die Rekombination zwischen viralen Genomen trägt wesentlich zur genetischen Variabilität von Viren bei und stellt auch einen Mechanismus für die Reparatur viraler Genome dar. Beide Aspekte der RNA-Rekombination wurden für eine große Anzahl von Viren beschrieben (Agol, 1997, Lai, 1992, Nagy & Simon, 1997, Strauss & Strauss, 1988, Worobey & Holmes, 1999) und konnten in dieser Studie auch für Pestiviren experimentell bestätigt werden. Darüber hinaus wurde von Rekombination zwischen viralen und zellulären RNAs berichtet (Charini et al., 1994, Khatchikian et al., 1989, Meyers et al., 1989b, Monroe & Schlesinger, 1983, Munishkin et al., 1988, Tsiang et al., 1985). Die molekulare Analyse von zp Pestiviren zeigte, dass die Integration von Ubiquitin- und anderen zellulären, proteinkodierenden Sequenzen zu einem zusätzlichen Prozessierungsschritt im viralen Polyprotein, zur Zelllyse und Induktion einer tödlichen Erkrankung beim Rind, der „Mucosal Disease“, führt (Baroth et al., 2000, Becher et al., 2001b, Becher et al., 2002, Meyers et al., 1996a, Meyers et al., 1998). Dieses natürliche Selektionssystem, das die Identifizierung und Analyse einer großen Anzahl von rekombinanten Pestiviren mit zp Biotyp erlaubte, wird von dem hier beschriebenen Rekombinationssystem nachgeahmt.

Unsere Entdeckung, dass RNA-Rekombination *in vivo* unabhängig von der viralen Replikation auftritt, spricht sehr dafür, dass nicht nur virale RNAs untereinander

4. Diskussion

und mit zellulären RNAs, sondern auch zelluläre RNAs miteinander rekombinieren könnten. Solche Rekombinationsereignisse könnten nicht nur an der Bildung biologisch aktiver Moleküle beteiligt sein, sondern in einer hypothetischen RNA-Welt eine bedeutende Rolle in der Evolution gespielt haben.

4.3 Gezielte Anwendung des Rekombinationssystems:

Erzeugung und Charakterisierung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV

Die Existenz von zwei Biotypen, nämlich zp und nzp Viren, stellt eine bemerkenswerte Eigenschaft von Pestiviren dar. Die biologische Bedeutung und molekularen Aspekte der Zytotoxizität wurden für BVDV intensiv erforscht und eine große Anzahl von zp BVDV-Stämmen charakterisiert. Im Gegensatz zu BVDV wurden zp KSPV-Stämme nur relativ selten identifiziert (de Castro, 1973, Gillespie et al., 1960b, Laude, 1978, van Bekkum & Barteling, 1970). Interessanterweise bestehen alle bisher analysierten zp KSPV Feldisolate aus einem nzp KSPV-Stamm und einem viralen Subgenom. Mit Ausnahme des Subgenoms cp BW1, dem 4746 Nukleotide fehlen (Kosmidou et al., 1998), zeichnen sich alle anderen zp KSPV-Isolate durch eine interne Deletion von 4764 Nukleotiden aus, die in einer Fusion des Translationsinitiationskodons zum ersten Kodon des NS3-Gens resultiert (Abb. 7 A, unten, Meyers & Thiel, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion dieser KSPV-Subgenome die genetische Basis für die Expression großer Mengen von NS3 darstellt (Meyers et al., 1996c) und mit erhöhten viralen RNA-Leveln sowie einem zp Biotyp korreliert. Allerdings ist die Ursache der sich in einem ZPE manifestierenden Apoptose von mit zp Pestiviren infizierten Zellen noch nicht abschließend geklärt. Es liegen in der Literatur Hinweise vor, dass in der infizierten Zelle weder der hohe NS3-Level noch große Mengen an pestiviraler RNA direkt für die Apoptoseinduktion verantwortlich sind (Qu et al., 2001). Die bislang beschriebenen zp KSPV Subgenome sind defekte, interferierende Partikel, deren Verpackung von den Strukturproteinen eines nzp Helfervirus abhängt (Meyers et al., 1996c). Solche zp KSPV-Stämme wurden nicht nur aus Haus- und Wildschwein, sondern auch aus Gewebekulturzellen isoliert, in

4. Diskussion

denen nzp KSPV passagiert wurde (Aoki et al., 2001, Meyers & Thiel, 1995, Mittelholzer et al., 1997).

Als praktische Anwendung des etablierten RNA-Rekombinationssystems, das eine effiziente Generierung rekombinanter BVD-Viren erlaubt, sollte untersucht werden, ob das Entstehen eines von einem Helfervirus unabhängigen, zp KSPV durch RNA-Rekombination grundsätzlich möglich ist. Durch eine erfolgreiche Adaptation des Rekombinationssystems an KSPV (Abb. 27) konnte der KSPV-Stamm CP G1 generiert werden. Er stellt das erste beschriebene, von einem Helfervirus unabhängige zp KSPV dar, das durch RNA-Rekombination entstanden ist. CP G1 beinhaltet eine große Duplikation viraler Sequenzen zusammen mit der Insertion zellulärer, Ubiquitin-kodierender Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen (Abb. 28). CP G1 ist in der Lage, einen ZPE auf verschiedenen Zelllinien porzinen und bovinen Ursprungs zu induzieren (Abb. 29).

Bislang berichteten zwei Studien von Helfervirus-unabhängigen zp KSP-Viren. In der ersten Studie wurde nach Einführung von Mutationen in den nzp KSPV-Stamm C, nämlich einem Austausch der Histidine 297 oder 346 zu Lysin, ein ZPE in infizierten SK6-Zellen beobachtet (Hulst et al., 1998). Die besagten Aminosäuren sind Teil des katalytischen Zentrums der viralen Ribonuklease E^{ms}. In dieser Studie wurde allerdings die Anwesenheit von zp viralen Subgenomen experimentell nicht ausgeschlossen. Darüber hinaus resultierte eine Einführung derselben Mutationen in das Genom eines anderen KSPV-Stamms (Alfort-Tübingen) in einem Virus, das nicht in der Lage war, einen ZPE auf PK15-Zellen zu verursachen (Meyers et al., 1999). Es bleibt daher unklar, ob der bei Hulst et al. beschriebene ZPE wirklich durch die beschriebenen, über reverse Genetik eingeführten Mutationen verursacht wurde. In der zweiten Studie wurden bestimmte KSPV-Stämme beschrieben, die in Zellkultur im Gegensatz zu Wildtypstämmen nach einer Überinfektion mit „Newcastle Disease“-Virus (NDV) die virale Replikation von NDV nicht positiv

4. Diskussion

beeinflussen („exaltation of Newcastle disease virus negative“; END-). Diese (END-)-KSPV-Stämme induzieren einen auf bestimmte porcine Zellkulturlinien wie FS-L3 oder CPK-NS beschränkten ZPE, der mit der Expression von hohen Mengen an NS3 korreliert (Aoki et al., 2004, Sakoda et al., 1998). Allerdings führten Infektionen mit diesen (END-)-Stämmen im Gegensatz zu CP G1 (Abb. 29) nicht zur Ausbildung von für zp Pestivirusstämme typischen Plaques (Aoki et al., 2004).

