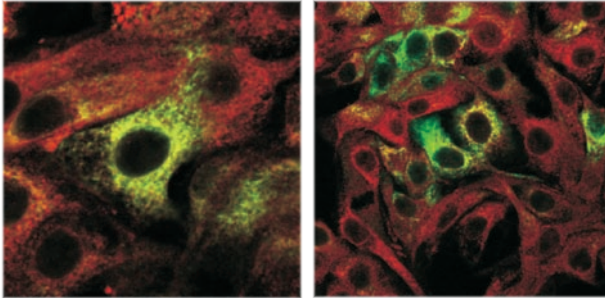


CHARAKTERISIERUNG DER NICHTSTRUKTURPROTEINE DES VIRUS DER KLASSISCHEN SCHWEINEPEST

BENJAMIN JAKOB JOACHIM LAMP



INAUGURAL-DISSERTATION eingereicht beim Fachbereich Veterinärmedizin in Erfüllung der Anforderungen für die Erlangung des akademischen Grades eines PhD der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin der Justus-Liebig-Universität



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2011

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 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Charakterisierung der Nichtstrukturproteine des Virus der Klassischen Schweinepest

INAUGURAL-DISSERTATION

eingereicht beim Fachbereich Veterinärmedizin
in Erfüllung der Anforderungen
für die Erlangung des akademischen Grades eines PhD
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität

eingereicht von

Dr. Benjamin Jakob Joachim Lamp

Tierarzt aus Dernbach

Gießen, 2011

Aus dem Institut für Virologie,
Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Tillmann Rügenapf

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Tillmann
Rügenapf

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Osterrieder

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Martin Diener

Prof. Dr. John Ziebuhr

Tag der Disputation: 12. September 2011

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

Benjamin Lamp

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Riedel, C., B. Lamp, M. Heimann und T. Rügenapf (2010). Characterization of essential domains and plasticity of the classical swine fever virus core protein. *J. Virol.* 84, 11523-11531

Lamp, B., C. Riedel, G. Roman-Sosa, M. Heimann, S. Jacobi, P. Becher, H.-J. Thiel und T. Rügenapf. Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 85, 3607-3620

Für meine drei Söhne Maximilian, Emil und Elias

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	I
2.	Abkürzungsverzeichnis	IV
3.	Einleitung	1
3.1	Die Familie <i>Flaviviridae</i>	1
3.2	Das Genus Pestivirus	1
3.3	Pestivirale Erkrankungen	4
3.4	Pestivirale Biotypen	7
3.5	Pestivirale Strukturproteine	9
3.6	Pestivirale Nichtstrukturproteine	12
3.7	Nichtstrukturproteine des Hepatitis C Virus	14
3.8	Zielsetzung der Arbeit	15
4.	Material und Methoden	16
4.1	Material	16
4.1.1	Chemikalien und Reagenzien	16
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
4.1.3	Geräte	18
4.1.4	Enzyme	19
4.1.5	Kits	19
4.1.6	Antikörper	20
4.1.6.1	Primärantikörper.....	20
4.1.6.2	Sekundärantikörper.....	20
4.1.7	Basis-Plasmide	21
4.1.8	Pestivirale Genome als cDNS-Klone	21
4.1.9	Pestivirale Replikons als cDNS-Klone	21
4.1.10	Prokaryotische Zellen	22
4.1.11	Eukaryotische Zellen	22
4.1.12	Viren	22
4.1.13	Medien, Lösungen und Puffer	22
4.2	Methoden	27
4.2.1	Arbeiten mit DNS und RNS.....	27
4.2.1.1	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	27
4.2.1.2	Transformation in <i>E. coli</i>	27
4.2.1.3	Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen	28

1. Inhaltsverzeichnis

4.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS	29
4.2.1.5 Phenol-Chloroform Extraktion von DNS und RNS	29
4.2.1.6 Präzipitation von DNS mit Ethanol	30
4.2.1.7 Restriktionsenzymverdau und Klonierungstechniken	30
4.2.1.8 Agarosegel-Elektrophorese von DNS und RNS	31
4.2.1.9 Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	32
4.2.1.10 Ligation von DNS-Fragmenten	33
4.2.1.11 PCR, RT-PCR und Klonierung von PCR-Fragmenten.....	34
4.2.1.12 Gerichtete Mutagenese	38
4.2.1.13 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen	39
4.2.1.14 <i>In vitro</i> Transkription	41
4.2.1.15 Gewinnung von Gesamt-RNS mittels RNeasy-Kit	42
4.2.1.16 Synthetische Oligonukleotide	42
4.2.1.17 Klonierung der Plasmide zur Expression der pestiviralen Nichtstrukturproteine	43
4.2.1.18 Generierung eines KSPV Replikons	46
4.2.1.19 Generierung eines KSPV Replikons und eines KSPV Gesamtklons mit einem Methionin im NS4A	46
4.2.2 Arbeiten mit Zellen	47
4.2.2.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken	47
4.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	48
4.2.2.3 Elektroporation von RNS in SK6-Zellen	48
4.2.2.4 Infektion von SK6-Zellen	49
4.2.2.5 Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen	49
4.2.2.6 Indirekter Immunperoxidase Test	50
4.2.2.7 Indirekter Immunfluoreszenz Test	51
4.2.2.8 Metabolische Markierung viraler Proteine mit S ³⁵	52
4.2.3 Arbeiten mit Proteinen	53
4.2.3.1 Radioimmunpräzipitation	53
4.2.3.2 SDS-PAGE, Autoradiographie	54
4.2.3.3 Western Blot (wet)	56
4.2.3.4 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	57
4.2.3.5 Affinitätsreinigung von His-Tag-Proteinen	58
4.2.3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	59

1. Inhaltsverzeichnis

4.2.3.7	Isotypisierung monoklonaler Antikörper	60
4.2.4	Herstellung monoklonaler Antikörper	61
4.2.4.1	Immunisierung von Mäusen	61
4.2.4.2	Präparation von Peritoneal-Zellen	61
4.2.4.3	Präparation von Splenocyten	62
4.2.4.4	Zellfusion und Aussaat der Hybridoma-Zellen	63
4.2.4.5	Selektion der Hybridoma-Zellen	64
4.2.4.6	ELISA zur Detektion monoklonaler Antikörper	65
4.2.4.7	Klonierung und Stabilisierung der Hybridoma-Klone	67
4.2.4.8	Produktion monoklonaler Antikörper	68
5.	Ergebnisse	69
5.1	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen KSPV NS2	69
5.1.1	Klonierung und Expression eines GST-NS2-3p-Fusionsproteins, eines GST-GFP-Fusionsproteins und von NS3	69
5.1.2	Reinigung des GST-NS2-3p-Fusionsproteins	70
5.1.3	Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen GST-NS2-NS3p	72
5.2	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen ein C-terminales Fragment der Helikase von KSPV NS3	75
5.2.1	Klonierung und Expression des C-term. NS3-Helikase-Fragments	75
5.2.2	Reinigung des C-terminalen NS3-Helikase-Fragments	77
5.2.3	Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen das C-terminale NS3-Helikase-Fragment	79
5.3	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen KSPV NS4B	81
	Klonierung und Expression eines C-terminalen NS4B-Fragments	82
5.3.1	Reinigung des C-terminalen NS4B-Fragments	83
5.3.2	Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen das C-terminale NS4B-Fragment	86
5.4	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen KSPV NS5A	88
5.4.1	Klonierung und Expression von NS5A	88
5.4.2	Reinigung von NS5A	89
5.4.3	Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen NS5A	91
5.5	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen die Nichtstrukturproteine des KSPV in der Immunfluoreszenz	93
5.6	Identifizierung der Nichtstrukturproteine des KSPV im Immunoblot	94

1. Inhaltsverzeichnis

5.6.1	Identifizierung der Nichtstrukturproteine eines zp KSPV Replikons in Immunoblot-Analysen	96
5.6.2	Identifizierung der Nichtstrukturproteine eines nzp KSPV in Immunoblot-Analysen infizierter SK-6 Zellen	98
5.7	Charakterisierung der Nichtstrukturproteine des KSPV im Radioimmunpräzitations-Assay	100
5.7.1	Charakterisierung der Nichtstrukturproteine eines zp KSPV Replikons im Radioimmunpräzitations-Assay	100
5.7.2	Charakterisierung der Nichtstrukturproteine eines nzp KSPV im Radioimmunpräzitations-Assay	102
5.7.3	Charakterisierung der Nichtstrukturproteine eines zp KSPV-JIV im Radioimmunpräzitations-Assay	103
5.8	Analyse der Kinetik der Nichtstrukturprotein-Prozessierung in nzp KSPV, zp KSPV-JIV und zp KSPV Replikon	105
5.9	Quantitative Bestimmung der Halbwertszeiten der Nichtstrukturproteine und Vorläufermoleküle im nzp KSPV, zp KSPV-JIV und zp KSPV Replikon	110
6.	Diskussion	114
6.1	Expression der KSPV Nichtstrukturproteine und Herstellung monoklonaler Antikörper	114
6.2	Identifizierung der reifen Nichtstrukturproteine und ihrer Vorläufermoleküle in KSPV infizierten Zellen	115
6.3	Kinetik der Nichtstrukturprotein-Prozessierung in KSPV infizierten Zellen	116
6.4	Vergleich der Nichtstrukturprotein-Prozessierung zwischen KSPV und BVDV	120
6.5	Vergleich der Nichtstrukturprotein-Prozessierung zwischen KSPV und HCV	121
6.6	Modell der Regulation nicht-zytopathogener KSPV	122
7.	Zusammenfassung	125
8.	Summary	126
9.	Literaturverzeichnis	127
	Danksagung	142

2. Abkürzungsverzeichnis

2. Abkürzungsverzeichnis

aa	„amino acids“, Aminosäuren
A	Ampere, Adenosin (nt), Alanin (AS)
Abb.	Abbildung
Acrylamid	N, N'-Methylen-bisacrylamid 29:1; 40% (w/v)
AEC	Aminoethylcarbazol
aMW	apparentes Molekulargewicht
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
β-Merc.	β-Mercaptoethanol
BDV	„Border Disease Virus“
bMW	berechnetes Molekulargewicht
Bq	Becquerel (radioaktive Zerfälle pro Sekunde)
BSA	Bovines Serumalbumin
BVDV	„Bovine Viral Diarrhea Virus“, Virus der bovinen Virusdiarrhöe
C	Cytidin (nt), Cystein (AS), Core (Kapsidprotein)
cDNS	komplementäre DNS
CIAP	„calf intestine alkaline phosphatase“, Alkalische Phosphatase
cp	„cytopathogenic“
cpe bzw. zpE	„cytopathogenic effect“, zytopathischer Effekt
CSFV	„Classical Swine Fever Virus“, Virus der klassischen Schweinepest
C-Protein	Core-Protein
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
°C Grad	Grad Celsius
Cy3	Cyanogen 3
D	Asparaginsäure
DABCO	0,1g1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
defiz.	defizient
DIP	Defektes Interferierendes Partikel
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“

2. Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA bzw. DNS	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure (AS)
E1 bzw. E2	„envelope protein 1 bzw. 2“, Hüllprotein in der viralen Membran
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
E ^{rns}	„envelope protein ribonuclease secreted“
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin (AS)
Fa.	Firma
FCS	„fetal calf serum“, fetales Kälberserum
FFU	„focus forming units“
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
G	Guanosin (nt), Glycin (AS)
g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung, Gramm
GFP	„green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde (lat. „hora“)
H	Histidin (AS)
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin u. Thymidin
HCV	Hepatitis C Virus
His	Histidin
Hsp40	„heat shock protein 40 kDa“
HT	Hypoxanthin u. Thymidin
6, 9, 14 His	Hexa-, Nona-, Tetradeca-Histidin-Tag
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser

2. Abkürzungsverzeichnis

I	Isoleucin (AS)
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleucin
IMAC	„immobilized metal ion affinity chromatography“, Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopiranosid
IRES	„internal ribosomal entry site“, interne ribosomale Bindungsstelle
IU	„international unit“, internationale Einheit
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KSPV	Virus der Klassischen Schweinepest
L	Leucin (AS)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar, Methionin (AS)
max.	maximal
mAb	„monoclonal antibody“, monoklonaler Antikörper
MD	„mucosal disease“
MDBK	„Madin Darby Bovine Kidney“
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	„multiplicity of infection“, Multiplizität der Infektion
mRNA	„messenger RNA“
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ S/cm	Mikrosiemens pro cm (Wert der elektrischen Leitfähigkeit)
N	Asparagin (AS)
NADL	„National Animal Disease Laboratory“
ncp	„non-cytopathogen“, nicht-zytopathogen
Ni	Nickel
nm	Nanometer

2. Abkürzungsverzeichnis

NP-40	Nonylphenyl-polyethylenglycol
N ^{pro}	aminoterminal Autoprotease
NS	Nichtstrukturprotein
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	„non-translated region“, nicht translatierte Region
nzp	nicht-zytopathogen
OD _x	optische Dichte bei „X“ nm
ORF	„open reading frame“
P	Prolin (AS)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	„Polyacrylamide Gel Electrophoresis“, Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“ phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
p. i.	post infectionem
PNK	Polynukleotidkinase
p. t.	post transfectionem
PVDF	Polyvinylidene fluoride
Q	Glutamin (AS)
QC	„Quick Change“
R	Arginin (AS)
r	rekombinant
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	„rotation per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription
S	Serin (AS)
S	Sekunde
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“, Natriumlaurylsulfat

2. Abkürzungsverzeichnis

SK-6	„Swine Kidney 6“
s. o.	siehe oben
SP	Signal Peptidase
SPP	Signal Peptid Peptidase
T	Thymidin (nt), Threonin (AS)
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	„terrific broth“
TCID ₅₀	„tissue culture infectious dosis 50“
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidine
tRNA	„transfer RNA“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	„Transferable Surface Plate“
U	Uridin (nt), Unit (Enzymeinheit)
u.	und
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
V	Volt, Valin (AS)
v/v %	Volumenprozent
v/w %	Gewichtsprozent
W	Watt, Tryptophan (AS)
wt	Wildtyp
X	Tyrosin (AS)
zp	zytopathogen

3. Einleitung

3.1 Die Familie *Flaviviridae*

Anhand von genetischen Übereinstimmungen werden in der virologischen Systematik ähnliche Isolate zu einer Spezies und verwandte Spezies zu einem Genus zusammengefasst. Außerdem vereint die Systematik verschiedene Genera in einer Familie, wenn sie eine ähnliche Genomorganisation aufweisen. Die Familie *Flaviviridae* beinhaltet die Genera Flavivirus, Hepacivirus und Pestivirus (Thiel et al., 2005). Alle Virusspezies dieser Familie besitzen ein einzelsträngiges, lineares RNS-Genom positiver („messenger sense“) Polarität ([+]ssRNS). Diese RNS hat eine Länge von 9,6 bis 12,3 Kilobasenpaaren (Lindenbach et al., 2007). Flankiert von nicht translatierten Regionen (NTRs) am 5'- und 3'-Ende kodiert die virale RNS ein Polyprotein in einem einzelnen offenen Leserahmen (ORF: „open reading frame“). Dabei sind sowohl die Lokalisation im Genom, als auch die Funktion vieler Struktur- und Nichtstrukturproteine gleichartig unter allen Genera innerhalb der Familie *Flaviviridae*.