Unter natürlichen Bedingungen entstehen rekombinante pestivirale Genome mit zellulären Insertionen durch mindestens zwei spezifische Rekombinationsereignisse (Abb. 8). Dies bietet einen Erklärungsansatz, warum das Auftreten von zp Pestivirusgenomen mit integrierten Wirtszellsequenzen ein relativ seltenes Ereignis darstellt. Von der Entstehung solcher Pestiviren während der Zellkulturpassage von nzp Stämmen wurde noch nie berichtet. Im Gegensatz dazu erleichterte die Transfektion von +ubi-Alfort in mit nzp KSPV Alfort-p447 infizierte Zellen die Entstehung von CP G1, da nur noch ein Rekombinationsschritt notwendig war. Im Vergleich mit klassischen Systemen, die auf reverser Genetik und infektiösen cDNA-Klonen beruhen, besteht ein großer Vorteil des hier beschriebenen RNA-Rekombinationssystems darin, in einem Arbeitsschritt eine große Anzahl rekombinanter viraler RNAs zu erzeugen und diese gleichzeitig auf Replikationskompetenz und einen erwünschten phänotypischen Marker, hier virale Zytotoxizität, zu selektieren. Der experimentelle Ansatz der *in vivo* RNA-Rekombination resultierte in der beschriebenen Anwendung in der erfolgreichen Herstellung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV. Das RNA-Rekombinationssystem wird aber darüber hinaus in zukünftigen Studien auch ein wertvolles Werkzeug für die Erzeugung anderer rekombinanter Pestiviren sowie für weiterführende Studien über Replikation und RNA-Rekombination bei Pestiviren darstellen.

4. Diskussion

Für das nahe verwandte BVDV wurden relativ häufig zp Feldisolate gefunden, die duplizierte virale Sequenzen zusammen mit der Insertion zellulärer mRNA-Sequenzen beinhalten und somit CP G1 in der Genomorganisation ähneln (z. B. Baroth et al., 2000, Becher et al., 2001b, Becher et al., 2002, Greiser-Wilke et al., 1993, Meyers et al., 1998, Meyers et al., 1991, Qi et al., 1992). Im Gegensatz dazu waren entsprechende KSPV-Stämme, die Duplikationen viraler und eine Insertion zellulärer Sequenzen tragen, bislang nicht bekannt. Dieser interessante Unterschied könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass ein mit dem Auftreten von zp Pestivirusstämmen korrelierendes Krankheitssyndrom nur bei mit BVDV infizierten Rindern existiert (Abb. 6). Die schwere klinische Manifestation dieser Erkrankung (MD) führte in der Vergangenheit zu einer selektiven Isolierung und Charakterisierung einer viel größeren Anzahl von zp BVDV-Stämmen als das bei KSPV der Fall war. Bei Schweinen führt schon die persistente Infektion mit nzp KSPV gewöhnlich innerhalb weniger Wochen zum Tod.

Gewebekulturpassagen von CP G1 resultierten relativ schnell in der Entstehung von Mutanten, die verschiedene genomische Deletionen aufwiesen (Abb. 31 - Abb. 33). Vom Auftreten solcher Prozesse während der Zellkulturpassagierung von zp BVDV-Feldisolaten, die duplizierte virale Sequenzen zusammen mit der Insertion zellulärer mRNA-Sequenzen beinhalten, wurde bislang nicht berichtet. Lediglich bei entsprechenden zp BVDV-Stämme, die über reverse Genetik erzeugt wurden und deren duplizierte virale Sequenzen von heterologem Ursprung waren, wurde während Zellkulturpassagierung das Auftreten von genomischen Deletionen beobachtet. Dies führte zum Entstehen von nzp Viren und in einigen Fällen auch von Subgenomen (Baroth et al., 2000, Becher et al., 2001b). Im Gegensatz dazu entstand während der Zellkulturpassagierung von CP G1 kein nzp Virus. Stattdessen zeigten „Northern Blot“- und Sequenzanalysen, dass RNA-Rekombination zum Entstehen des verkürzten Genoms CP G2 führte, das CP G1

4. Diskussion

nach 10 Zellkulturpassagen vollständig verdrängte. Für Subgenome von Tombusvirus, einem Pflanzen-RNA-Virus, wurde postuliert, dass Genome, die für die virale Replikation entbehrliche Sequenzen enthalten, Nachteile gegenüber Genomen ohne solche Sequenzen haben (White & Morris, 1994). Entsprechend erscheint eine Selektion des erheblich vergrößerten Genoms von CP G1 zu kürzeren und damit vermutlich besser replizierenden Genomen wie CP G2 und /oder den Subgenomen 1-12 durch schrittweise stattfindende Deletionsprozesse wahrscheinlich. Zwischen erhöhten Mengen an freiem NS3 und der genomischen Replikationseffizienz von Pestiviren besteht eine Korrelation (Lackner et al., 2004). Daher könnte das Verbleiben von Sequenzen direkt vor dem NS3-Gen, die mindestens ein vollständiges Ubiquitinmonomer kodieren, einen zusätzlichen Replikationsvorteil für alle während der Passagierung von CP G1 entstandenen KSPV-Genome darstellen.

Die beschriebenen Analysen legen nahe, dass CP G1-ähnliche KSPV-Stämme auch im Tier entstehen könnten. Das Fehlen eines biologischen Selektionssystems wie MD erschwert jedoch die Entdeckung von zp KSPV-Feldisolaten erheblich. Darüber hinaus könnte bei vergrößerten Genomen wie CP G1 eine funktionelle Selektion zu kürzeren und besser replizierenden Genomen relativ schnell zum Auftreten von genomischen Deletionen führen. Es wird daher von Interesse sein zu untersuchen, ob das Auftreten von genomischen Deletionen, die während der Passagierung von CP G1 in Zellkultur auftraten, durch die Analyse von Proben aus mit CP G1 infizierten Tieren bestätigt werden kann. Zukünftige Studien werden zeigen, ob ein genetisch stabiles, von einem Helfervirus unabhängiges zp KSPV erhalten werden kann. Wie für CP G1 bereits gezeigt (3.3.6), würde sich ein solches Virus für eine erheblich vereinfachte Durchführung von Serumneutralisationstests bei der Diagnostik von Infektionen mit KSPV anbieten. Da vorhergehende Untersuchungen zur Virulenz von Helfervirus abhängigen zp

4. Diskussion

KSPV-Subgenomen zu widersprüchlichen Ergebnissen führten (Aoki et al., 2003, Kosmidou et al., 1998), erscheint es weiterhin sinnvoll, auch die Virulenz von Helfervirus unabhängigem zp KSPV zu bestimmen.

Das in dieser Arbeit etablierte RNA-Rekombinationssystem erlaubte die gezielte Herstellung eines bislang unbekanntes, von einem Helfervirus unabhängigen zp KSPV-Stamms. Allgemeiner betrachtet stellt dieses System eine effiziente Alternative zur klassischen Anwendung von reversen genetischen Systemen dar und ist damit ein nützliches Werkzeug für verschiedene Anwendungen. Auch für Sindbis- und Poliovirus wurden Systeme beschrieben, die die Generierung infektiöser Virionen durch Rekombination zwischen zwei synthetischen, replikationsinkompetenten RNA-Molekülen erlauben (Gmyl et al., 1999, Raju et al., 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente demonstrieren die Anwendbarkeit solcher RNA-Rekombinationssysteme für das Design von Plusstrang-RNA-Viren von erwünschtem Phänotyp.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das erste Zellkultursystem für die pestivirale RNA-Rekombination etabliert werden. Es stellt im Vergleich zur alleinigen Sequenzanalyse natürlich entstandener rekombinanter Pestivirusgenome einen erheblichen Fortschritt dar. Das System erlaubt nach Transfektion eines nicht replikationskompetenten Transkripts in mit nichtzytopathogenem (nzp) Virus infizierte Zellen und auch nach Kotransfektion von zwei synthetischen RNAs in nicht infizierte Zellen die effiziente Generierung rekombinanter Pestiviren.

Dieser Versuchsansatz ahmt in Zellkultur die Entstehung von zytopathogenen (zp) Genomen des Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) im Tier nach. Er erlaubte es, bereits zuvor aufgestellte Arbeitshypothesen wie die Abhängigkeit der RNA-Rekombinationsfrequenz von der zur Verfügung stehenden Menge eines Rekombinationspartners zu bestätigen. Ausserdem zeigte die Analyse von 46 „crossover“-Regionen, die jeweils durch Rekombination zwischen demselben Paar von parentalen RNAs entstanden waren, eine mögliche Beteiligung von Basenpaarung an einem hypothetischen, replikativen Rekombinationsprozess. Dabei konnte unter anderem das bislang größte pestivirale Genom identifiziert werden, dessen Länge die eines nzp Virus um fast 60 % übertrifft.

Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der RNA-Rekombination deuteten darauf hin, dass zumindest in diesem System RNA-Rekombination hauptsächlich in den ersten Stunden nach der Transfektion synthetischer RNAs stattfand. Desweiteren scheint replikative RNA-Rekombination von Pestiviren nicht (oder nur sehr eingeschränkt) während der viralen Plusstrangsynthese stattzufinden. Es konnte auch gezeigt werden, dass der pestivirale Replikationskomplex die Plusstrangsynthese am 3'-Ende eines (synthetischen) Minusstrangs *in trans* nicht initiieren kann.

5. Zusammenfassung

Die Möglichkeit zur gezielten Beeinflussung beider Rekombinationspartner erlaubte Studien, welche die Unabhängigkeit der RNA-Rekombination von der autonomen Replikationskompetenz beider Rekombinationspartner beweisen. Dabei konnten einzigartige rekombinante npz BVD-Viren isoliert werden. Über die Bestimmung der Herkunft der 3'NTR rekombinanter viraler Genome wurde für das Rekombinationssystem ein doppelter „template switch“ zwischen den eingesetzten Rekombinationspartnern während der viralen Minusstrangsynthese ausgeschlossen. Als wichtigstes Ergebnis belegen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche, dass in der Zelle ein bislang nicht näher charakterisierter Mechanismus für die Rekombination von RNAs existiert, der von der Anwesenheit einer viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) unabhängig ist. Eine End- zu Endligation der beteiligten Rekombinationspartner scheint dabei keine Rolle zu spielen. Die weitreichende Bedeutung dieses Phänomens für die Evolution und Zellbiologie ist noch nicht abzusehen.

Das Rekombinationssystem wurde zur Klärung der Frage eingesetzt, ob die Entstehung eines von einem Helfervirus unabhängigen zp Genoms des Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) durch RNA-Rekombination möglich ist. Ein solches KSPV war bislang weder aus infizierten Tieren noch aus Zellkulturpassagen eines npz Virus isoliert worden. Durch erfolgreiche Adaptation des Rekombinationssystems an KSPV konnte das von einem Helfervirus unabhängige zp KSPV (CP G1) erzeugt werden. Exemplarisch wurde für CP G1 gezeigt, dass Helfervirus-unabhängige zp Stämme für eine vereinfachte Durchführung von Serumneutralisationstests in der KSPV-Diagnostik geeignet erscheinen. Zusammengefasst zeigt diese praktische Anwendung, dass das vorliegende Rekombinationssystem als Alternative zum klassischen Mutationsweg über reverse Genetik ein flexibel einsetzbares Werkzeug darstellt. Dieses System kann u.a. zur Generierung rekombinanter (Pesti)-Viren von erwünschtem Phänotyp

5. Zusammenfassung

(z.B. von ϕ Genomen) sowie zur gezielten Mutation definierter Bereiche eines viralen Genoms (z.B. von RdRp-Mutanten) eingesetzt werden.

6. Summary

In this study the first cell culture system for RNA recombination of pestiviruses was established. It represents a considerable progress when compared to sequence analyses of naturally emerged recombinant pestiviral isolates only. This system allowed the efficient generation and subsequent characterization of recombinant pestiviral genomes after transfection of a synthetic and replication incompetent RNA into cells infected with a noncytopathogenic (noncp) virus. In addition, recombination was also observed when two synthetic transcripts were transfected into noninfected cells.