Das Genus Flavivirus umfasst viele tier- und humanpathogene Virusspezies, wie zum Beispiel das tropische Gelbfiebertvirus, das Dengue-Fieber-Virus oder aus unseren Breiten das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV). Das Hepatitis-C-Virus (HCV) des Menschen und GBV-B sind die einzigen Vertreter des Genus Hepacivirus. Eine Ansteckung mit dem HCV führt häufig zu einer chronischen Infektion der Leber, die sich klinisch in Leberfibrose, Leberzirrhose und hepatozellulären Tumoren manifestieren kann. Außerdem schließt die Familie *Flaviviridae* die GBV-A ähnlichen Viren (GBV-A, -C und -D), die im Genus Pegivirus eingeordnet werden (Leary et al., 1996; Stapleton et al., 2011) und das Genus Pestivirus ein (Abb. 1).

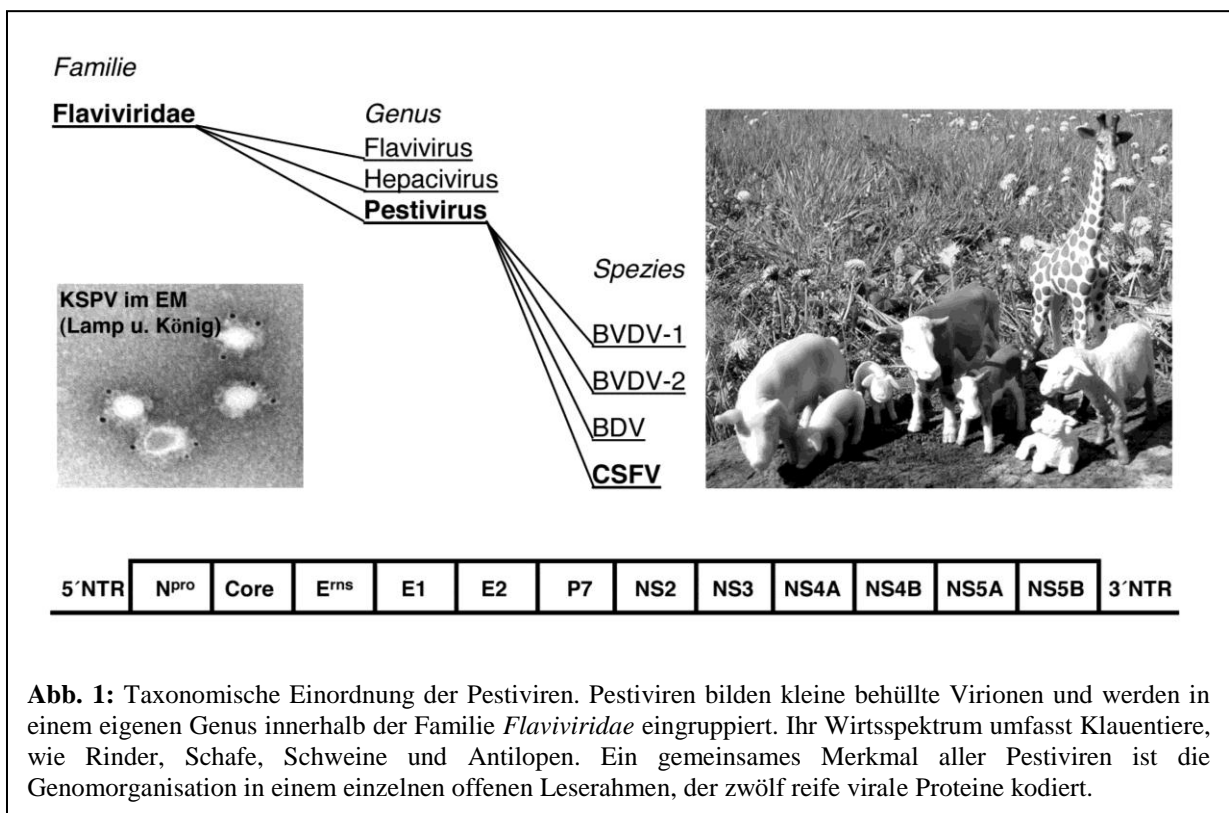
3.2 Das Genus Pestivirus

Das „Klassische Schweinepest Virus“ (KSPV bzw. CSFV: „Classical Swine Fever Virus“), die beiden Spezies des „Bovinen Virusdiarrhöe Virus“ (BVDV-1 u. BVDV-2), das „Border Disease Virus“ (BDV) und ein Virusisolat von der Giraffe (Giraffe-1) werden im Genus Pestivirus zusammengefasst (Avalos-Ramirez et al., 2001; Lindenbach et al., 2007). Im Jahr 2007 wurde in Australien ein neuartiges Pestivirus entdeckt („Bungowannah-Virus“), das große Sequenzunterschiede zu allen bekannten Pestiviren zeigt und eine eigene Spezies innerhalb der Pestiviren darstellt (Kirkland et al., 2007). Für weitere Pestivirusisolate (z. B. „Reindeer-1“ und „Bison“) wurde nach Sequenzanalyse die

3. Einleitung

Eingruppierung als eigene Spezies vorgeschlagen (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1999).

Pestiviren besitzen ein einzelsträngiges RNS-Genom positiver Polarität, das ungefähr 12,3 kb umfasst. Nur die Genome einzelner BVDV-Isolate besitzen Duplikationen oder Insertionen zellulärer Sequenzen, so dass ihre genomische RNS bis zu 16,5 kb umfasst. Wie bei allen *Flaviviridae* kodiert auch das pestivirale Genom in einem einzelnen offenen Leserahmen (ORF), der am 5'- und 3'-Ende von nicht translatierten Regionen (NTRs) flankiert wird, ein einzelnes Polyprotein. Die 5'-NTR bildet durch interne Basenpaarungen doppelsträngige Bereiche und formt eine komplexe, kleeblattartige Sekundärstruktur. Diese RNS-Struktur dient als interne Ribosomenbindungsstelle („Internal Ribosomal Entry Site“: IRES) und initiiert die Translation des ORFs (Fletcher et al., 2002). Auch beim Hepatitis C Virus wurde ein solches IRES-Element identifiziert (Lukavsky 2009). Hepaciviren und Pestiviren unterscheiden sich damit in der Translationsinitiation von den Viren des Genus *Flavivirus*, die durch ein so genanntes „capping“ des 5'-Endes ihrer RNS eine zelluläre mRNA imitieren (Issur et al., 2009).



Das Polyprotein der Pestiviren umfasst ungefähr 3900 Aminosäuren. Am N-Terminus des Polyproteins folgen auf das Nichtstrukturprotein N^{pro} die vier Strukturproteine (C, E^{ns}, E1

3. Einleitung

und E2), die ungefähr ein Drittel des Polyproteins ausmachen. Die restlichen Nichtstrukturproteine (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B), die alle strukturellen und enzymatischen Komponenten des Replikationskomplexes beinhalten, bilden eine funktionelle Einheit am C-Terminus des Polyproteins. Virale und zelluläre Proteasen generieren durch ko- und posttranslationale Prozessierung des viralen Polyproteins insgesamt zwölf reife virale Proteine (Collett et al., 1988; Collett et al., 1991; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993).

Die behüllten pestiviralen Partikel haben einen Durchmesser von 40-60 nm; sie bestehen aus einer Lipiddoppelmembran, den vier viralen Strukturproteinen (C, E^{ms}, E1 und E2) und der viralen RNS (Rümenapf et al., 2008). Dabei ist das Core-Protein an den viralen Nukleinsäurestrang angelagert und bildet vermutlich eine kapsidartige Struktur (Riedel et al., 2010). Die drei viralen Glykoproteine E^{ms}, E1 und E2 sind in der Lipiddoppelmembran verankert bzw. ihr angelagert (Thiel et al., 1991; Tews et al., 2007). Infektiöse pestivirale Virionen werden an intrazellulären Membranen gebildet und durch Exozytose freigesetzt (Bielefeldt Ohmann et al., 1987). Für BVDV wurde das zelluläre Oberflächenprotein CD46 als Rezeptormolekül identifiziert (Maurer et al., 2004; Krey et al., 2006). Spezifische Inhibitoren der Clathrin-vermittelten Endozytose (z. B. Chlorpromazin) hemmen die Infektion von Pestiviren. Weiterhin wurde gezeigt, dass für die Infektion von BVDV eine Ansäuerung der zellulären Endosomen essentiell ist. Substanzen wie Chloroquin, Bafilomycin A1 und Ammoniumchlorid, die zelluläre Phagolysosomen alkalisieren, sind gegen Pestiviren wirksam. Daher wird davon ausgegangen, dass die Virionen ihre Nukleocapside nach Clathrin-vermittelter Endozytose durch eine pH-abhängige Membranfusion im Lysosom ins Zytoplasma einschleusen (Lecot et al., 2005).

Nach natürlichen Infektionen und im Zellkultur-System wurden subgenomische „defective interfering particles“ (DIP) isoliert und charakterisiert. Sequenzanalysen zeigten, dass einige replikationsfähige subgenomische DIPs eine vollständige Deletion der für N^{pro}, E^{ms}, E1, E2, p7 und NS2 kodierenden Region aufwiesen (Tautz et al., 1994). Daher sind offensichtlich neben 5'- und 3'-NTRs nur die im C-Terminus des Polyproteins lokalisierten Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5B zur Replikation des Genoms nötig (Moser et al., 1999). Die gesamte virale Replikation läuft im Zytoplasma der Wirtszelle ab.

3. Einleitung

3.3 Pestivirale Erkrankungen

Pestivirale Erkrankungen haben weltweit eine große wirtschaftliche Bedeutung. Durch Pestiviren verursachte Erkrankungen betreffen ausschließlich die Säugetierordnung der Paarhufer (Artiodactyla). Neben Schweinen (Unterordnung Suina) und Wiederkäuern (Unterordnung Ruminantia) sind auch Schwielensohler (Unterordnung Tylopoda) für pestivirale Infektionskrankheiten empfänglich. Unter natürlichen Bedingungen betreffen KSPV-Infektionen ausschließlich Schweine. Beide BVDV Spezies und BDV haben dagegen ein breiteres Wirtsspektrum. Bislang wurden klinisch manifeste BVDV-Infektionen bei Rindern, Schafen, Ziegen, verschiedenen Antilopenarten (alle Familie Bovidae), Hirschen (Familie Cervidae), Giraffen (Familie Giraffidae) und Kamelen (Familie Camelidae) nachgewiesen (Becher et al., 1999).

Beim Ausbruch einer KSPV-Epidemie kommt es, neben den erheblichen Schäden durch die Erkrankung selbst, auch zu großen wirtschaftlichen Einbußen für ganze Regionen durch internationale tierseuchenrechtliche Handelsrestriktionen (Beer et al., 2007). Bei KSPV-Isolaten werden hoch-, mittel- und schwachvirulente Stämme unterschieden, wobei berücksichtigt werden muss, dass die betroffene Schweinerasse, das Alter und der immunologische Status der Tiere einen erheblichen Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung haben (Moennig et al., 2003). Die Inkubationszeit beträgt ungefähr eine Woche. Die akute Verlaufsform der Schweinepest, die vor allem durch hochvirulente Stämme ausgelöst wird, ist eine Erkrankung mit meist tödlichem Ausgang. Infizierte Tiere zeigen dabei ein hochgradig getrübtetes Allgemeinbefinden, das durch hohes Fieber, Nasenausfluss, Atemnot, Somnolenz, Diarrhöe, Inappetenz, Tremor und Hinterhandparese gekennzeichnet wird. Im Blutbild zeigt sich während der gesamten Erkrankung eine deutliche Thrombozytopenie und Leukopenie. Charakteristisch für die akut-letale Form der Schweinepest ist das sogenannte „Hämorrhagische Syndrom“, bei dem sich cyanotische Verfärbungen am Abdomen, dem Rüssel und den Ohren ausbilden. Dabei werden auch petechiale bis ekchymöse Blutungen an äußerer Haut, den Schleimhäuten und inneren Organen, wie z. B. der Blase, beobachtet. Betroffene Tiere können durch Ausbildung spezifischer zellulärer und humoraler Immunreaktion vollständig genesen oder eine chronische Verlaufsform der Erkrankung entwickeln, die mit langdauernder Virämie einhergeht. Weniger virulente KSPV-Stämme erzeugen subakute, transiente Verlaufsformen der Erkrankung. Betroffene Tiere zeigen vor allem Verdauungsstörungen, respiratorische Krankheitssymptome, Hautläsionen, Fertilitätsstörungen und

3. Einleitung

Leistungseinbußen. Die Krankheitssymptome sind im Vergleich zur akuten Form milder ausgeprägt und ein größerer Anteil der infizierten Tiere überlebt die Erkrankung (Amtliche Methodensammlung 2009).

Nach vertikaler Infektion kann KSPV persistente Infektionen (PI) verursachen, wobei die Ferkel eine Immuntoleranz gegen das KSPV zeigen. Die PI-Ferkel bleiben über einen Zeitraum von wenigen Wochen bis mehreren Monaten klinisch unauffällig (maximal 11 Monate), wobei sie eine Virämie ausbilden und fortlaufend große Virusmengen ausscheiden. PI-Ferkel entwickeln dann die sogenannte „late onset disease“ und sterben. Die „Klassische Schweinepest“ wird in der Europäischen Gemeinschaft gemäß der Richtlinie 2001/89/EG bekämpft. In Deutschland besteht Anzeigepflicht, wobei die Bekämpfung in der „Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest“ geregelt wird (BGBl. I, Nr. 37, S. 1496-1511).

BVDV und BDV verursachen nach horizontaler Infektion meist milde oder subklinische Infektionen. Abhängig von der Virulenz des Virusstammes werden dabei milde Leukopenie, Thrombozytopenie, Fieber, Durchfall und Immunsuppression beobachtet (Potgieter et al., 1985). Vereinzelt (z. B. bei einigen BVDV-2 Stämmen in Nordamerika) wurden hochvirulente BVDV-Stämme beschrieben, die schwere Erkrankungen mit hoher Morbidität und Letalität bei Jungtieren verursachen. Dabei kommt es nach schwerer Thrombozytopenie zum sogenannten „Haemorrhagischen Syndrom“ mit petechialen und ekchymösen Blutungen in Schleimhäuten und inneren Organen (Rebhuhn et al., 1989). Die wirtschaftliche Bedeutung von BDV und BVDV liegen hauptsächlich in der Immunsuppression und in den aus der Infektion resultierenden Reproduktionsstörungen in Rinder- und Schafhaltungen.

Alle Pestiviren können die Plazentaschranke von trächtigen Wirtstieren überwinden, so dass der Embryo bzw. Fetus in utero infiziert werden kann (Lindenbach et al., 2007). Aufgrund der epithelio-chorialen Plazenta der Paarhufer gelangen Antikörper aus dem Blut des Muttertieres nicht durch die anatomischen Barrieren der Plazentaschranke. Abhängig vom Stadium der Trächtigkeit variieren die Auswirkungen einer vertikalen Pestivirus-Infektion. Es kann zur Resorption der Frucht, zum Abort, bzw. zur Totgeburt kommen oder lebensschwache Neonaten mit Missbildungen (z. B. Kleinhirnhypoplasie) werden geboren. Erfolgt die Infektion des Fetus erst spät in der Trächtigkeit – zu einem

3. Einleitung

Zeitpunkt an dem das Immunsystem schon weitgehend ausgereift ist – wird das Virus eliminiert und eine gesunde Frucht wird geboren. Bei der Infektion eines Rinder-Fetus mit einem nicht-zytopathogenen BVDV zwischen dem 40. und 120. Tag der Trächtigkeit kann der Fetus eine Immuntoleranz gegenüber dem Virus entwickeln. Da sich das Immunsystem noch in der Prägephase befindet, werden während der Thymus-Reifung nicht nur die gegen körpereigene Proteine gerichteten, sondern auch alle gegen virale Proteine gerichteten T- und B-Zellen einer negativen Selektion unterworfen (Collen et al., 2000). Solche Tiere bilden also weder Antikörper (B-Zell-Reaktion) noch eine protektive T-Zell-Reaktion gegen die viralen Antigene aus. Sie bleiben daher mit dem betreffenden Virus infiziert und scheiden zeitlebens große Mengen infektiöser Virionen aus. Persistent infizierte Rinder (PI-Tiere) verfügen ansonsten häufig über ein voll funktionsfähiges Immunsystem, sind phänotypisch unauffällig und können ein Alter von mehreren Jahren erreichen. Sie sind für die Epidemiologie von BVD von entscheidender Bedeutung, da sie ein Virusreservoir in bereits durchseuchten, immunen Beständen bilden. Mit Hilfe der PI-Tiere können BVD- und BD-Viren die jeweils nächste Generation erreichen (Meyers et al., 1996[A]).

Die „Mucosal Disease“ (MD) ist eine sporadisch auftretende Sonderform der pestiviralen Erkrankung, bei der immer gleichzeitig nzp und zp BVDVs isoliert werden können. Ihre Genese ist sehr komplex und bedarf einer gesonderten Beschreibung: Durch Rekombination oder Insertion zellulärer Sequenzen entstehen in Tieren, die persistent mit einem nicht-zytopathogenen (nzp) BVDV infiziert sind, sporadisch zytopathogene (zp) Virus-Mutanten. Die zytopathogene Virus-Mutante unterscheidet sich antigenetisch nicht vom persistierenden nzp Virus, so dass sich ein sogenanntes nzp/zp Virus-Paar bildet. Da die gegen das nzp Virus vorliegende Immuntoleranz sich auch auf das zp Virus erstreckt, kommt es zur Ausbreitung der eigentlich avirulenten zp Virusmutante im betroffenen Tier. Daher sind zytopathogene Virus-Mutanten kausativ für die Entstehung der akut verlaufenden MD, an der ausschließlich PI-Tiere erkranken können (Bolin et al., 1985; Brownlie et al., 1984). Betroffene Tiere leiden anfänglich unter Geschwüren im Darm und blutigem Durchfall. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Depletion des lymphoretikulären Gewebes, zu auffälligen Läsionen und Ulzerationen an allen Schleimhäuten sowie der äußeren Haut (z. B. Kronsaum, Klauenspalt, u.s.w.). Innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen nach dem Einsetzen der ersten Symptome führt die „Mucosal Disease“ immer zum Tod des PI-Tieres (Moennig et al., 1992).

3. Einleitung

Durch Impfungen mit vermehrungsfähigen zytopathogenen BVDVs kann ein ähnliches Krankheitsbild in PI-Tieren erzeugt werden. Da der zp Impfstamm meist antigenetische Unterschiede zum persistierenden nzp Feldisolat aufweist, wird anfänglich meist eine Immunreaktion der PI-Tiere auf die Impfung beobachtet. Es kann aber auch zur Rekombination zwischen dem vermehrungsfähigen zp Impfstamm und dem persistierenden nzp Feldisolat kommen. Nach einigen Wochen bis Monaten post vaccinationem entsteht dann ein nzp/zp Virus-Paar, das MD induziert (Ridpath et al., 1995). In der Europäischen Gemeinschaft gibt es noch keine BVDV-Richtlinie, die eine gemeinschaftliche Bekämpfung der Tierseuche vorschreibt. In Deutschland besteht für BVDV eine Anzeigepflicht und eine „Verordnung zum Schutz der Rinder vor dem BVD-Virus“ regelt die Bekämpfungsmaßnahmen (Bgl. 49, S. 1308).

3.4 Pestivirale Biotypen

Ein gemeinsames Merkmal aller Pestiviren ist das Auftreten von zwei unterschiedlichen Biotypen, die anhand charakteristischer morphologischer Veränderungen infizierter Zellkulturen definiert werden (Gillespie et al., 1960). Nicht-zytopathogene Pestiviren verursachen nach Infektion einer Gewebekultur keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen. Zytopathogene Pestiviren induzieren hingegen deutlich erkennbare zytopathische Effekte (Hoff et al., 1997). Es wurde festgestellt, dass zp BVDV große Mengen an freiem NS3 (80kDa) bilden, während NS3 in nzp BVDV nicht nachgewiesen werden konnte (Donis et al., 1987; Podock et al., 1987). Die für nzp/zp BVDV beschriebenen Unterschiede in der NS2-3 Prozessierung konnten auch in nzp/zp BDV-Feldisolaten nachgewiesen werden (Becher et al., 1996). Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurde bewiesen, dass auch in nzp BVDV geringe Mengen von reifem NS3 gebildet werden. Die Prozessierung von NS2-3 ist aber in nzp BVDVs auf frühe Phasen der Infektion beschränkt (Lackner et al., 2004). Zp BVDVs bewirken durch ihre Replikation eine Aktivierung der angeborenen Immunabwehr, so dass Interferon α und β gebildet werden, die eine Apoptose der infizierten Zellen einleitet (Thyrell et al., 2002; Yamane et al., 2006). Obwohl bekannt ist, dass die Expression von reifem NS3 zu einer gesteigerten RNS-Syntheserate führt (Vassilev et al., 2000), konnte die molekulare Genese der Apoptoseinduktion bislang nicht endgültig aufgeklärt werden. Als mögliche Ursache für die Apoptoseinduktion wird die Akkumulation viraler RNS, die Anreicherung viraler Proteine am endoplasmatischen Retikulum oder eine direkte Einwirkung der NS3-Protease diskutiert. Im Protein NS4B wurde eine Punktmutation identifiziert, die weder

3. Einleitung

die effiziente NS2-3 Prozessierung noch die hohe RNA-Replikationsrate beeinflusst und dennoch im Kontext eines infektiösen zytopathogenen BVDV eine Änderung zum nicht-zytopathogenen Biotyp bewirkt (Qu et al., 2001). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass ein komplexer Mechanismus und nicht die Generierung von freiem NS3 allein für die Induktion der Apoptose in zp Pestiviren verantwortlich ist.

Zytopathogene Pestiviren entstehen durch zufällige RNA-Rekombinationsereignisse aus parentalen nicht-zytopathogenen Pestiviren. Bei persistent mit nzp BVDV infizierten Wirtstieren ist ihr Auftreten kausal für die Entstehung der „Mucosal Disease“ (MD). Sequenzvergleiche von solchen nzp/zp BVDV-Viruspaaren, die aus an MD erkrankten Rindern isoliert werden konnten, erlaubten die Charakterisierung genetischer Determinanten des zp Biotyps. Dabei wurden sehr unterschiedliche Mutationen beobachtet, die für die Zytopathogenität von BVDVs verantwortlich sind. Studien in reversen genetischen Systemen konnten belegen, dass die Einführung bzw. Eliminierung dieser Mutationen eine Änderung des Biotyps bewirkt. Diese Mutationen bewirken immer eine gesteigerte NS2-3 Prozessierung und betreffen vor allem die NS2-3 kodierenden Regionen (Kümmerer et al., 2000). Bislang wurden fünf Hauptmechanismen beschrieben, die in zp Pestiviren zur Generierung von freiem NS3 führen:

1. Durch Deletion aller Strukturproteine, p7 und von NS2 entsteht ein zytopathogenes Replikon (z. B. BVDV, Replikon DI9), das ein effizient prozessiertes N^{pro}-NS3-Fusionsprotein kodiert (Tautz et al., 1994; Behrens et al., 1998).
2. Die Insertion zellulärer Sequenzen zwischen NS2 und NS3 (z. B. Ubiquitin in BVDV, Stamm Osloss) bewirkt eine effiziente Prozessierung von NS2-3 durch zelluläre Proteasen (Meyers et al., 1989 [B]).
3. Die Duplikation viraler Sequenzen (z. B. Npro-NS3-NS4A/B in zp BVDV, Stamm Pe515CP) bewirkt eine gesteigerte Expression von reifem NS3 (Meyers et al., 1992).
4. Punktmutationen (z. B. BVDV, Stamm Oregon; Kümmerer et al., 1998) oder kleine Insertionen (z. B. BVDV, Stamm CP7; Meyers et al., 1996 [C]) innerhalb der NS2-Sequenz aktivieren die NS2-Autoprotease und beschleunigen so die NS2-3 Prozessierung.
5. Die Insertion des zellulären Chaperons DNAJC14 im pestiviralen NS2 (z. B.

3. Einleitung

BVDV, Stamm NADL; Mendez et al., 1998) oder an anderen Positionen im pestiviralen Polyprotein (z. B. BVDV, Stamm CP8; Müller et al., 2003) bewirkt eine gesteigerte NS2-3 Prozessierung. DNAJC14 wurde als essentieller zellulärer Kofaktor der NS2-Autoprotease charakterisiert (Lackner et al., 2006) und wird deshalb auch als JIV-Protein bezeichnet („J-domain protein interacting with viral protein“).

Im Gegensatz zu nzp BVDVs wurde im nicht-zytopathogenen Biotyp des KSPV eine Prozessierung von NS2-3 zu reifem NS3 beobachtet (Donis et al., 1987; Podock et al., 1987; Greiser-Wilke et al., 1992). Zytopathogene KSP-Feldisolate wurden nur selten beschrieben. Bei diesen Isolaten handelte es sich ausschließlich um Helfervirus-abhängige Subgenome („defective interfering particles“, DIPs), die eine Deletion der für N^{pro}, die Strukturproteine, p7 und NS2 kodierenden Region aufwiesen (Aoki et al., 2001; Kosmidou et al., 1998; Meyers et al., 1995). Im reversen genetischen System konnten aber nach dem Vorbild zytopathogener BVDVs auch zytopathogene genomische KSPVs generiert werden. So wurde beispielsweise die Insertion einer JIV kodierenden Sequenz, die aus einem zp BVDV (Stamm CP8, Müller et al., 2003) stammte, für die Konstruktion eines stabilen zp KSPV verwendet (Gallei et al., 2008). Dieser Versuch belegte außerdem indirekt, dass auch die NS2-3 Prozessierung in KSPV von JIV beeinflusst wird.

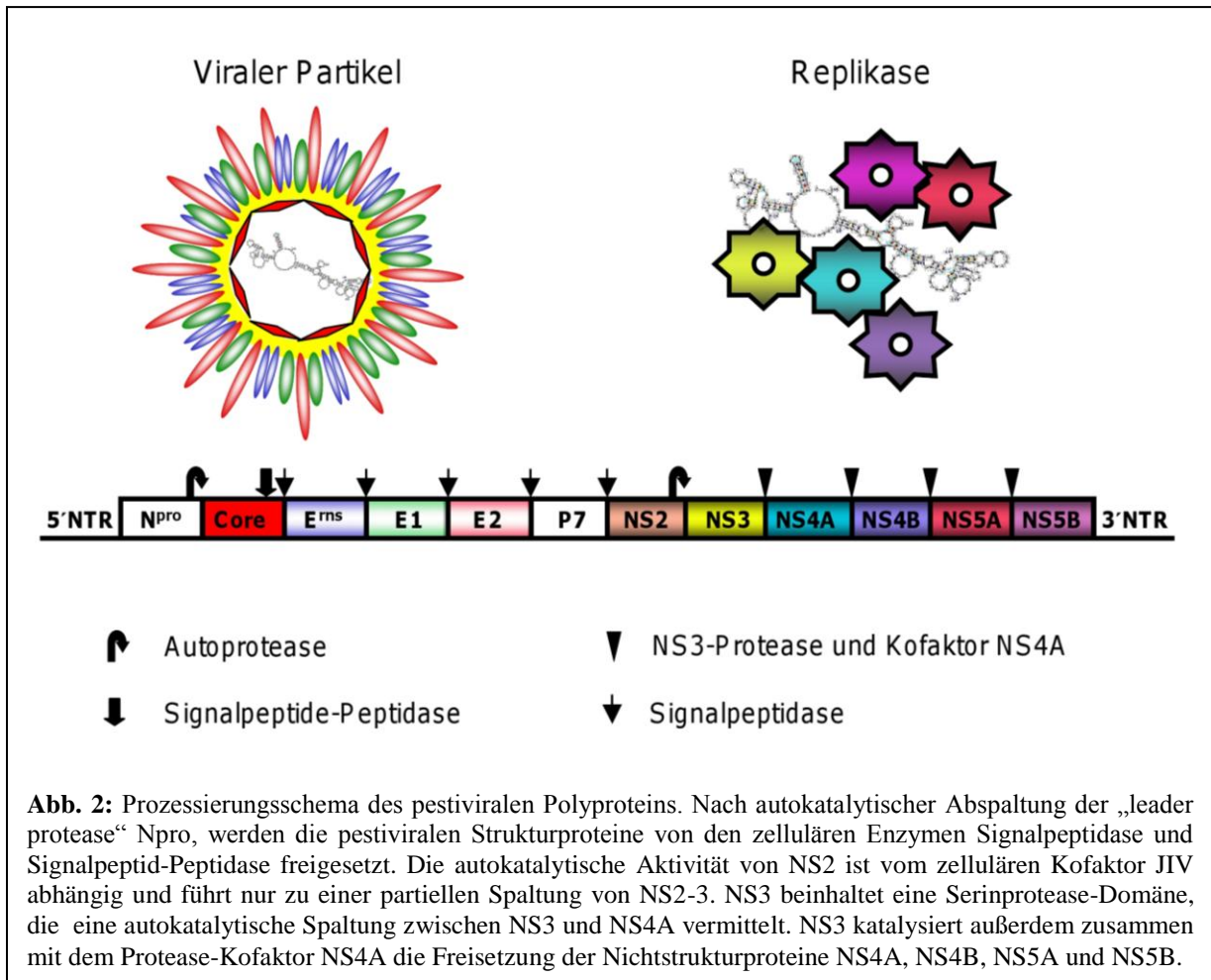
3.5 Pestivirale Strukturproteine

Nach Freisetzung der viralen RNA wird diese im Zytoplasma der Wirtszelle als Matrize zur Proteinsynthese genutzt („infektiöse RNA“). Die IRES vermittelte Translation des offenen Leserahmens generiert das pestivirale Polyprotein. Wie bei anderen Plus-Strang RNA-Viren entstehen die reifen Virusproteine durch ko- und posttranslationale Prozessierung dieses Polyproteins (Kräusslich et al., 1988). Katalysiert durch die Aktivität zellulärer und viraler Proteasen entstehen aus dem pestiviralen Polyprotein zwölf reife Virusproteine (Abb. 2). Alle Strukturproteine werden im vorderen Drittel des pestiviralen RNA-Genoms kodiert.