This cell culture system mimics the emergence of cytopathogenic (cp) *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV) genomes within the infected animal and dependably allowed to prove hypotheses concerning RNA recombination. These findings included the correlation of RNA recombination frequency with the amount of one recombination partner. Moreover, analyses of fourtysix crossover sites each originating from recombination between the same pair of parental RNAs suggested that basepairing might have facilitated replicative template switching. Upon these analyses, the largest pestiviral genome ever described was identified which genome length exceeds that of a noncp pestivirus by almost sixty percent.

Subsequent investigations concerning the mechanism of RNA recombination suggest that, at least in this system, recombination seems to take place mainly within the first hours after the transfection of synthetic RNAs. Moreover, replicative RNA recombination of pestiviruses seems not to (or only restrictedly) occur during viral plus strand synthesis. These studies also revealed that the pestiviral replication complex is not able to initiate synthesis of plus strands at a (synthetic) pestiviral minus strand *in trans*.

6. Summary

Being given the possibility to selectively manipulate both recombination partners, additional experiments were performed that demonstrated the occurrence of RNA recombination between two replication incompetent transcripts. Thereby, unique recombinant noncp BVDV genomes could be isolated. Furthermore, by determining the origin of the viral 3'NTR of emerged recombinant genomes, for this system a double template switch during viral minus strand synthesis could be excluded. Most importantly, our studies showed that a unique, so far uncharacterized mechanism of RNA recombination exists *in vivo* that is independent from the presence of a functional viral RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp). Here, an end to end ligation of RNA molecules that participate in recombination was obviously not involved. The relevance of this phenomenon for evolution and its impact on cell biology are yet to be determined.

Finally, the recombination system was used to elucidate the question, whether - although never being isolated from infected animals or cell culture passages of a noncp virus - a helper virus independent cp *Classical swine fever virus* (CSFV) can be generated by RNA recombination. By successful adaptation of the recombination system to CSFV the unique helper virus independent cp CSFV strain CP G1 was generated. As it was exemplarily demonstrated for CP G1, helper virus independent cp strains could facilitate accomplishment of serum neutralization assays for diagnosis of Classical swine fever. Taken together, this practical application demonstrates that, as an alternative to classical reverse genetics, the established recombination system represents a powerful und versatile tool. It is appropriate not only for generation of recombinant (pesti)viruses exhibiting a desired phenotype (e.g., cp genomes), but also for targeted mutation of defined regions of a viral genome (e.g., RdRp-mutants).

7. Literaturverzeichnis

- Abelson, J., Trotta, C. R. & Li, H.** (1998). tRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 273, 12685-12688.
- Agol, V. I.** (1997). Recombination and other genomic rearrangements in picornaviruses. *Semin. Virol.* 8, 77-84.
- Ahlquist, P.** (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296, 1270-1273.
- Aoki, H., Ishikawa, K., Sakoda, Y., Sekiguchi, H., Kodama, M., Suzuki, S. & Fukusho, A.** (2001). Characterization of classical swine fever virus associated with defective interfering particles containing a cytopathogenic subgenomic RNA isolated from wild boar. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 751-758.
- Aoki, H., Ishikawa, K., Sekiguchi, H., Suzuki, S. & Fukusho, A.** (2003). Pathogenicity and kinetics of virus propagation in swine infected with the cytopathogenic classical swine fever virus containing defective interfering particles. *Arch. Virol.* 148, 297-310.
- Aoki, H., Sakoda, Y., Nakamura, S., Suzuki, S. & Fukusho, A.** (2004). Cytopathogenicity of classical swine fever viruses that do not show the exaltation of Newcastle disease virus is associated with accumulation of NS3 in serum-free cultured cell lines. *J Vet Med Sci.* 66, 161-167.
- Arnold, J. J. & Cameron, C. E.** (1999). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D^{pol}) is sufficient for template switching in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 2706-2716.
- Avalos-Ramirez, R.** (2002). Phylogenetische Analysen und antigenetische Verwandtschaft von Pestiviren. Dissertation.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J. & Becher, P.** (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456-465.
- Baker, J. C.** (1987). Bovine viral diarrhea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 1449-1458.

7. Literaturverzeichnis

- Baroth, M.,** Orlich, M., Thiel, H.-J. & Becher, P. (2000). Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology* 278, 456-466.
- Becher, P.,** Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo-Rosales, S., König, M., Schweitzer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H., Thiel, H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel Pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.
- Becher, P.,** König, M. & Thiel, H.-J. (2001a). Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung. *Tierärztl. Praxis* 29 (G), 266-275.
- Becher, P.,** Meyers, G., Shannon, A. D. & Thiel, H.-J. (1996). Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.* 70, 2992-2998.
- Becher, P.,** Orlich, M., König, M. & Thiel, H.-J. (1999a). Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.* 73, 5646-5653.
- Becher, P.,** Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. & Thiel, H.-J. (1999b). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262, 64-71.
- Becher, P.,** Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., König, M. & Thiel, H.-J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78, 1357-1366.
- Becher, P.,** Orlich, M. & Thiel, H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.* 72, 5165-5173.
- Becher, P.,** Orlich, M. & Thiel, H.-J. (2000). Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus result in altered growth characteristics. *J. Virol.* 74, 7884-7894.
- Becher, P.,** Orlich, M. & Thiel, H.-J. (2001b). RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* 75, 6256-6264.

7. Literaturverzeichnis

- Becher, P.,** Shannon, A.D., Tautz, N., Thiel, H.-J. (1994). Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology* 198, 542-551.
- Becher, P. & Thiel, H.-J.** (2002). Genus *Pestivirus* (*Flaviviridae*). In *The Springer Index of Viruses*, pp. 327-331. Edited by C. A. Tidona & G. Darai. Heidelberg, Germany: Springer -Verlag.
- Becher, P.,** Thiel, H.-J., Collins, M., Brownlie, J. & Orlich, M. (2002). Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein and golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. *J. Virol.* 76, 13069-13076.
- Bolin, S. R.,** McClurkin, A. W., Cutlip, R. C. & Coria, M. F. (1985). Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Am.J.Vet.Res.* 46, 573-576.
- Brownlie, J. & Clarke, M. C.** (1993). Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis. *Intervirology* 35, 51-59.
- Brownlie, J.,** Clarke, M. C. & Howard, C. J. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet.Rec.* 114, 535-536.
- Bruzik, J. P. & Maniatis, T.** (1992). Spliced leader RNAs from lower eukaryotes are trans-spliced in mammalian cells. *Nature* 360, 692-695.
- Bujarski, J. J. & Kaesberg, P.** (1986). Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature* 321, 528-531.
- Casaro, A. P. E.,** Kendrick, J. W. & Kennedy, P. C. (1971). Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 32, 1543-1562.
- Cascone, P. J.,** Haydar, T. F. & Simon, A. E. (1993). Sequences and structures required for recombination between virus-associated RNAs. *Science* 260, 801-805.
- Chang, J. & Taylor, J.** (2002). In vivo RNA-directed transcription, with template switching, by a mammalian RNA polymerase. *EMBO J.* 21, 157-164.