Die N-terminale Autoprotease N^{pro} spaltet sich an einer Cys/Ser-Site vom Polyprotein ab und erzeugt den N-Terminus des reifen Core-Proteins (Stark et al., 1993). Unter allen Vertretern der *Flaviviridae* besitzen nur die Pestiviren eine solcher „Leader-Autoprotease“. Für die Replikation in Zellkultur-Systemen ist diese Subtilisin-ähnliche

3. Einleitung

Autoprotease nicht essentiell (Tratschin et al., 1998). N^{pro} stellt im natürlichen Wirt einen bedeutenden Virulenzfaktor dar. Durch Bindung und Degradation von „interferon regulatory factor 3“ (IRF3) verhindert N^{pro} die Apoptose der Wirtszellen und unterdrückt die Interferon-Antwort des Wirtstieres (Bauhofer et al., 2007).



An der Prozessierung der pestiviralen Strukturproteine Core, E^{ms}, E1 und E2 sind abgesehen von N^{pro} nur zelluläre Proteasen beteiligt. Eine Signalsequenz am N-Terminus des E^{ms} bewirkt die Translokation des naszierenden Polyproteins ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Weitere Signalsequenzen befinden sich am N-Terminus von E1, E2, vom hydrophoben Nichtstrukturprotein p7 und von NS2. Das membrangebundene Enzym Signalpeptidase spaltet die Signalsequenzen im Lumen des ER vom restlichen Polyprotein ab und erzeugt so die reifen pestiviralen Strukturproteine E^{ms}, E1, E2 und ein stabiles E2-p7 Molekül (Rümenapf et al., 1993; Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000). In gereinigten pestiviralen Partikeln konnten disulfid-verbrückte Homodimere von E^{ms} und E2, E1-E2-Heterodimere, E^{ms}-E2-Heterodimere und Core-Protein nachgewiesen werden (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990; Lazar et al., 2003).

3. Einleitung

Im Gegensatz zu den restlichen Strukturproteinen wird der C-Terminus des reifen Core-Proteins zusätzlich durch das zelluläre Enzym Signal Peptidase prozessiert (Heimann et al., 2006). Diese Protease spaltet das Signalpeptid vom C-Terminus des Core-Proteins ab, das erst dann in die viralen Partikel integriert wird. Untersuchungen zur Funktion des Core-Proteins zeigen, dass Core für das „particle assembly“ nicht zwingend erforderlich ist und Core-Deletionsmutanten mit kompensatorischen Mutationen im NS3-Molekül im Zellkultursystem vermehrungsfähig sind. Diese Studien weisen auf eine unbekannte Rolle des Core-Proteins in der Immunevasion hin (Riedel et al., 2010).

Das Glykoprotein E^{ms} („envelope protein – ribonuclease secreted“) besitzt ribonukleolytische Aktivität (Schneider et al., 1993) und wird von infizierten Zellen sezerniert (Rümenapf et al., 1993). Im Vergleich mit anderen Viren wurde eine sezernierte Ribonuklease bislang nur im Genus Pestivirus identifiziert. Gleichzeitig ist E^{ms} als disulfid-verbrücktes Homodimer eng mit den pestiviralen Partikeln assoziiert, ohne dass ein Membrananker identifiziert werden konnte. Wahrscheinlich erfolgt die Membranassoziation des Proteins durch die C-terminale amphipathische α -Helix des Moleküls (Tews et al., 2007). E^{ms} ist sowohl am „particle assembly“ als auch an der „immun evasion“ beteiligt (Frey et al., 2006; Iqbal et al., 2004). Durch Impfung mit E^{ms} konnte eine belastbare Immunität in Versuchstieren erzeugt werden (König et al., 1995). Mutationsanalysen mittels reverser genetischer Systeme belegen, dass die RNase-Aktivität in E^{ms} einen Virulenzfaktor repräsentiert und RNase-inaktive Pestivirus-Mutanten in natürlichen Wirtstieren attenuiert sind (Meyer et al., 2002; Meyers et al., 1999).

Die Funktion des Glykoproteins E1 ist bislang weitgehend unbekannt. Es ist zur Partikelbildung essentiell und durch eine C-terminale Domäne in der Membran des Viruspartikels verankert. In gereinigten Partikeln wurde nur das Disulfid-verbrückte E1-E2-Heterodimer nachgewiesen, wobei angenommen wird, dass E1 darin nicht an der Oberfläche exponiert ist (Weiland et al., 1990). Die alleinige Verimpfung von E1 induziert in Versuchstieren keine belastbare Immunantwort (König et al., 1995).

Das Glykoprotein E2 ist das pestivirale Hauptantigen, das nach Vakzinierung oder überstandener Infektion mit Feldisolaten Schutz vor Erkrankung und Reinfektion induziert (Rümenapf et al., 1991; König et al., 1995). Auch E2 ist durch eine C-terminale Membrandomäne im Viruspartikel verankert. Es wird generell angenommen, dass E2 als viraler Ligand die Bindung an zelluläre Rezeptormoleküle vermittelt (Liang et al., 2003;

3. Einleitung

Roman-Sosa, 2009). Strukturelle Änderungen im E1-E2-Heterodimer sind wahrscheinlich die auslösenden Faktoren für die Fusion von Virus- und Zellmembran während des „virus entry“ (Maurer et al., 2004; Krey et al., 2006).

3.6 Pestivirale Nichtstrukturproteine

Das hydrophobe Protein p7 (bMW: 7 kDa) wird durch N- und C-terminale Spaltungen der Signal-Peptidase freigesetzt. Es weist strukturelle Homologien zu bereits charakterisierten Viroporinen auf (z. B. M2 des Influenzavirus; Pinto et al., 1992) und ist essentiell für die Bildung infektiöser pestiviraler Partikel (Harada et al., 2000). Als Viroporine bezeichnet man kleine virale Transmembran-Proteine, die durch Oligomerisierung in der Membran der Wirtszelle funktionell aktive Ionenkanäle bilden. Viroporine besitzen eine hohe Selektivität für Kationen, stabilisieren zelluläre Membranen und sind essentiell zur Bildung infektiöser Partikel. Das p7 Protein des verwandten HCV wurde bereits näher untersucht. Nach Expression von HCV p7 wurden in Bakterien hexamere Komplexe beobachtet, die funktionell als Kationenkanal charakterisiert werden konnten (Sakai et al., 2003). Dabei konnte die Aktivität von HCV p7 durch die Substanz Amantadin blockiert werden, die bereits lange zuvor als spezifischer Kanalblocker gegen das Viroporin M2 des Influenzavirus beschrieben wurde (Hay et al., 1985).

Die Untersuchung der an der Replikation beteiligten Nichtstrukturproteine des KSPV bildet den Schwerpunkt dieser Arbeit. Alle für die Replikation nötigen pestiviralen Nichtstrukturproteine (NS2, 3, 4A, 4B, 5A und 5B) werden von den 3'-terminalen zwei Dritteln des RNA-Genoms in einer funktionellen Einheit kodiert. Die Prozessierung und Funktion der pestiviralen Nichtstrukturproteine wurde bislang nur bei zytopathogenen BVD-Viren untersucht. Im Vergleich mit nicht-zytopathogenen (nzp) Pestiviren zeigen zytopathogenen (zp) Pestiviren eine beschleunigte RNA-Replikationsrate und gesteigerte Proteinexpression, weshalb sie als Modell-Organismen ausgewählt wurden. Für zp BVDV wurden die pestiviralen Nichtstrukturproteine mittels Antiseren gegen bakteriell exprimierte Polyprotein-Fragmente kartiert (Collett et al., 1988). Nach radioaktiver Markierung wurde die Prozessierung des pestiviralen Polyproteins in zp BVDV infizierten Zellen untersucht (Collett et al., 1991; Meyers et al., 1992). So wurde die Beziehung zwischen hochmolekularen Vorläufermolekülen (NS2-3, NS4-5, NS4A/B und NS5A/B) und den reifen Genprodukten (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B) aufgeklärt. Durch N-terminale Sequenzierung radioaktiv markierter reifer Genprodukte wurden die

3. Einleitung

exakten Spaltstellen im Polyprotein in rekombinanten Expressionssystemen bestimmt (Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997).

Das zelluläre Enzym Signalpeptidase generiert vermutlich den N-Terminus von NS2 durch die proteolytische Abspaltung von p7 (Elbers et al., 1996). Der C-Terminus von NS2 entsteht dagegen durch die autokatalytische Aktivität der NS2-Protease und des zellulären Kofaktors JIV („J-domain protein interacting with viral protein“; Lackner et al., 2006). Die NS2-3 Spaltung erfolgt nur unvollständig, wobei die Effizienz der Spaltung zwischen zytopathogenen und nicht-zytopathogenen Virusisolaten variiert (Lackner et al., 2004). Abgesehen von der NS2-3 Prozessierung konnten dem reifen NS2 Molekül bislang keine Funktionen im pestiviralen Infektions- bzw. Replikationszyklus zugeordnet werden. Dagegen werden unprozessierte NS2-3 Moleküle in BVDV (Agapov et al., 2004) und KSPV (Moulin et al., 2007) zur Bildung infektiöser Partikel benötigt.

Die Aminosäuresequenz des NS3-Proteins ist bei allen Pestiviren hoch konserviert (Meyers et al., 1996 [A]). Im pestiviralen NS3 wurden drei voneinander unabhängige enzymatische Funktionen nachgewiesen. Die Aktivität der NS3-NTPase (Tamura et al., 1993) und NS3-Helikase (Warrener et al., 1995), die in den C-terminalen zwei Dritteln des Moleküls lokalisiert wurden, ist essentiell für die Replikationsfähigkeit der Pestiviren (Grassmann et al., 1999; Gu et al., 2000). Auch die Enzymaktivität der NS3-Protease, die im N-terminalen Drittel des Moleküls lokalisiert wurde (Bazan et al., 1989), ist essentiell für die Replikation. Alle vier Reifungs-Spaltungen im C-terminalen Polyprotein (NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B; Tautz et al., 1997) werden von der chymotrypsin-artigen Serinprotease NS3 katalysiert. Die NS3-NS4A Spaltung erfolgt ausschließlich in *cis*, wobei NS4A als Kofaktor fungiert. Auch für die Spaltungen zwischen NS4A-NS4B, NS4B-NS5A und NS5A-NS5B wird NS4A als Kofaktor benötigt, wobei eine *trans*-Aktivität der NS3 Protease nachgewiesen werden konnte (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997). Die Spaltstellen der pestiviralen NS3 Protease wurden für zp BVDV an den Positionen P1/P1' als L/S (NS3-NS4A, NS4B-NS5A und NS5A-NS5B) bzw. L/A (NS4A-NS4B) bestimmt (Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997). Die Spaltstellen sind unter allen Pestiviren konserviert und dienen daher als Referenz für die anderen Pestivirus-Spezies. Nur im Falle des Border Disease Virus und des Bungowannah-Virus wurden abweichende Sequenzmotive an den homologen Positionen gefunden. Im BDV wurde eine NS5A-NS5B Spaltstelle der Sequenz L/N identifiziert und charakterisiert

3. Einleitung

(Becher et al., 1998). Das „Bungowannah-Virus“ besitzt im Gegensatz zu allen anderen Pestiviren ein L/S Spaltmotiv zwischen NS4A und NS4B (Kirkland et al., 2007).

NS4B ist ein integrales Membranprotein, das für Umstrukturierungen innerhalb der Membranen der Wirtszelle verantwortlich gemacht wird und somit der Kompartimentierung der pestiviralen Replikationskomplexe dienen könnte (Weiskircher et al., 2009). In NS5A wurde eine Zink²⁺-bindende Domäne charakterisiert, die für die Replikation essentiell ist und eine RNA-Bindung vermitteln könnte (Tellinghuisen et al., 2006). Den Proteinen NS4B und NS5A konnte bislang jedoch keine konkrete Funktion in der pestiviralen Replikation zugeordnet werden. NS5B wurde als RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) charakterisiert und die Struktur durch Proteinkristallisation aufgeklärt (Zhong et al., 1998; Choi et al., 2004). Subgenomische RNSs, die ausschließlich die Proteine NS3 bis NS5B kodieren und die authentischen 3' und 5' NTRs beinhalten, können autonom replizieren (Tautz et al., 1999). Mutationsanalysen zeigten, dass NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B an der Replikation beteiligt sind, wobei einzig die *trans*-Komplementierung von NS5A möglich war (Grassmann et al., 2001).

3.7 Nichtstrukturproteine des Hepatitis C Virus

Die Nichtstrukturproteine des Hepatitis C Virus (HCV) zeigen eine den pestiviralen Nichtstrukturproteinen homologe Organisation, Prozessierung, Membrantopologie und enzymatische Funktion (Bartenschlager et al., 1994). Wie bei den Pestiviren werden die ebenfalls als NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B bezeichneten Proteine als funktionelle Einheit im C-Terminus des ORF kodiert. Die NS2-Autoprotease ist aber nicht JIV-abhängig und vermittelt eine vollständige Spaltung zwischen NS2 und NS3 (Schregel et al., 2009). Die Prozessierung der HCV Nichtstrukturproteine NS4A bis NS5B wird von einer homologen NS3-Protease und ihrem Kofaktor NS4A katalysiert (Bartenschlager et al., 1995), wobei deutliche Unterschiede zur Prozessierung bei Pestiviren beschrieben wurden. Untersuchungen zur Kinetik der Nichtstrukturprotein-Prozessierung von HCV in rekombinanten Expressionssystemen zeigten eine kotranslationale Generierung von reifem NS2 und NS3. Auch die NS3 vermittelte Abspaltung von NS5B erfolgt in HCV äußerst effizient. Innerhalb der Nichtstrukturproteine werden relativ stabile NS4A/B-NS5A Vorläufermoleküle beobachtet, die in Pestiviren bislang nicht nachgewiesen werden konnten. Die Halbwertszeit der reifen HCV Nichtstrukturproteine wurde mit 10 bis 16 Stunden angegeben (Pietschmann et al., 2001).

3. Einleitung

3.8 Zielsetzung der Arbeit

Vergleichende Untersuchungen zur Biosynthese der Nichtstrukturproteine in nicht-zytopathogenen und zytopathogenen Pestiviren stehen im Zentrum dieser Arbeit. Als Modell für diese Untersuchungen wurde das als cDNA-Klon vorliegende nicht-zytopathogene KSPV Alfort-Tübingen (p447) und eine auf diesem Klon basierendes zytopathogenes KSPV-JIV (p447-JIV) ausgewählt. Der Biotyp und die Virulenz beider Viren wurden bereits eingehend charakterisiert (Meyers et al., 1996 [B]; Gallei et al., 2008). Die Analysen umfassen außerdem ein als cDNA-Klon vorliegendes zytopathogenes KSPV-Replikon (p1372), das ebenfalls auf dem nzp KSPV Alfort-Tübingen basiert.

Obwohl die Nichtstrukturproteine von zytopathogenen BVD-Viren schon vor über zwanzig Jahren identifiziert wurden und ihre Prozessierung aufgeklärt wurde, blieb die Biosynthese der Nichtstrukturproteine von nicht-zytopathogenen Pestiviren bislang unerforscht. Im Feld werden aber überwiegend nicht-zytopathogene Pestiviren beobachtet, da zytopathogene Pestiviren keine persistenten Infektionen auslösen und sich daher nicht in der Population etablieren können. Nur die Biosynthese von reifem NS3 wurde bislang vergleichend in nzp und zp BVD-Viren mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers untersucht (Lackner et al., 2004). Der Nachweis der anderen pestiviralen Nichtstrukturproteine bereitete erhebliche Schwierigkeiten, da die in begrenzter Menge vorhandenen Antiseren keine eindeutige Detektion ermöglichten. Die Nichtstrukturproteine des Klassischen Schweinepest Virus wurden, abgesehen von NS2-3 und NS3, in infizierten Zellen noch nicht dargestellt.