7. Literaturverzeichnis

- Charini, W. A.**, Todd, S., Gutman, G. A. & Semler, B. L. (1994). Transduction of a human RNA sequence by poliovirus. *J. Virol.* 68, 6547-6552.
- Chetverin, A. B.** (1997). Recombination in bacteriophage Q β and its satellite RNAs: the in vivo and in vitro studies. *Semin. Virol.* 8, 121-129.
- Chetverin, A. B.**, Chetverina, H. V., Demidenko, A. A. & Ugarov, V. I. (1997). Nonhomologous RNA recombination in a cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell* 88, 503-513.
- Chetverina, H. V.**, Demidenko, A. A., Ugarov, V. I. & Chetverin, A. B. (1999). Spontaneous rearrangements in RNA sequences. *FEBS Letters* 450, 89-94.
- Choi, K. H.**, Groarke, J. M., Young, D. C., Kuhn, R. J., Smith, J. L., Pevear, D. C. & Rossmann, M. G. (2004). The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4425-4430.
- Collett, M. S.**, Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. & Purchio, A. F. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165, 191-199.
- Cooper, P. D.** (1977). Genetics of picornaviruses. *Comp. Virol.* 9, 133-207.
- Corapi, W. V.**, Donis, R. O. & Dubovi, E. J. (1988). Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea infections. *J. Virol.* 62, 2823-2827.
- Corapi, W. V.**, Donis, R. O. & Dubovi, E. J. (1990a). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1388-1394.
- Corapi, W. V.**, Elliott, R. D., French, T. W. & Dubovi, E. J. (1990b). Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 196, 590-596.
- Coria, M. F.** & McClurkin, A. W. (1978). Specific immunotolerance in an apparently healthy bull persistently infected with BVD virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 449-451.

7. Literaturverzeichnis

- de Castro, M. P.** (1973). *In Vitro* 9, 8-16.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. A.** (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- Desselberger, U., Nakajima, K., Alfino, P., Pedersen, F. S., Haseltine, W. A., Hannoun, C. & Palese, P.** (1978). Biochemical evidence that "new" influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3341-3345.
- Diener, T. O.** (1991). Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. *FASEB J.* 5, 2808-2813.
- Dolja, R. & Carrington, J. C.** (1992). Evolution of positive-strand RNA viruses. *Semin. Virol.* 3, 315-326.
- Doudna, J. S. & Cech, T. R.** (2002). The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* 418, 222-228.
- Duggal, R., Cuconati, A., Gromeier, M. & Wimmer, E.** (1997). Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13786-13791.
- Eul, J., Graessmann, M. & Graessmann, A.** (1995). Experimental evidence for RNA trans-splicing in mammalian cells. *EMBO J.* 14, 3226-3235.
- Figlerowicz, M.** (2000). Role of RNA structure in non-homologous recombination between genomic molecules of brome mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 28, 1714-1723.
- Figlerowicz, M., Nagy, P. D., Tang, N., Kao, C. C. & Bujarski, J. J.** (1998). Mutations in the N terminus of the brome mosaic virus polymerase affect genetic RNA-RNA recombination. *J. Virol.* 72, 9192-9200.
- Floegel-Niesmann, G., Bunzenthall, C., Fischer, S., Moennig, V.** (2003). Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50, 214-220.

7. Literaturverzeichnis

- Fricke, J.,** Gunn, M. & Meyers, G. (2001). A family of closely related bovine viral diarrhea virus recombinants identified in an animal suffering from mucosal disease: new insights into the development of a lethal disease in cattle. *Virology* 291, 77-90.
- Fricke, J.,** Voss, C., Thumm, M., Meyers, G. (2004). Processing of a pestivirus protein by a cellular protease specific for light chain 3 of microtubule-associated proteins. *J. Virol.* 78, 5900-5912.
- Fu, T. B. &** Taylor, J. (1993). The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates. *J. Virol.* 67, 6965-6972.
- Gallei, A.,** Pankraz, A., Thiel, H.-J. & Becher, P. (2004). RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *J. Virol.* 78, 6271-6281.
- Gillespie, J. H.,** Baker, J. A. & McEntee, K. (1960a). A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* 50, 73-79.
- Gillespie, J. H.,** Sheffy, B. E. & Baker, J. A. (1960b). Propagation of hog cholera virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105, 679-681.
- Gmyl, A. P.,** Belousov, E. V., Maslova, S. V., Khitrina, E. V., Chetverin, A. B. & Agol, V. I. (1999). Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.* 73, 8958-8965.
- Gmyl, A. P.,** Korshenko, S. A., Belousov, E. V., Khitrina, E. V. & Agol, V. I. (2003). Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces? *RNA* 9, 1221-123.
- Goff, S. P.** (2001). Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1871-1940. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Greiser-Wilke, I.,** Haas, L., Dittmar, K., Liess, B. & Moennig, V. (1993). RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 of pestivirus strains and isolates in vitro and in vivo. *Virology* 193, 977-980.
- Hahn, C. S.,** Lustig, S., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (1988). Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc Natl Acad Sci* 85, 5997-6001.

7. Literaturverzeichnis

- Heinz, F. X.,** Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M. & Thiel, H.-J. (2000). Family Flaviviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 859-878. Edited by C. M. Fauquet, M.H.V. van Regenmortel, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, and R.B. Wickner. San Diego: Academic Press.
- Herrewegh, A. A.,** Smeenk, I., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. & de Groot, R. J. (1998). Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol.* 5, 4508-4514.
- Howard, C. J.,** Brownlie, J. & Clarke, M. C. (1987). Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.* 19, 13-21.
- Hulst, M. M.,** Panoto, F. E., Hoekman, A., van Gennip, G. P. & Moormann, R. J. M. (1998). Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{ms} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. *J. Virol.* 72, 151-157.
- Jarvis, T. C. & Kirkegaard, K.** (1992). Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.* 11, 3135-3145.
- Kahrs, R. F.** (1973). Effects of bovine viral diarrhoea on the developing fetus. *J. Am. Vet. Ass.* 163, 877-888.
- Keck, J. G.,** Makino, S., L.H., S., Fleming, J. O., Stohlman, S. A. & Lai, M. M. (1987). RNA recombination of coronavirus. *Adv Exp Med Biol.* 218, 99-107.
- Khatchikian, D.,** Orlich, M. & Rott, R. (1989). Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature (London)* 340, 156-157.
- Kim, M. J. & Kao, C.** (2001). Factors regulating template switch in vitro by viral RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4972-4977.
- King, A. M. Q.,** McCahon, D., Slade, W. R. & Newman, J. W. (1982). Recombination in RNA. *Cell.* 29, 921-928.