Die Ziele der hier vorgestellten Untersuchungen sind daher:

1. Expression und Reinigung der KSPV Nichtstrukturproteine in *E. coli*
2. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen rekombinante KSPV Nichtstrukturproteine
3. Identifizierung der reifen Nichtstrukturproteine und ihrer Vorläufermoleküle in KSPV infizierten Zellen
4. Charakterisierung der Nichtstrukturprotein-Prozessierung in nzp KSPV, zp KSPV und einem zp KSPV-Replikon

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
³ H-Leucin	Fa. Amersham
¹⁴ C-Protein-Ladder	Fa. Amersham
³⁵ S-Methionin und -Cystein (ProMix)	Fa. Amersham
Aceton	Fa. Roth
Acridinorange	Fa. Fluka
Acrylamid (reinst)	Fa. Serva
Agar-Agar	Fa. DIFCO
Agarose	Fa. Invitrogen
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Fa. Aldrich
Ampicillin	Fa. Fluka
β-Mercaptoethanol	Fa. Fluka
Bromophenolblau	Fa. Sigma
Calciumchlorid	Fa. Merck
Chloroform	Fa. Fluka
Desoxycholate (DOC)	Fa. Fluka
(Desoxy-) Ribonukleotide	Fa. Boehringer
DMEM ohne M u. C	Fa. Sigma-Aldrich
DMEM ohne M, C, L, I, K u. R	Fa. Sigma-Aldrich
DNS-Ladder (1kb)	Fa. Invitrogen
Essigsäure	Fa. Roth
Ethanol	Fa. Fluka
Ethanolamin	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer
Fetales Kälberserum (FKS)	Fa. PAA
Fluorographie-Lösung (Amplify)	Fa. Amersham
Formaldehyd	Fa. Merck
Glycerin	Fa. Sigma-Aldrich
Glycin	Fa. Fluka
Harnstoff	Fa. US Biochemical
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fa. Sigma-Aldrich

4. Material und Methoden

Isopropanol	Fa. Fluka
Methanol	Fa. Fluka
Magermilchpulver	Fa. DE-VAU-GE
Natriumacetat	Fa. Merck
Natriumhydroxid	Fa. Fluka
Nonidet P 40 Substitut (NP-40s)	Fa. Fluka
Oligonukleotide	Fa. Operon
Orange-G	Fa. Fluka
Paraformaldehyd	Fa. Fluka
Penicillin	Fa. Sigma
Phenol	Fa. Appligene
Phenolrot	Fa. Fluka
Protein-A-Sepharose	Fa. Amersham
Protein-G-Sepharose	Fa. Amersham
Rubidiumchlorid	Fa. Fluka
Serin-Protease-Inhibitor (Pefabloc SC)	Fa. Roche
Schwefelsäure	Fa. Fluka
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fa. ICN
Streptomycin	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Fluka
Tricin	Fa. Roth
Tris	Fa. Roth
Triton X-100	Fa. Fluka
TWEEN 20	Fa. Fluka
His-Proteinase-Inhibitor	Fa. Sigma
H ₂ O (RNAse frei)	Fa. Roth

Weitere Reagenzien und Chemikalien, die für einzelne Experimente verwendet wurden, sind hier nicht im Einzelnen aufgelistet. Sie wurden von den Firmen GIBCO, Fluka, Merck, Serva, Sigma-Aldrich und Roth im Reinheitsgrad p. A. bezogen.

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Sterile Einmalspritzen	Fa. Braun
Filterpapier	Fa. Whatman

4. Material und Methoden

Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Handschuhe (rotiprotect [®] Latex u. Nitril)	Fa. Roth
Kanülen	Fa. Braun
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Nitrocellulosemembran	Fa. Pall
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Röntgenfilme (BioMax MR u. Light)	Fa. Kodak
Ultrafiltrationseinheiten	Fa. Amicon
4.1.3 Geräte	
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Fa. Forma Scientific
Elektroporationsgerät (Gene Pulser II)	Fa. BioRad
Gel-Dokumentationsanlage	Fa. MWG Biotech
Glaswaren	Fa. Schott
Heizblock	Fa. Eppendorf
Kühlwasserbad	Fa. Lauda
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA
Mehrkanal-Pipetten	Fa. Biohit
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop Axiovert	Fa. Zeiss
Konfokales Lasermikroskop (TSC SP5)	Fa. Leica
Lichtmikroskop Eclipse TS 100	Fa. Nikon
Einkanal-Pipette	Fa. Eppendorf, Fa. Gilson
Reinstwasseranlage	Fa. Purolab
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Fa. AGFA
Sequenziergerät LICOR 4000L	Fa. Licor
Schüttler	Fa. Bühler
Spannungsgeräte	Fa. BioRad, Fa. Stratagene
Thermocycler:	
Mastercycler Gradient	Fa. Eppendorf
DNS Thermal Cycler 2400	Fa. Perkin Elmer
Thermoschüttler	Fa. Infors
Vortex	Fa. IKA

4. Material und Methoden

Waagen	Fa. Mettler
Wasserbad	Fa. Braun
Zentrifugen	Fa. Heraeus

4.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fa. Boehringer
Dpn I	Fa. BioLabs
Human placenta ribonuclease inhibitor	Fa. Takara
Pfu DNS-Polymerase	Fa. Stratagene
RNase A	Fa. Alexis
Restriktionsendonucleasen	Fa. BioLabs, Fa. Takara, Fa. Fermentas, Fa. Promega
Sp6 RNS-Polymerase	Fa. Takara
Taq DNS-Polymerase	Fa. BioLabs
T4 DNS-Polymerase	Fa. Takara
T4 Polynukleotidkinase	Fa. BioLabs
Trypsin	Fa. Sigma-Aldrich

4.1.5 Kits

„BCA™ Protein Assay Kit“ zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen	Fa. Pierce
„DNS Gel Extratction Kit“ zur Gewinnung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	Fa. Quiagen
„HiTrap™ Protein A/G HP affinity column“ zur Reinigung von Antikörpern	Fa. Amersham
„HisTrap™ HP affinity column“ zur Reinigung von Proteinen mit Histidin-Tags	Fa. Amersham
„ImmunoPure® Antibody Isotyping Kit I“	Fa. Pierce
„NHS-Trap™ HP affinity column“ zur Immobilisation von Proteinen	Fa. Amersham
„Nukleobond® AX-100™“ Säulen zur Midi-Plasmid-DNS Reinigung aus Bakterien	Fa. Macherey-Nagel
„pGEM®-T Vektor System I“ zur	

4. Material und Methoden

Klonierung von PCR-Fragmenten	Fa. Promega
„QIAquick [®] PCR Purification Kit“ zur Reinigung von PCR-Produkten	Fa. Quiagen
„RNeasy Mini Kit“ zur RNS-Präparation aus eukaryontischen Zellen	Fa. Quiagen
„Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza -dGTP TM “ zur DNS-Sequenzierung	Fa. Amersham
„Ultrafree-DA [®] “ zur Gewinnung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	Fa. Millipore
„Western Lightning TM Chemiluminescence Reagent Plus“ für Immunoblots	Fa. Pierce

4.1.6 Antikörper

4.1.6.1 Primärantikörper

mAk GHN1:	gegen das BVDV Nichtstrukturprotein N ^{P10} gerichteter mAk
mAk GRC1:	gegen das KSPV Strukturprotein Core gerichteter mAk
mAk A18:	gegen das KSPV Strukturprotein E2 gerichteter mAk (Weiland et al., 1990)
mAk 8.12.7:	gegen das KSPV Nichtstrukturprotein NS3 gerichteter mAk (Corapi et al., 1990)
mAk GH4A1:	gegen das KSPV Nichtstrukturprotein NS4A gerichteter mAk
mAk GH4A2:	gegen das KSPV Nichtstrukturprotein NS4A gerichteter mAk
mAk GRS5B1:	gegen das KSPV Nichtstrukturprotein NS5B gerichteter mAk
mAk anti-His	gegen ein Hexa-Histidin-Epitop gerichteter mAk
mAk anti-GST:	gegen Glutathion-S-Transferase gerichteter mAk (Fa. Sigma)

Außerdem wurden Reagenzien gegen die pestiviralen Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4B und NS5A verwendet, deren Herstellung und Charakterisierung Gegenstand der hier präsentierten Untersuchungen ist.

4.1.6.2 Sekundärantikörper

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

4. Material und Methoden

Esel anti Maus IgG, Meerrettich Peroxidase konjugiert,
mit *E. coli* Lysaten präinkubiert

Fa. Dianova

4.1.7 Basis-Plasmide

pEYFP-N1:	Eukaryotisches Expressionsplasmid zur Synthese von N-terminalen YFP-Fusionsproteinen (Fa. Clontech)
pET-11a:	Bakterielles Expressionsplasmid (Fa. Novagen)
pGex-2a:	Derivat von pGex-2T, bakterielles Expressionsplasmid zur Synthese von GST-Fusionsproteinen (Fa. Amersham)
pGEM-T:	Plasmid zur Klonierung von PCR-Produkten der Taq-Polymerase mit A-Überhängen (Fa. Promega)

4.1.8 Pestivirale Genome als cDNS-Klone

p447	KSFV cDNS-Plasmid zur Herstellung von infektiöser RNS genomischer Länge (GenBank J04358). Dieses Plasmid ist ein Derivat des KSFV cDNS-Plasmids pA/CSFV, Stamm Alfort/Tübingen (Meyers et al., 1989 [A]; Meyers et al., 1996 [B])
pNCP7-5A	BVDV cDNS-Plasmid zur Herstellung von infektiöser RNS genomischer Länge. Dieses Plasmid kodiert die RNS-Sequenz des nicht zytopathogenen BVDV-1 Stamms NCP7 (Meyers et al., 1996 [C])
pNADL(ins-)	BVDV cDNS-Plasmid zur Herstellung von infektiöser RNS genomischer Länge. Dieses Plasmid kodiert die RNS-Sequenz des zytopathogenen BVDV-1 Stamms NADL. Die Insertion des zellulären Jiv-Gens im NS2 wurde nachträglich deletiert, so dass man ein phänotypisch nicht zytopathogenes Virus erhält (Mendez et al., 1998)

4.1.9 Pestivirale Replikons als cDNS-Klone

p1372	KSFV-DIP cDNS-Plasmid zur Herstellung von subgenomischer infektiöser RNS. Dieses Plasmid ist ein Derivat des KSFV cDNS-Plasmids p447 mit einer Deletion der Region, die für die Proteine Core, E ^{ms} , E1, E2, p7 und
-------	---

4. Material und Methoden

NS2 kodiert. Zur Verbesserung der Replikation wurden Punktmutationen eingefügt.

4.1.10 Prokaryotische Zellen

<i>E. coli</i> K12-Stamm HB101:	Zur Klonierung und Amplifikation von pestiviralen cDNS-Plasmiden und bakteriellen Expressionsplasmiden
<i>E. coli</i> K12-Stamm DH5 α TM :	Zur Klonierung von PCR-Fragmenten im pGEM-T mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion
<i>E. coli</i> K12-Stamm Rosetta TM :	Zur Proteinexpression bakterieller Expressionsplasmide. Dem Stamm fehlen die Proteasen Lon und ompT. Ein pRARE Plasmid mit Chloramphenicol-Resistenzmarker produziert in Prokaryonten seltene tRNA Spezies.

4.1.11 Eukaryotische Zellen

SK-6 („Swine Kidney 6“)	Institut für Virologie, Giessen
MDBK („Marbin Darby Bovine Kidney“)	ATCC Nr.: CCL-22
Sp2/0-Ag14 (P3X63Ag8 x BALB/c Fusion)	ATCC Nr.: CRL-1581

4.1.12 Virusstämme

KSPV: Stamm Alfort-Tübingen

BVDV-1: Stamm C86, Stamm NADL, Stamm NCP7

BVDV-2: Stamm 890

Alle Virusstämme und -isolate stammen aus der Sammlung des Institutes für Virologie (FB 10, Veterinärmedizin) der Justus-Liebig-Universität.

4.1.13 Medien, Lösungen und Puffer

Lösungsmittel ist Reinstwasser (max. 0,55 μ S/cm bei 25 °C) und Prozentangaben beziehen sich auf Volumenprozent, sofern nichts anderes angegeben ist.)

AEC- Substrat zum Nachweis Peroxidase-gekoppelter Immunglobuline:

4. Material und Methoden

9 ml 50 mM NaAcetat-Lösung pH 5,2; 1 ml Aminoethylcarbazol in Dimethylformamid (4 mg/ml), 5 µl 30 % H₂O₂ in H₂O

Anodenpuffer für SDS-PAGE:

200 mM Tris/HCl, pH 8,9

Coating-Puffer für ELISA:

0,1 M Na₂CO₂ / NaHCO₂, pH 9,5 (700 ml 0,1 M Na₂CO₂ gemischt mit 300 ml 0,1 M NaHCO₂)

Coomassie-Brilliant-Blue R250 für die Färbung von Proteinen in SDS-PAGE:

0,25 % Coomassie-Brillant-Blau R250; 45 % Methanol; 10 % Essigsäure

dNTP-Lösung für PCR:

jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

DMEM mit Zusätzen für die eukaryotische Zellkultur:

DME-Medium aus 4,5 g/l DMEM Pulvermedium (Fa. Gibco):

0,0178 g/l L-Alanin; 0,03 g/l L-Aspartat; 0,07 g/l Glycin; 0,075 g/l L-Glutaminsäure; 0,025 g/l L-Prolin; 0,1 mg/l Biotin; 0,025 g/l Hypoxanthin; 3,7 g/l NaHCO₃

Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin.

Einbettungsmedium für Immunfluoreszenz

6 g Glycerin; 2,4 g Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol, Fa. Sigma); 6 ml H₂O; 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 in H₂O

Ansatz gründlich mischen und für 15 min bei 5.000 g zentrifugieren. Vor Verwendung pro ml Medium 0,1 g DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan, Fa. Fluka) untermischen

Entfärbelösung für SDS-PAGE:

40 % Methanol; 10 % Essigsäure

Fixierlösung für SDS-PAGE:

30 % Methanol; 10 % Essigsäure

4. Material und Methoden

Gelpuffer für SDS-PAGE:

1 M Tris/HCl; 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,45

HAT-Medium:

200 ml DMEM, 100 ml F-10 Supplement (Fa. Gibco), 100 ml F-12 Supplement (Fa. Gibco), 75 ml FKS, 5 ml OPI-Supplement (Fa. Sigma), 10 ml HAT-Supplement (Fa. Sigma), 5 ml L-Glutamin (100 mM), 5 ml HEPES-Lösung (1M), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin

HEPES-Medium für die eukaryotische Zellkultur:

500 ml DMEM-Medium mit 5 ml HEPES-Lösung (100 µl HEPES in 100 ml PBS)

HT-Medium:

200 ml DMEM, 100 ml F-10 Supplement (Fa. Gibco), 100 ml F-12 Supplement (Fa. Gibco), 75 ml FKS, 5 ml OPI-Supplement (Fa. Sigma), 10 ml HT-Supplement (Fa. Sigma), 5 ml L-Glutamin (100 mM), 5 ml HEPES-Lösung (1M), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin

Hungermedium für Radioimmunpräzipitation (RIP):

DMEM ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure (Fa. Sigma). L-Glutamin wird als stabiles Dipeptid supplementiert durch 1 % Glutamax-Konzentrat (Fa. Invitrogen)

Hybridommedium für die Antikörperproduktion:

200 ml DMEM, 100 ml F-10 Supplement (Fa. Gibco), 100 ml F-12 Supplement (Fa. Gibco), 75 ml FKS, 5 ml OPI-Supplement (Fa. Sigma), 5 ml L-Glutamin (100 mM), 5 ml HEPES-Lösung (1M), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin

Kathodenpuffer für SDS-PAGE:

100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS; 100 mM Tris/HCl, pH 8,25

Konservierungslösung für SDS-PAGE:

20 % Ethanol, 10 % Glycerin

LB-Medium für die Flüssigkultur von Bakterien:

4. Material und Methoden

1 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; mit NaOH auf pH 7,5

LB-Medium mit Zusätzen für die Herstellung kompetenter Bakterien:

LB-Medium; 20 mM MgSO₄; 10 mM KCl

Myelomzell-Medium für die Kultur von Sp2/0-Ag14-Zellen:

425 ml DMEM-Medium, 75 ml FKS, 5 ml L-Glutamin (100 mM), 1,75 ml β-Mercaptoethanol-Lösung (100 µl β-Mercaptoethanol in 100 ml PBS), 5 ml HEPES-Lösung (1 M), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin

4 %ige Paraformaldehydlösung zur Fixierung von Zellen:

4 % Paraformaldehyd (w/v) in PBS defiz.