7. Literaturverzeichnis

- King, A. M. Q.**, Ortlepp, S. A., Newman, J. W. I. & McCahon, D. (1987). Genetic recombination in RNA viruses. In *The Molecular Biology of the positive Stranded RNA Viruses*, pp. 129-152. Edited by D. J. Rowlands, M. A. Mayo & B. W. J. Mahy. London: Academic Press.
- Kirkegaard, K. & Baltimore, D.** (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47, 433-443.
- Kosmidou, A.**, Büttner, M. & Meyers, G. (1998). Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV). *Arch. Virol.* 143, 1295-1309.
- Kuhn, R. J.**, Niesters, H. G., Hong, Z. & Strauss, J. H. (1991). Infectious RNA transcripts from Ross River virus cDNA clones and the construction and characterization of defined chimeras with Sindbis virus. *Viol.* 182, 430-441.
- Kümmerer, B.**, Stoll, D. & Meyers, G. (1998). Bovine viral diarrhea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J. Virol.* 72, 4127-4138.
- Kümmerer, B. & Meyers, G.** (2000) Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J. Virol.* 74, 390-400.
- Lackner, T.**, Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A. E. & Tautz, N. (2004). Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* 78, 10765-10775.
- Lai, M. M. C.** (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 61-79.
- Lai, V. C.**, Kao, C. C., Ferrari, E., Park, J., Uss, A. S., Wright-Minogue, J., Hong, Z. & Lau, J. Y. (1999). Mutational analysis of bovine viral diarrhea virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 73, 10129-10136.
- Lamb, R. A. & Krug, K. M.** (2001). Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1487-1532. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Laude, H.** (1978). Isolation of a cytolytic strain of hog cholera virus from IB-RS2 cells (author's transl./French). *Ann Microbiol (Paris)* 129, 553-561.

7. Literaturverzeichnis

- Ledinko, N.** (1963). Genetic recombination with poliovirus type 1. Studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain. *Virology* 20, 107-119.
- Lee, K. M. & Gillespie, J. H.** (1957). Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 18, 953.
- Lemon, S. M. & Honda, M.** (1997). Internal ribosome entry site within the RNA genomes of hepatitis C virus and other flaviviruses. *Semin. Virol.* 8, 274-288.
- Li, Y. & Ball, L. A.** (1993). Nonhomologous RNA recombination during negative-strand synthesis of flock house virus RNA. *J. Virol.* 67, 3854-3860.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M.** (2001). In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 991-1041. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Makino, S., Keck, J. G., Stohlman, S. A. & Lai, M. M.** (1986). High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J. Virol.* 57, 729-737.
- McClurkin, A. W., Coria, M. F. & Bolin, S. R.** (1985). Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186, 568-569.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M. S. & Rice, C. M.** (1998). Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 72, 4737-4745.
- Meyers, G., Rumenapf, T. & Thiel, H.-J.** (1989a). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171, 555-567.
- Meyers, G., Rumenapf, T. & Thiel, H.-J.** (1989b). Ubiquitin in a togavirus. *Nature* 341, 491.
- Meyers, G., Stoll, D. & Gunn, M.** (1998). Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J. Virol.* 72, 4139-4148.

7. Literaturverzeichnis

- Meyers, G.,** Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. & Kümmerer, B. (1996a). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* 70, 8606-8613.
- Meyers, G.,** Tautz, N., Dubovi, E. J. & Thiel, H.-J. (1991). Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 180, 602-616.
- Meyers, G.,** Tautz, N., Dubovi, E. J. & Thiel, H.-J. (1996b). Origin and diversity of cytopathogenic pestiviruses. In *International symposium of bovine viral diarrhea virus - a 50 year review*.
- Meyers, G. & Thiel, H.-J.** (1995). Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J. Virol.* 69, 3683-3689.
- Meyers, G. & Thiel, H.-J.** (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 47, 53-118.
- Meyers, G.,** Thiel, H.-J. & Rügenapf, T. (1996c). Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. *J. Virol.* 70, 1588-1595.
- Meyers, M.,** Saalmüller, A. & Büttner, M. (1999). Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J. Virol.* 73, 10224-10235.
- Mittelholzer, C.,** Moser, C., Tratschin, J.-D. & Hofmann, M. A. (1997). Generation of cytopathogenic subgenomic RNA of classical swine fever virus in persistently infected porcine cell lines. *Virus Res.* 51, 125-137.
- Monroe, S. S. & Schlesinger, S.** (1983). RNAs from two independently isolated defective interfering particles of Sindbis virus contain a cellular tRNA sequence at their 5' ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3279-3283.
- Moser, C.,** Stettler, P., Tratschin, J.-D. & Hofmann, M. A. (1999). Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J. Virol.* 73, 7787-7794.

7. Literaturverzeichnis

- Munishkin, A. V.,** Voronin, L. A. & Chetverin, A. B. (1988). An in vivo recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Q beta replicase. *Nature* 333, 473-475.
- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J.** (1993). Targeting the site of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus with antisense sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6390-6394.
- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J.** (1995). Efficient system for homologous RNA recombination in brome mosaic virus: Sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. *J. Virol.* 69, 131-140.
- Nagy, P. D. & Bujarski, J. J.** (1997). Engineering of homologous recombination hotspots with AU-rich sequences in Brome Mosaic virus. *J. Virol.* 71, 3799-3810.
- Nagy, P. D.,** Pogany, J. & Simon, A. E. (1999). RNA elements required for RNA recombination function as replication enhancers in vitro and in vivo in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* 18, 5653-5665.
- Nagy, P. D. & Simon, A. E.** (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235, 1-9.
- Nagy, P. D.,** Zhang, C. & Simon, A. E. (1998). Dissecting RNA recombination in vitro: role of RNA sequences and the viral replicase. *EMBO J.* 17, 2392-2403.
- Nettleton, P. F.** (1990). Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 9, 131-150.
- Nettleton, P. F.,** Gilmour, J. S., Herring, J. A. & Sinclair, J. A. (1992). The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 179-188.
- Nishikura, K.** (2001). A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 107, 415-418.
- Pellerin, C.,** Van Den Hurk, J., Lecomte, J. & Tijssen, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.

7. Literaturverzeichnis

- Pestova, T. V.,** Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12, 67-83.
- Pilipenko, E. V.,** Gmyl, A. P. & Agol, V. I. (1995). A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 23, 1870-1875.
- Poole, T. L.,** Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N. D., Siddiqui, A. & Collett, M. S. (1995). Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206, 750-754.
- Potgieter, L. N. D.,** McCracken, M. D., Hopkins, F. M. & Guy, J. S. (1985). Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46, 151-153.
- Pritchard, W. R.** (1963). The bovine viral diarrhea- mucosal disease complex. *Adv. Vet. Sci.* 8, 1-47.
- Qi, F.,** Ridpath, J. F. & Berry, E. S. (1998). Insertion of a bovine *SMT3B* gene in NS4B and duplication of NS3 in a bovine viral diarrhea virus genome correlate with the cytopathogenicity of the virus. *Virus Res.* 57, 1-9.
- Qi, F.,** Ridpath, J.F., Lewis, T., Bolin, S.R., Berry, E.S. (1992). Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. *Virology* 189, 285-292.
- Qu, L.,** McMullan, L.K., Rice, C.M. (2001). Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol* 75, 10651-10662.
- Rackwitz, H. R.,** Rohde, W. & Sanger, H. L. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* 291, 297-301.
- Raju, R.,** Subramaniam, S. V. & Hajjou, M. (1995). Genesis of Sindbis virus by in vivo recombination of nonreplicative precursors. *J. Virol.* 69, 7391-7401.
- Rebhuhn, W. C.,** French, T. W., Perdrietz, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G. & Karcher, L. F. (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 3, 42-46.

7. Literaturverzeichnis

- Ridpath, J. F. & Bolin, S. R.** (1995). The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212, 39-46.
- Ridpath, J. F. & Neill, J. D.** (2000). Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhea viruses. *J. Virol.* 74, 8771-8774.
- Rijnbrand, R.,** van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J. M. & Bredenbeek, P. J. (1997). Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.* 71, 451-457.
- Roehle, P. M. & Edwards, S.** (1994). Comparison of pestivirus multiplication in cells of different species. *Res Vet Sci.* 57, 210-214.
- Romanova, L. I.,** Blinov, V. M., Tolskaya, E. A., Viktorova, E. G., Kolesnikova, M. S., Guseva, E. A. & Agol, V. I. (1986). The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology* 155, 202-213.
- Sakoda, Y.,** Hikawa, M., Tamura, T. & Fukusho, A. (1998). Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. *J Virol Methods.* 75, 59-68.
- Schägger, H. & von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Schiebel, W.,** Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H. L. & Wassenegger, M. (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* 10, 2087-2101.
- Sethna, P. B.,** Hung, S.L., Brian, D. A. (1989). Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5626-5630.

7. Literaturverzeichnis

- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. & Fire, A. (2001).** On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Singh, R. (2002).** RNA-protein interactions that regulate pre-mRNA splicing. *Gene Expr.* 10, 79-92.
- Strauss, J. H. & Strauss, E. G. (1988).** Evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 657-683.
- Strauss, J. H. & Strauss, E. G. (1994).** The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 491-562.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E. J. & Thiel, H.-J. (1996).** Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27 nucleotide insertion. *J. Virol.* 70, 7851-7858.
- Tautz, N., Meyers, G. & Thiel, H.-J. (1993).** Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* 197, 74-85.
- Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E. J. & Meyers, G. (1994).** Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by internal deletion. *J. Virol.* 68, 3289-3297.
- Terpstra, C. (1981).** Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res. Vet. Sci.* 30, 185-191.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T. & Meyers, G. (1991).** Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* 65, 4705-4712.
- Tsiang, M., Monroe, S. S. & Schlesinger, S. (1985).** Studies of defective interfering RNAs of Sindbis virus with and without tRNA-ASP sequences at their 5' termini. *J. Virol.* 54, 38-44.
- van Bekkum, J. G. & Barteling, S. J. (1970).** Plaque production by hog cholera virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 32, 185-200.
- Vennema, H., Poland, A., Foley, J. & Pedersen, N. C. (1998).** Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243, 150-157.