Die Suspension wird auf 50 °C erhitzt und unter Rühren 1 M NaOH tropfenweise klar titriert

PBS defiz.:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; mit HCl auf pH 7,4

PBS:

0,49 mM MgCl₂; 0,68 mM CaCl₂ in PBS defiz.

PBS_{Tween} für Immun-Nachweisverfahren:

0,1 % Tween-20 in PBS

Ponceau-Rot Färbelösung für Western Blots:

0,5 % (w/v) Ponceau S, 1 % Essigsäure

6xProbenpuffer für DNS/RNS-Agarosegel-Elektrophorese:

0,1 % (w/v) Orange-G; 30 % Glycerin

Puffer für Plasmid-DNS-Präparation:

P1: 10 mM EDTA; 100 mg/l RNase A; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

P2: 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

P3: 2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1

N2: 100 mM Tris; 900 mM KCl; 15 % Ethanol; mit H₃PO₄ auf pH 6,3

4. Material und Methoden

N3: 100 mM Tris; 1150 mM KCl; 15 % Ethanol; mit H₃PO₄ auf pH 6,3

N5: 100 mM Tris; 1 M KCl; 15 % Ethanol; mit H₃PO₄ auf pH 8,5

Puffer für Ni²⁺-Affinitätschromatographie:

Lysispuffer: 1 % Triton-X 100, 300 mM NaCl, 50 mM Na₃PO₄, 20 mM Imidazol, pH 7,9

Puffer A: 300 mM NaCl, 50 mM Na₃PO₄, pH 7,9

Puffer B: 500 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na₃PO₄, pH 7,9

8 M Harnstoff-Puffer A: 8 M Harnstoff in Puffer A

8 M Harnstoff-Puffer B: 8 M Harnstoff in Puffer B

6 M Guanidiniumchlorid-Puffer A: 6 M Guanidiniumchlorid in Puffer A

6 M Guanidiniumchlorid-Puffer B: 6 M Guanidiniumchlorid in Puffer B

RIPA-Puffer für Immunpräzipitation:

150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % (w/v) Desoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

RIPA-SDS-Puffer:

RIPA-Puffer mit 2 % SDS (w/v)

SDS-Gel Probenpuffer:

2 % (w/v) SDS; 6 M Harnstoff; 10 % Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

TAE-Puffer für DNS-Agarosegel-Elektrophorese:

2 % modifiziertes TAE-Puffer-Konzentrat (Fa. Millipore), entsprechend: 2 M Tris; 150 mM EDTA; 1M Essigsäure; 187,5 µg/l Ethidiumbromid, pH 8,0

TfB-Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien:

TfB1: 30 mM K-Acetat; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15 % Glycerin; mit Essigsäure auf pH 5,8

TfB2: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15 % Glycerin; mit KOH auf pH 6,5

Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB-Substrat) für ELISA:

9 ml TMB-Puffer (100 mM Na-Acetat), 1 ml TMB-Lösung (10 mg TMB [Fa. AppliChem] in 4 ml DMSO), 1,5 µl H₂O₂

4. Material und Methoden

Trypsin-Lösung:

2,5 g/l Trypsin; 16 mg/l Phenolrot; 3,3 mM EDTA in PBS

Western-Blot-Puffer für Nassblot:

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % Methanol; 0,037 % (w/v) SDS

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit DNS und RNS

4.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Als Kompetenz bezeichnet man die Fähigkeit von Bakterien, extrazelluläre DNS aufzunehmen. *E. coli* lassen sich natürlicherweise nur sehr ineffektiv mit frei vorliegender Plasmid-DNS transformieren. Kompetente *E. coli* Bakterien können jedoch durch Behandlung mit verschiedenen Reagenzien künstlich erzeugt werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme wurden vor der Transformation nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983) behandelt. Eine Einzelkolonie wurde zu diesem Zweck in 2,5 ml Medium als Übernachtskultur bei 37°C unter Schütteln angezogen. Mit dieser Kultur wurden 250 ml LB-Medium (1 % [w/v] Bacto-Trypton; 0,5 % [w/v] Hefeextrakt; 0,5 % [w/v] NaCl; mit NaOH auf pH 7,5) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 im Schüttler inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde bei 3939 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet in 100 ml kaltem Tfb 1 (30 mM K-Acetat; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15 % [v/v] Glycerin; mit Essigsäure auf pH 5,8) resuspendiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem erneuten Zentrifugieren der Bakterien (s.o.) wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem Tfb 2 (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15 % [v/v] Glycerin; mit KOH auf pH 6,5) aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden zur Lagerung in 250µl Aliquoten bei -70°C eingefroren.

4.2.1.2 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Danach wurden ca. 50 ng Plasmid-DNS (aber maximal 10 µl DNS-Lösung) bzw. 10 µl Plasmid-Ligationsansatz auf Eis gekühlt, mit 50 µl der Suspension kompetenter *E. coli* K12 Stamm HB101 überschichtet und für 20 min auf Eis inkubiert. Bei 37°C wurden die Bakterien für 1,5 min einem Hitzschock ausgesetzt, erneut für 3 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 250 µl ampicillinfreiem LB-Medium versetzt. Dieser Transformationsansatz wurde für 20 min bei 37°C geschüttelt und auf ampicillinhaltige LB-Platten ausgestrichen. Die Platten

4. Material und Methoden

wurden bei 37°C für 12-24 h bebrütet. Einzelkolonien wurden zum Animpfen von klonalen Bakterienkulturen verwendet.

4.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterien

Alle Medien und Gerätschaften, die für die DNS-Präparation verwendet wurden, wurden vor der Verwendung autoklaviert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide beinhalteten ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 25-50 µg/ml Ampicillin zu den Nährmedien nach den transformierten Plasmiden selektiert. Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5 % Agar-Agar zum LB-Medium hergestellt. Die Anzucht aller Bakterien erfolgte im Inkubator bei 37°C, wobei Flüssigkulturen mit etwa 200 rpm geschwenkt wurden.

Die Gewinnung von kleinen DNS-Quantitäten (Mini-Präp. bis 10 µg) zu analytischen Zwecken erfolgte durch alkalische Lyse der Bakterienzellen und anschließender Präzipitation der Plasmid-DNS (Birnboim et al., 1979). Mit einer Einzelkolonie wurden 2,5 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 bei 37°C im Schüttler bebrütet. 2 ml der Kultur wurden bei etwa 10.000 g für 2-3 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in 200 µl kaltem P1 (10 mM EDTA; 100 mg/l RNase A; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 200 µl P2 (200 mM NaOH; 1 % [w/v] SDS) vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl P3 (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) und gründlichem Vortexen wurde die Lösung 5 min bei 10.000 g zentrifugiert, um SDS, chromosomale DNS und bakterielle Proteine von der in der wässrigen Phase gelösten Plasmid-DNS abzuscheiden. Aus den 600 µl Überstand der Zentrifugation wurde die Plasmid-DNS nach Überführung in ein frisches Eppendorf-Gefäß durch Vermischung mit 500 µl Isopropanol präzipitiert. Durch Zentrifugation bei 10.000 g für 3 min wurde die DNS als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes abgeschieden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch vorsichtige Überschichtung mit 150 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Entfernung der Ethanollösung wurde die DNS für eine Minute bei 37°C an der Luft getrocknet und danach in 25 µl H₂O bidest unter Schütteln gelöst.

Größere Mengen Plasmid-DNS zur Lagerung oder weiteren Verwendung wurden durch Anionen-Austausch-Chromatographie isoliert (Midi-Präp. bis 200 µg). Mit einer Einzelkolonie wurde dazu eine Flüssigkultur von 50 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C im Schüttler bebrütet. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 wurden die Zellen durch Zentrifugation mit

4. Material und Methoden

3939 g für 10 min bei 4°C in einem 50 ml Blue-Cap geerntet. Die Bakterien wurden in 5 ml P1 resuspendiert und durch Vermischung mit 5 ml P2 für 5 min bei RT lysiert. Nach Zugabe von 5 ml P3 wurde die Lösung gründlich durchmischt und mit 3939 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Eine Nukleobond® AX-100™ Anionen-Austausch-Chromatographie-Säule der Firma Macherey-Nagel wurde mit 2,5 ml N2 (100 mM Tris; 900 mM KCl; 15 % Ethanol; mit H₃PO₄ auf pH 6,3) äquilibriert. Daraufhin wurde der Überstand der Bakterienlysis über die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 20 ml N3 (100 mM Tris; 1150 mM KCl; 15 % Ethanol; mit H₃PO₄ auf pH 6,3) gewaschen und mit 3 ml N5 (100 mM Tris; 1 M KCl; 15 % Ethanol; mit H₃PO₄ auf pH 8,5) eluiert. Die Plasmid-DNS wurde durch Vermischung des Eluates mit 2,1 ml Isopropanol in einem 15 ml Blue-Cap aus der Lösung gefällt und durch Zentrifugation (3939 g, 5 min, 4°C) am Boden des Reaktionsgefäßes abgeschieden. Durch Überschichtung mit 300 µl 70%igem (v/v) Ethanol wurde das DNS-Pellet gewaschen, der Überstand wieder vorsichtig abgenommen und das Pellet 5 min bei RT bei geöffnetem Deckel getrocknet. Die Plasmid-DNS wurde schließlich in 50 µl H₂O bidest unter Schütteln gelöst.

4.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS

Die Konzentration verdünnter DNS- und RNS-Lösungen wurde durch die UV-Licht Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNS, photometrisch bestimmt werden. Eine Lösung von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS oder 40 µg/ml einzelsträngiger RNS zeigt bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter eine OD₂₆₀ von 1. Die Absorption verhält sich in schwach konzentrierten Lösungen linear zur DNS-Konzentration der Lösung. DNS-Lösungen wurden dazu in einem Volumen von 150 µl H₂O bidest im Verhältnis 1:100 verdünnt. Mit dem Phosphospektrophotometer GeneQuant II (Fa. Pharmacia) wurde in einer Quarzglas-Küvette jeweils zuerst die OD₂₆₀ des Lösungsmittels als Referenzwert bestimmt. Daraufhin wurde die zu bestimmende Lösung in dieselbe Küvette pipettiert und ihre OD₂₆₀ gemessen. Die Konzentration der DNS- bzw. RNS-Lösungen wurde schließlich durch Multiplikation ihrer OD₂₆₀ mit dem Faktor 50 bzw. 40 unter Berücksichtigung der Verdünnung kalkuliert.

4.2.1.5 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNS und RNS

Zur Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet (Chomczynski et al., 1987). Ein Volumen der nukleinsäurehaltigen Lösung wurde dazu mit je 0,6 Volumen Phenol und 0,6 Volumen Chloroform vermischt. Nach gründlichem Vortexen wurde die Lösung durch Zentrifugation

4. Material und Methoden

bei 10.000 g für 1 min bei RT in zwei verschiedene Phasen aufgetrennt. Die wässrige Oberphase enthält die Nukleinsäuren, die sich vor allem an der Phasengrenze ansammeln. In der chloroformhaltigen Unterphase ist ein Großteil der Proteine gelöst. Deshalb wurde zur DNS-Extraktion die obere Phase vollständig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.

4.2.1.6 Präzipitation von DNS mit Ethanol

Nukleinsäuren wurden aus wässrigen Lösungen mit Ethanol und Natrium-Acetat gefällt. Zur Präzipitation wurde die Lösung mit 2,5 Volumen 100%igem Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natrium-Acetat-Lösung versetzt und gründlich durchmischt. Durch Zentrifugation bei 10.000 g für 3 min (bis 2 ml) bzw. 3939 g für 10 min (ab 2 ml) wurde die DNS am Boden des Reaktionsgefäßes abgeschieden. Danach wurde das Pellet mit 150 µl 70%igem Ethanol überschichtet. Die Ethanollösung wurde vorsichtig abgenommen und das DNS-Pellet 5 min bei 37°C getrocknet.

4.2.1.7 Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken

In vielen Prokaryonten dienen sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen der Klasse II dem Schutz vor Fremd-DNS. Diese Enzyme spalten zum Beispiel nach einer Bakteriophagen-Infektion die DNS der Viren in unschädliche Fragmente. Gleichzeitig werden zelleigene DNS-Sequenzen durch sekundäre Modifikationen, wie Methylierungen vor dem Abbau durch diese Endonukleasen geschützt. Methylasen und Endonukleasen mit der gleichen Zielsequenz bilden ein sogenanntes Restriktions-Modifikations-System. Viele verschiedene Restriktionsendonukleasen werden von kommerziellen Anbietern für molekularbiologische Arbeiten angeboten.

In dieser Arbeit wurde der Verdau von DNS mit Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken und für Klonierungszwecke eingesetzt. Die verwendeten Enzyme spalten doppelsträngige DNS an spezifischen Erkennungssequenzen. Die Reaktionsbedingungen für die Enzyme wurden nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers gestaltet. Als Puffersysteme wurden enzyspezifische Puffer der Hersteller und für den Doppelverdau vor allem OPA-Puffer (Fa. Amersham) und Neb-Puffer 1-4 (Fa. BioLabs) mit oder ohne 1 % (v/v) BSA-Zusatz verwendet. Zu hohe Enzym-Konzentrationen, ungeeignete Puffersysteme und zu lange Inkubationszeiten wurden dabei vermieden, um keine unspezifische Endonuklease-Aktivität der Enzyme (Star-Aktivität) zu provozieren.

4. Material und Methoden

Für analytische Zwecke wurde jeweils 1 µl von Mini-DNS-Präparationen bzw. 200 ng gereinigter Plasmid-DNS aus Midi-Präparationen mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Analytische Verdauansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl gepuffertem H₂O unter Zugabe von 0,05 bis 0,25 µl Enzymlösung (abhängig von den enthaltenen Units pro µl) 60 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung und UV-Durchleuchtung.