7. Literaturverzeichnis

- Vilcek, S., Greiser-Wilke, I., Nettleton, P. & Paton, D. J. (2000).** Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet. Microbiol.* 77, 129-136.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. & Thiel, H.-J. (1992).** A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol* 66, 3677-3682.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G. & Thiel, H.-J. (1990).** Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J. Virol* 64, 3563-3569.
- White, K. A. & Morris, T. J. (1994).** Nonhomologous RNA recombination in tombusvirus: Generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *J. Virol.* 68, 14-24.
- Worobey, M. & Holmes, E. C. (1999).** Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 80, 2535-2543.
- Zhang, G., M., A., Clarke, M. C. & Mc Cauley, J. W. (1997).** Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J. Gen. Virol.* 77, 1677-1681.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 : Das „template switch“-Modell für RNA-Rekombination	14
Abb. 1: Das „template switch“-Modell für RNA-Rekombination (Fortsetzung)	15
Abb. 2: Das „breakage and ligation“- Modell für RNA-Rekombination	16
Abb. 3: Basenpaarung begünstigt den replikativen „template switch“	18
Abb. 4: Heteroduplexstrukturen können replikative und nicht replikative RNA-Rekombination begünstigen	19
Abb. 5: Taxonomie, Morphologie, Genomaufbau und Biotypen von Pestiviren	22
Abb. 6: Pathogenese der „Mucosal Disease“ und Isolierung von zytopathogenen Viren	25
Abb. 7: Genomaufbau und NS3-Entstehung bei zp Pestiviren	27
Abb. 8: Modell für die Integration zellulärer mRNA-Sequenzen in virale Plusstranggenome	30
Abb. 9: <i>In vivo</i> RNA-Rekombinationssystem für BVDV	81
Abb. 10: Linearisierte cDNA p+ubi SGT und synthetisches Transkript +ubi SGT ohne und nach DNaseI-Verdau	83
Abb. 11: Die Häufigkeit unabhängig voneinander entstandener zytopathischer Effekte in Zellkultur korreliert mit der Menge an transfiziertem +ubi SGT	85
Abb. 12: „Northern Blot“-Analyse rekombinanter BVDV-Genome	87
Abb. 13: Nukleotidsequenzen der „crossover“-Regionen der zp BVDV-Rekombinanten R-cp 1 bis R-cp 46	88
Abb. 14: Genomorganisation von R-cp 1 und R-cp 46	90
Abb. 15: Lage der Rekombinationsstellen von R-cp 1 bis R-cp 46 in beiden parentalen RNAs	90
Abb. 16: Transfektion von -ubi SGT in mit BVDV NCP7 infizierte Zellen	91
Abb. 17: Untersuchung zur Initiation der Replikation des Minusstrangs -CP7-5A	93
Abb. 18: Stabilität von +ubi SGT nach Transfektion	94
Abb. 19: RNA-Rekombination in nicht infizierten Zellen nach Kotransfektion von zwei synthetischen Transkripten	96
Abb. 20: Vergleichende lichtmikroskopische und Immunfluoreszenzanalysen von MDBK-Zellen, die mit rekombinanten zp und nzp BVDV-Viren infiziert wurden	97
Abb. 21: Sequenzanalyse und Genomaufbau der nzp BVDV-Rekombinanten R-ncp 1 und R-ncp 2	99
Abb. 22: Rekombinationsexperimente mit 3'NTR-Mutanten von +ubi SGT	101
Abb. 23: Rekombinationsexperimente mit RdRp-Mutanten von NCP7-5A	103
Abb. 24: 3'- und 5'-terminal verkürzte Konstrukte von BVDV CP7-5A	105
Abb. 25: Analyse der nach Kotransfektion von 5'- und 3'-terminal verkürzten Genomteilen von CP7-5A aufgetretenen zp BVDV-Rekombinanten	107
Abb. 26: „Crossover sites“ und Aminosäuresequenzen der aus Kotransfektion von 3'- und 5'-terminal verkürzten Genomanteilen von CP7-5A hervorgegangenen zp BVDV-Rekombinanten R1 bis R12	108
Abb. 27: <i>In vivo</i> RNA-Rekombinationssystem für KSPV	112
Abb. 28: Analyse des rekombinanten zp KSPV-Stamms CP G1	114
Abb. 29: Die Infektion mit KSPV CP G1 führt zu ZPE auf verschiedenen Zelllinien	117
Abb. 30: Wachstumskinetik und NS2-3/NS3-Expression der KSPV-Stämme CP G1 und Alfort-p447	119
Abb. 31: Genetische Stabilität des zp KSPV-Stamms CP G1 im Verlauf von Zellkulturpassagen	123
Abb. 32: Rekombinationsregionen der KSPV-Subgenome 1 bis 12	125
Abb. 33: Genomorganisationen der rekombinanten KSPV-Subgenome 1 bis 12	127
Tab. 1: Zelluläres Homolog, genomischer Integrationsort und Integrationshäufigkeit von mRNA-Insertionen in zp BVDV-Stämmen	29
Tab. 2: BVDV-Primer	35
Tab. 3: KSPV-Primer	38
Tab. 4: Vektorprimer	39
Tab. 5: Sequenzierprimer	40
Tab. 6: Anzahl von zp Rekombinanten nach Kotransfektion verschiedener Paare von 5'- und 3'-terminal verkürzten Genomteilen von CP7-5A in nicht infizierte Zellen	107
Tab. 7: Antikörpertiter aus Serumneutralisationstests	121

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 6 wurde von Dr. Matthias König, Abb. 7 und Tab. 1 wurden von PD Dr. Paul Becher (beide Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt und entsprechend modifiziert.

9. Publikationen, Vorträge und Poster

Publikationen:

Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H.-J. & Becher, P.
RNA recombination *in vivo* in the absence of viral replication.
J. Virol. 78, 6271-6281, (2004).

Gallei, A., Rümenapf, T., Thiel, H.-J. & Becher, P.
Characterization of helper virus independent classical swine fever virus
generated by an *in vivo* RNA recombination system.
J. Virol. 79, 2440-2448, (2005).

Vorträge:

Andreas Gallei*, Heinz-Jürgen Thiel & Paul Becher
Mechanism of RNA Recombination in Pestiviruses.
-Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 2003.

Poster:

Andreas Gallei, Tillmann Rümenapf, Heinz-Jürgen Thiel & Paul Becher
Generation of Helper Virus Independent Cytopathogenic Classical Swine
Fever Virus by *in vivo* RNA Recombination.
- *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 2004.*
- *7th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses,*
San Francisco, USA, 2004.

Andreas Gallei, Alexander Pankraz, Heinz-Jürgen Thiel & Paul Becher
RNA Recombination in the Absence of a Viral RNA-Dependent RNA-
Polymerase.
- *11th International Symposium on Hepatitis C & Related Viruses,*
Heidelberg, 2004.

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von PD Dr. Paul Becher am Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt. Diese Studie wurde im Rahmen des Teilprojekts B8 „RNA-Rekombination bei Pestiviren“ des Sonderforschungsbereichs 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ durch die DFG gefördert.

Mein besonderer Dank gilt:

- PD Dr. Paul Becher für die gegebene Möglichkeit zur Promotion, die detaillierte Einführung in die molekulare Virologie, seine Begeisterungsfähigkeit, seine Unterstützung und seinen Einsatz in *allen* Belangen, die gegebene Freiheit in der eigenen Projektgestaltung, für gute Gespräche und ein ausgesprochen freundschaftliches Arbeitsverhältnis.
- Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für das gewährte Vertrauen, seine bereitwillige Unterstützung und Förderung, den ungezwungenen Umgang miteinander, die stets konstruktive Kritik sowie nicht zuletzt die unermüdliche Korrektur meiner Manuskripte.
- der viel zu früh verstorbenen Michaela Orlich, die mir nicht nur die grundlegenden molekularbiologischen Methoden vermittelte, sondern durch ihren Fleiß und ihr Engagement auch ein Vorbild für eine gewissenhafte und durchdachte Planung meiner Experimente war.
- Simone Widauer, Alexander Pankraz und Martina Willebrand für ein „*wunderbares* Lab two-thirty“, entgegengebrachte Unterstützung und Hilfe.

10. Danksagung

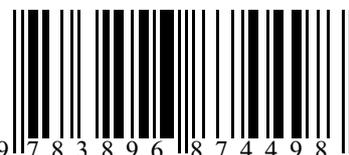
- Den anderen Mitarbeitern des Instituts für Virologie, insbesondere HD Dr. Norbert Tautz, Dr. Matthias König, Prof. Dr. Till Rügenapf, Dr. Thomas Krey, Dr. Tobias Lackner, Manuela Heimann, Renate Neidhart und Kerstin Göbler für ein offenes Ohr, viele Anregungen, die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt die Bereitstellung wichtiger Arbeitsmaterialien.
- Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Förderung.
- und Tina!

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

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

ISBN 3-89687-449-7



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 4 9 8