DNS-Fragmente, die für Klonierungen verwendet werden sollten, wurden durch DNS-Verdau im präparativen Maßstab gewonnen. 1 µg gereinigter Plasmid-DNS aus Midi-Präparation wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl gepuffertem H₂O unter Zugabe von 0,25 bis 1,0 µl Enzymlösung (abhängig von den enthaltenen Units pro µl) 60 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Bei allen Klonierungen wurden nach Möglichkeit zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme ausgewählt, die an den Schnittstellen 3'- bzw. 5'-Überhänge erzeugten, so dass Fragmente generiert wurden, die beidseitig „sticky-end“ zusammenpassten und, in einer Orientierung, gerichtet integriert werden konnten. Bei dieser Vorgehensweise konnten außerdem unerwünschte intramolekulare Rück-Ligationen der Vektor-DNS-Fragmente reduziert werden. Wenn solche kompatiblen Schnittstellen in den Plasmiden fehlten, wurden sie per PCR im Insert- bzw. Vektor-DNS-Fragment generiert. Wenn auch dies nicht möglich war, wurde mit Enzymen gearbeitet, die nach dem Verdau glatte DNS-Enden (blunt-end) hinterlassen. Die Fragmente der geschnittenen DNS-Plasmide wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Durch Ethidiumbromid-Färbung wurden die erwünschten DNS-Fragmente unter UV-Durchleuchtung (312 nm) im Gel identifiziert und mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten.

Aus Schnittstellen mit Überhängen wurden auch künstlich glatte Enden generiert, indem durch Zugabe von 0,5 µl Klenow-Fragment (großes Fragment der DNS-Polymerase I, T₄-DNS-Polymerase, Fa. BioLabs) und je 1 µl dNTPs zu dem Verdau-Ansatz Überhänge in 5'→3'-Richtung aufgefüllt und 3'-Überhänge abgebaut wurden. Die Inkubation erfolgte dabei nach dem Verdau für 30 min bei 37° C. Vor dem Verdau mit einem zweiten Enzym musste das Klenow-Fragment durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt werden.

4.2.1.8 Agarosegel-Elektrophorese von DNS und RNS

Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und lässt sich dann im UV-Licht (hier 254 oder 312 nm) zu einer spezifischen Fluoreszenz anregen. Der hier verwendete Tris-Acetat-EDTA-

4. Material und Methoden

Laufpuffer (2 M Tris; 150 mM EDTA; 1M Essigsäure; 187,5 µg/l Ethidiumbromid, pH 8,0) wurde mit einem modifizierten TAE-Puffer-Konzentrat (50xTAE-Puffer, Fa. Millipore) und Reinstwasser hergestellt und mit 15 µl/l 1 %iger Ethidiumbromidlösung (187,5 µg/l) versetzt. Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden standardmäßig 0,8 %ige Agarosegele (w/v) verwendet. Zur Herstellung der Agaroselösung wurden 3,2 g Agarose mit 400 ml Laufpuffer vermischt. Die Lösung wurde so lange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war, unter Rühren langsam wieder abgekühlt und dann bei 55°C bis zur Verwendung gelagert. Die Gele wurden in Formen gegossen, in die ein Kamm eingesteckt wurde. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6xLadepuffer (0,1 % [w/v] Orange-G; 30 % Glycerin) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden jeweils parallel 5 µl eines 1kb-DNS-Ladders als Größenstandard mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte horizontal im 1xTAE-Laufpuffer bei konstanter Spannung (Feldstärke 4-8 V/cm). Zur Analyse oder Gewinnung der DNS-Fragmente wurde das Gel auf einen Transilluminator verbracht. Zur Vermeidung von Strangbrüchen wurde die DNS dabei im UV-Durchlicht bei 312 nm Wellenlänge betrachtet. Die Nukleinsäurefragmente konnten durch die Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids optisch wahrgenommen, photographisch dokumentiert und aus dem Gel ausgeschnitten werden.

4.2.1.9 Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Präparationen von DNS-Fragmenten für Klonierungszwecke wurden durch Verdau von Plasmid-DNS im präparativen Maßstab gewonnen. Nach 1 h Inkubation wurde die Vollständigkeit des Verdau durch Agarosegel-Elektrophorese eines Aliquots überprüft. Das DNS-Zielfragment wurde durch Agarosegel-Elektrophorese von ungeschnittener Plasmid-DNS und anderen DNS-Fragmenten getrennt. Anhand des Längenstandards wurde das betreffende Fragment als Bande im Gel auf einem Transilluminator identifiziert und mit einer Skalpellklinge herausgetrennt. Zur Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen wurden 2 verschiedene Kits verwendet:

„Ultrafree-DA[®]-Säulen“ wurden zur Reinigung von DNS-Fragmenten von 100-10.000 Basenpaaren genutzt. Das Gel-Fragment wurde hierzu auf die Säule („gel nebulizer“) aufgebracht und für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Die festen Agaroseanteile des Gels wurden zurückgehalten und ein Filtrat gewonnen. Das Filtrat bestand aus der im Gelpuffer gelösten DNS, die für Klonierungen genutzt werden konnte.

4. Material und Methoden

Das „DNS Gel Extraction kit“ wurde bei der Aufreinigung größerer DNS-Fragmente genutzt, da Salze, EDTA und andere Substanzen, die Aktivität der Ligase hemmen und durch diese chromatographische Reinigung ausgeschlossen werden konnten. Die DNS wurde, nachdem das Agarosegel bei 50°C in einer speziellen Pufferlösung aufgeschmolzen worden war, an eine Anionen-Austauschromatographie-Säule gebunden. Nach einem Waschschrift konnte die DNS dann mittels H₂O von der Säule eluiert werden.

4.2.1.9 Ligation von DNS-Fragmenten

Zur *in-vitro*-Ligation wurden aufgereinigte DNS-Fragmente mit T4-DNS-Ligase (350 U/μl, TaKaRa) inkubiert. Dieses Enzym katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3'-OH mit der 5'-PO₄-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNS und bildet unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiester-Bindung.

Nach Restriktionsenzym-Verdau, Agarosegel-Elektrophorese und Reinigung wurde die Konzentration der zu ligierenden DNS-Fragmente durch erneute Agarosegel-Elektrophorese optisch bestimmt. Vektor- und Insertfragment wurden in der Reaktion im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Im Regelfall wurden 1 μl Vektor-DNS-Lösung mit 3 μl Insert-DNS-Lösung in 4,5 μl H₂O gemischt und mit 0,5 μl Enzymlösung und 1 μl 10xLigasepuffer versetzt. Zu jeder Ligation wurde parallel eine Religations-Kontrolle angesetzt. Bis auf die Insert-DNS-Lösung, die durch 3 μl H₂O ersetzt wurde, enthielt die Kontroll-Reaktion die gleichen Reagenzien wie die Ligation. Diese Kontroll-Reaktion diente zur Abschätzung der Effizienz des Insert-Einbaus im Vergleich zu unerwünschten intramolekularen Religationen.

Um intramolekulare Ligationen des Vektor-Fragments ohne Einbau des Insert-Fragments zu verhindern, wurden Vektor-DNS-Fragmente bei Bedarf dephosphoryliert. Dies war besonders bei Ligationen von glatten DNS-Enden und bidirektional kompatiblen DNS-Überhängen nötig. Das über Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigte Vektor-DNS-Fragment wurde dazu in Antarktika-Phosphatase-Puffer aufgenommen, mit 1 μl Antarktika-Phosphatase versetzt und für eine Stunde bei 37° C verdaut. Nach dem Verdau wurde das Enzym durch Hitzeeinwirkung bei 60° C für 30 min inaktiviert, bevor die DNS in Klonierungen eingesetzt wurde.

Template-Plasmide, die in PCR-Reaktionen als Matrize gedient hatten, wurden selektiv durch enzymatischen Abbau nach Abschluss der PCR aus den Ansätzen eliminiert. Zu diesem Zweck wurden 10 μl der PCR bei 37° C für eine Stunde mit 1 μl Dpn I (10 U/μl) inkubiert.

4. Material und Methoden

Dieses Enzym kann nur bakterielle methylierte DNS, nicht aber *in vitro* hergestellte unmethylierte PCR-Produkte, spalten. Dadurch ist es möglich, die in Bakterien (*E. coli*) synthetisierten DNS-Plasmide, die in der PCR als Template bzw. Matrize (Vorlage) eingesetzt wurden, spezifisch zu zerstören. Lineare DNS-Fragmente, die per PCR generiert worden waren, wurden mit Hilfe der T4-DNS-Ligase zu einem Plasmid zirkularisiert. Anschließend wurden durch 1 h Inkubation bei 37° C die 5'-Enden der doppelsträngigen PCR-Produkte durch Zugabe von 0,5 µl Polynukleotidkinase und 2 µl 10 mmol ATP-Lösung phosphoryliert. Das gewünschte PCR-Fragment wurde durch Agarosegel-Elektrophorese identifiziert, aus dem Gel extrahiert und gereinigt. In einem 10 µl Ansatz wurden 3 µl der PCR-Fragment-Lösung mit 0,5 µl T4-DNS-Ligase und 1 µl 10xLigasepuffer zirkularisiert.

4.2.1.11 PCR, RT-PCR und Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die selektive, sequenzspezifische, enzymatisch katalysierte Amplifikation von synthetischer DNS an einer Matrize (Vorlage). Mit dieser Methode können selbst sehr geringe Mengen eines Template-DNS-Stranges vervielfältigt werden. Die Selektivität der Reaktion und die Größe des Produktes wird durch die Bindung von zwei Oligonukleotiden bestimmt, die den Startpunkt der DNS-Polymerase bilden („primer“). DNS-Polymerasen können Oligonukleotide nur in 5'→3'-Richtung verlängern, so dass die zwei Oligonukleotide das gewünschte Produkt einrahmen müssen. Das als Plusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid ist dabei komplementär zu einem Sequenzabschnitt auf dem antiparallelen DNS-Strang, während das als Minusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden DNS-Strang ist. Durch Erhitzen auf 95 °C wird der DNS-Doppelstrang denaturiert, wobei die Basenpaarungen zwischen den komplementären Strängen gelöst werden. Beim Absenken der Temperatur lagern sich dann die Primer, die im molaren Überschuss vorliegen, an die komplementären DNS-Sequenzen der Matrize an. Dieser Prozess wird als Annealing oder Hybridisierung bezeichnet, wobei die geeignete Annealing-Temperatur von der spezifischen Schmelztemperatur des Oligonukleotides abhängt. Nach dem Annealing wird die Temperatur wieder erhöht, um die Elongation der Primer durch die Katalyse einer hitzebeständigen DNS-Polymerase in 5'→3' Richtung zu ermöglichen, deren Reaktionsoptimum bei 72 °C liegt. Die Dauer dieses Syntheseschritts ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-Fragments. Durch mehrfache Wiederholung dieser Zyklen wird eine exponentielle Vervielfachung des gewünschten DNS-Fragments erreicht (Saiki et al., 1985).

4. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden zwei DNS-Polymerasen verwendet. Die Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* ist sehr sensitiv und robust. Die DNS-Amplifikation mittels Taq-Polymerase ist aber recht ungenau, da das Enzym keine „Proof-reading“-Funktion besitzt. In den amplifizierten DNS-Fragmenten befinden sich deshalb häufig Mutationen, die durch Synthesefehler am Matrizenstrang entstanden sind. Außerdem hängt die Taq-Polymerase nach dem Ende der Matrizen gestützten Elongationsreaktion an den neu synthetisierten DNS-Strang ein Adenin an. Dieser 3'-A-Überhang kann zur Klonierung genutzt werden. Wenn sequenzexakte DNS-Amplifikate benötigt wurden, zum Beispiel bei der Mutagenese von Plasmiden, wurde Pfu-Polymerase von Bakterium *Pyrococcus furiosus* eingesetzt. Dieses Enzym besitzt eine „Proof-reading“-Funktion und produziert DNS-Fragmente mit „blunt-ends“.

Das Design der Oligonukleotide wurde mit Hilfe des PC-Programmes „DNS-StriderTM“ für Macintosh durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikation zu gewährleisten. Dabei wurden auch Programmfunktionen zum Auffinden von Restriktionsenzym-Schnittstellen („map“), zum Design komplementärer Sequenzen („3' ← 5' DNS“), zum Auffinden von offenen Leserastern („ORF“) und zur Translation der Sequenzen („3-frame“) genutzt.

An den 5'-Enden der Primer können beliebige Sequenzen angefügt werden, die nicht homolog zur Matrize sind, da der Primer am 3'-Ende verlängert wird. Daher kann man beide Enden des PCR-Produktes mit Hilfe der Primer modifizieren. An den Enden von PCR-Produkten können zum Beispiel Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen angefügt werden, die nach enzymatischem Verdau eine Klonierung in kompatible Restriktions-Schnittstellen bakterieller Plasmide ermöglichen. Außerdem kann die Sequenz eines bakteriellen Plasmids durch klassische PCR modifiziert werden, indem das komplette Plasmid amplifiziert und die Sequenzänderung durch nicht homologe 5'-Enden der aneinandergrenzenden Primer erreicht wird.

Präparative PCRs zu Klonierungszwecken wurden im 50 µl Maßstab angesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten dabei 30-50 ng einer Template-DNS, die als Matrize fungierte. Außerdem wurden 20 pmol von beiden Primern (0,2 µl einer 100 µM Lösung), jeweils 10 nmol dATP, dGTP, dCTP und dTTP (1 µl einer jeweils 10 mM Lösung der Desoxyribonukleotide), 5 µl eines 10xPuffers und 1 µl Taq- bzw. Pfu-Polymerase (5 U/µl bzw. 3 U/µl) mit H₂Odd zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Dieser

4. Material und Methoden

Reaktionsansatz wurde kurz gevortext und in einem PCR-Tube im Thermocycler inkubiert. Auf eine initiale Denaturierung für 5 min bei 94 °C folgten 25 bis 35 Reaktionszyklen aus Denaturierung (30 s bei 94 °C), Hybridisierung (30 s bis 1 min bei 53-65 °C) und Elongation (1-2 min pro kb Produkt bei 72 °C). Im letzten Zyklus wurde die Elongationsdauer um 7 min verlängert, um möglichst vollständige Syntheseprodukte zu erzeugen. Anschließend kühlte der Thermocycler den Reaktionsansatz auf 4 °C ab. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden solche PCR-Ansätze im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Zur langfristigen Lagerung wurden PCR-Ansätze im Tiefkühlschrank bei -20 °C eingefroren.

Die PCR wurde in dieser Arbeit genutzt, um virale Proteinsequenzen in bakterielle Expressionsvektoren einzufügen. Außerdem wurden in bakteriellen Expressionsplasmiden und in KSPV cDNS-Plasmiden Sequenzen von Polyhistidin-Tags, Epitop-Tags (z. B. flag-Epitop) und Enzym-Tags (z. B. GST) an Proteinsequenzen fusioniert, um die Proteine zu markieren oder zu reinigen. Soweit möglich wurden dabei die Enden der PCR-Produkte so gestaltet, dass der spätere Einbau in die Plasmide durch Restriktionsenzym-Schnittstellen erfolgen konnte. Dabei wurde besonders darauf geachtet, die Aminosäuresequenz der kodierten Proteine nicht zu verändern.

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde in dieser Arbeit genutzt, um zu überprüfen, ob im reversen genetischen System eingeführte Mutationen vom Virus toleriert wurden. Nach Transfektion rekombinanter viraler RNS in eukaryotische Zellen wurde zuerst die Replikation anhand der Expression viraler Proteine mittels indirekter Immun-Peroxidase-Reaktion überprüft. Der Zellkulturüberstand wurde zur Infektion frischer Zellen genutzt. Nach mehreren Passagen wurde dann die Sequenz der rekombinanten Viren überprüft. Zu diesem Zweck wurde die gesamte RNS aus infizierten Zellen mit dem RNeasy-Kit (Fa. Qiagen) aufgereinigt. Für die RT-PCR wurde in einer Startreaktion zuerst der reverse Primer an die RNS angelagert. 5 µg Gesamtzell-RNS und 50 pmol des Primers wurden mit RNase freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt. Dieser „Startmix“ wurde im Thermocycler für 2 min auf 94 °C, für 2 min auf 56 °C und für 2 min auf 42 °C inkubiert, bevor der „RT-Mix“ hinzugefügt wurde (4 µl 5xSuperscript-Buffer, 0,5 µl Superscript II reverse Transkriptase, 1 µl RNase Inhibitor, 1 µl NTP-Mix, 3,5 µl H₂O). Zur reversen Transkription wurde der gesamte Ansatz für weitere 60 min bei 42 °C inkubiert. Ein 1 µl dieses Ansatzes wurde in der darauf folgenden PCR als Template eingesetzt. Die PCR wurde

4. Material und Methoden

nach dem oben aufgeführten Protokoll durchgeführt, wobei als Enzym Taq-Polymerase verwendet wurde.

Die Produkte der PCRs wurden durch Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid unter UV-Durchlicht analysiert, als Gel-Bande ausgeschnitten und gereinigt. Aus PCR-Produkten, die zur Klonierung verwendet werden sollten, wurden vor dem enzymatischen Verdau die PCR-Primer mit einem PCR-Produkt-Reinigungs-kit (PCR Purification Kit; Fa. Qiagen) entfernt, falls diese Restriktionsenzym-Schnittstellen enthielten. Nach dem Verdau wurden dann die spezifischen Endprodukte durch Agarosegel-Elektrophorese gereinigt und zur Klonierung eingesetzt. In einigen Fällen wurden PCR-Produkte ohne Restriktions-Sites mit Hilfe des Enzyms T4 Polynukleotid-Kinase (Fa. BioLabs) phosphoryliert. Der gesamte PCR-Ansatz wurde hierzu mit 1 μ l T4 PNK und 5 μ l ATP (10 mM) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Reinigung durch Agarosegel-Elektrophorese konnten so lineare PCR-Produkte zu zirkulären Plasmiden ligiert oder als Blunt-End-Fragmente in Vektoren integriert werden.

Zur Sequenzanalyse und zur Amplifikation wurden PCR-Produkte der Taq-Polymerase in einen linearen kommerziellen Vektor mit T-Überhängen ligiert (pGEM[®]-T Vektor System I, Fa. Promega). 3 μ l eines gereinigten PCR-Ansatzes (QIAquick[®] PCR Purification Kit, Fa. Qiagen) bzw. 3 μ l eines durch Agarosegel-Elektrophorese als Bande gereinigten PCR-Produktes (DNS Gel Extraktion Kit, Fa. Qiagen), jeweils in 30 μ l H₂O von der Säule eluiert, wurden mit 0,5 μ l pGEM-Vektor-Lösung (54 ng/ μ l), 5 μ l eines 2-fach Puffers und 1 μ l T4 DNS-Ligase (35 U/ μ l) gemischt und für 1 bis 2 h bei RT inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde dann auf Eis gekühlt. Zur Transformation wurde der Ansatz mit 50 μ l einer auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension kompetenter *E. coli* (K12, Stamm DH5 α TM) überschichtet und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1,5 min wurden die Bakterien für 3 min auf Eis abgekühlt, bevor sie in 250 μ l ampicillinfreiem LB-Medium aufgenommen wurden. Nachdem der Transformationsansatz für 20 min bei 37 °C geschüttelt worden war, wurden die Bakterien auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen. Für eine Blau-Weiß-Selektion (α -Komplementation) wurde die ampicillinhaltige LB-Agarplatte vor dem Ausplattieren der Bakterien mit 20 μ l einer 4 %igen (w/v) X-Gal-Lösung und 10 μ l einer 1 M IPTG-Lösung, die in 100 μ l LB-Medium aufgenommen wurden, bestrichen. *E. coli* (K12, Stamm DH5 α TM) bilden zusammen mit pGEM[®]-T-Plasmiden, die kein PCR-Produkt am T-Überhang integriert haben, eine funktionsfähige β -Galactosidase, so dass sie X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzen und sich solche Kolonien blau färben. Da

4. Material und Methoden

der C-Terminus des α -Donors vor und der N-Terminus nach der Klonierungsstelle des Plasmids (pGEM-T-Plasmid) kodiert ist, führt eine inserierte Fremd-DNS in aller Regel zu einem frame-shift oder zumindest zu einer Kettenverlängerung, so dass kein funktionsfähiger α -Donor und somit keine funktionsfähige β -Galactosidase entstehen kann und rekombinante Kolonien weiß bleiben.

4.2.1.12 Gerichtete Mutagenese

Mutationen von mehreren Aminosäuren wurden wie beschrieben durch PCRs mit nicht homologen 5'-Überhängen an den Primern, Phosphorylierung der PCR-Produkte und Ligation in Plasmide eingeführt. Punktmutationen wurden über die QuikChangeTM-Methode (Fa. Stratagene) eingeführt. Dazu wurden je zwei Oligonukleotide benötigt, die zueinander und zum identischen Bereich beider Stränge der DNS-Matrize komplementär sind, aber in ihrer Mitte die gewünschte Mutation tragen. Die einzuführende Mutation muss dabei auf beiden Seiten von mindestens 12 Matrizen-homologen Nukleotiden flankiert werden. Die beiden Oligonukleotide wurden als Primer in einer PCR mit dem zu mutagenisierenden Plasmid eingesetzt. Da die Primer zueinander komplementär sind, kommt es nicht zu einer exponentiellen Vervielfältigung des PCR-Produktes, das selbst nicht als Matrize dienen kann. Bei jedem Zyklus wird das eingesetzte Plasmid-DNS Template nur einmal abgelesen.

Im Reaktionsansatz wurden 10-50 ng Plasmid-DNS, 50 pmol von beiden Primern (0,5 μ l einer 100 μ M Lösung), 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM), 5 μ l 10xPuffer und 1 μ l Pfu-DNS-Polymerase (2,5 U/ μ l, Fa. Promega) gemischt und mit H₂O auf 50 μ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde im Thermocycler nach einer initialen Denaturierung von 5 min bei 94 °C für 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 s bei 94 °C), Hybridisierung (1 min bei 55-60 °C) und DNS-Synthese (2 min pro kb Plasmidlänge bei 72 °C) inkubiert. Nach Abschluss der PCR wurde das bakterielle Template-Plasmid durch Zugabe von 1 μ l Dpn I (10 U/ μ l) und Inkubation für 1 h bei 37 °C abgebaut. Nach diesem Verdau wurde 1 μ l des Ansatzes mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert, um die Synthese rekombinanter DNS-Stränge zu überprüfen. Die in dieser Reaktion neu synthetisierten Produkte sind doppelsträngig und zirkulär. Durch die Elongation zweier vollständig überlappender Primer verbleiben allerdings zwei versetzte Strangbrüche („nicks“) am jeweiligen 5'-Ende der DNS-Stänge. Nach Transformation dieser doppelsträngigen Plasmide werden in den Bakterien DNS-Reparaturmechanismen in Gang gesetzt, die zur Ligation der Strangbrüche führen. Daher kann auf die *in vitro* Phosphorylierung und Ligation der Produkte verzichtet werden.

4.2.1.13 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen

Bereits 1977 wurde eine enzymatisch katalysierte PCR-Reaktion zur Bestimmung von DNS-Sequenzen durch serielle Kettenabbrüche als „cycle sequencing“ entwickelt (Sanger et al., 1977). Ausgehend von einem Oligonukleotid, das nach Hybridisierung mit der zu sequenzierenden Matrize in 5'→3'-Richtung von einer hitzebeständigen DNS-Polymerase verlängert wird, werden in vier getrennten PCR-Reaktionen (G-, A-, T- und C-Reaktion) spezifische Kettenabbrüche generiert. Dazu werden vier getrennte Reaktionsansätze benötigt, die neben allen vier dNTPs auch jeweils ein bestimmtes 2'3'-Dideoxynalogon (ddGTP, ddATP, ddTTP und ddCTP) enthalten, das ebenfalls durch die DNS-Polymerase in die Produkte eingebaut wird. Eine weitere Verlängerung der Polynukleotidkette ist nach Einbau eines Dideoxynalogons nicht mehr möglich, da am 3'-Ende keine freie OH-Gruppe vorhanden ist, an die dNTPs durch Phosphodiesterbindung angelagert werden könnten. Durch den zufälligen Einbau von dNTPs oder ddNTPs erfolgt die Kettenverlängerungs-Abbruchreaktion mit einer statistisch kalkulierbaren Wahrscheinlichkeit, die durch das Verhältnis von dNTPs und ddNTPs zueinander bestimmt wird. Ausgehend vom Primer-Oligonukleotid entstehen so z. B. in der G-Reaktion viele unterschiedlich große Polynukleotid-Fragmente, die immer mit dem Einbau von ddGTP enden. Somit repräsentiert ein Syntheseprodukt spezifischer Länge jeweils eine Guanosin-Position in der zu analysierenden Sequenz.

Die Sequenzbestimmung erfolgt dann durch parallele Auftrennung der Polynukleotid-Fragmente aus allen vier Reaktionen in vier getrennten Spuren eines denaturierenden Polyacrylamidgels. Da das Gel Kettenlängenunterschiede von einem einzelnen Nukleotid auflöst, wird durch Markierung (z. B. durch den Einbau radioaktiver dNTPs) und Visualisierung der Polynukleotid-Fragmente eine optische Sequenzanalyse möglich. Die in dieser Arbeit für Sequenzierungen eingesetzten Primer waren an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (IRD-800, Fa. MWG-Eurofins). Dieser Farbstoff wurde mittels eines Lasers im Gel zur Fluoreszenz angeregt, so dass die DNS-Fragmente durch das emittierte Licht sichtbar gemacht werden konnten. Die elektronische Erfassung und Verarbeitung der Fluoreszenzsignale ermöglichte die Analyse von Sequenzen von bis zu 1.200 bp in einem Gel-Lauf.

In den Sequenzierungsreaktionen wurden 0,2 µg Plasmid-DNS pro 1 kb Plasmidlänge als Template eingesetzt. Nach Zugabe von 2 pmol des IRD-gekoppelten Primers wurde der

4. Material und Methoden

Ansatz auf 25 µl aufgefüllt. In vier PCR-Gefäße wurden jeweils 6 µl dieses Ansatzes und je 2 µl der G-, A-, T- oder C-Reaktionslösung pipettiert und gemischt. Die Reaktionslösungen wurden im „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTPTM“ (Fa. GE Healthcare) bezogen. Die Reaktionsansätze wurden nach initialer Denaturierung (2 min bei 94 °C) für 30 Zyklen (30 s bei 94 °C Denaturierung, 20 s bei 50 °C Hybridisierung, 30 s bei 70 °C Synthese) im Thermocycler inkubiert. Bis zur Analyse im Gel wurden diese Sequenzierungsreaktionen bei -20 °C gelagert. Kurz vor dem Auftragen der Proben auf das Polyacrylamid-Gel, wurden die Reaktionsansätze mit 4 µl Stop-Lösung gemischt und für 2 min bei 72 °C denaturiert.

Die DNS-Fragmente der „cycle sequencing“-Reaktionen wurden durch Elektrophorese in hochauflösenden 0,2 mm dicken denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen analysiert. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte im LI-COR 4000 LTM DNS-Sequenzier (Fa. Licor). Zur Analyse von Sequenzen von bis zu 1.200 bp wurden 66 cm lange 4 %ige Gele verwendet. Wenn nur die Sequenzanalyse von 800 bp erforderlich war, wurden 40 cm lange 6 %ige Gele genutzt. Nach Reinigung und Entfettung mittels Ethanol wurden zwei beschichtete Glasplatten mit 0,2 mm starken Abstandhaltern („spacern“) in den Gelschlitten eingesetzt. Die Polyacrylamidlösung wurde horizontal mit Hilfe einer Spritze durch einen 0,45 µm-Sterilfilter ohne Einschluss von Luftblasen zwischen die Glasplatten gefüllt. Als Elektrophoresepuffer diente die Gebrauchsverdünnung eines 10xLongRun-Buffer Konzentrates (162 g Tris, 27,5 g Borsäure und 9,3 g EDTA-NA₂ mit H₂O auf 1 L aufgefüllt).

Die Polyacrylamidlösung für lange Gele (4 %, 66 cm) bestand aus 32 ml SequaGel XR[®] (Fa. national diagnostics), 8 ml SequaGel XR[®]-Puffer, 2 ml 10xLongRun-Buffer, 15 ml H₂O, 8 g Harnstoff, 400 µl 10 % APS, 20 µl TEMED; die für kurze Gele (6 %, 40 cm) bestand aus 30 ml SequaGel XR[®] (Fa. national diagnostics), 7,5 ml SequaGel XR[®]-Puffer, 300 µl 10 % APS und 400 µl DMSO. Die Gele polymerisierten nach dem Gießen für mindestens 1 h bei RT, bevor die Glasplatten von außen mit Ethanol gereinigt, die Gelschlitten zwischen den Elektroden des Sequenzers montiert, und die Elektrodentanks mit Elektrophoresepuffer gefüllt wurden. Nach dem „Warmlaufen“ der Gele (66 cm: 2000 V, 37 mA, 50 W, 45 °C; 40 cm: 1500 V, 37 mA, 50 W, 50 °C) wurde der Stromfluss kurzzeitig unterbrochen, ein 48-slot-Haifischzahn-Kamm in das Gel eingesetzt, in die Kammern des Kamms jeweils 1,5 µl der Sequenzierungsreaktionen aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Mit Hilfe der

4. Material und Methoden

Computer-Software wurde die Optik von Laser und Scanner im Sequenzer auf das Gel fokussiert („Autofocus“) und die Signalverstärkung optimiert („Autogain“). Die Software erzeugte und speicherte ein virtuelles Bild des Geldurchflusses während der 8-12 stündiger Elektrophorese. Die einzelnen Sequenzmuster konnten automatisch („ImageAnalysis“) oder manuell in diesem virtuellen Bild abgelesen werden.

In dieser Arbeit wurden DNS-Sequenzierungen außerdem auch von kommerziellen Anbietern durchgeführt. Für einen „Basis-Read“ der Fa. Qiagen (Sequencing-Service) wurden 300 ng der Template DNS und 10 pmol eines unmarkierten Oligonukleotids benötigt, die mit H₂Odd in einem Gesamtvolumen von 6 µl in einem Probengefäß versandt wurden.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der DNS-Analyse-Software „DNS-StriderTM“ für Macintosh. Zum Abgleich mit Sequenz-Datenbanken wurde das Programm „BLAST“ des „NCBI - National Center for Biotechnology Information“ im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt.

4.2.1.14 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription von RNS erfolgte an Plasmid-DNS Matrizen (z. B. p447) mit Hilfe der Sp6-RNS-Polymerase (Fa. Biolabs). Die doppelsträngige DNS-Matrize beinhaltet einen SP6-Promotor oberhalb der zu transkribierenden Region und eine singuläre Restriktions-Schnittstelle (SmaI) unterhalb dieses Bereiches. Die DNS-abhängige-RNS-Polymerase bindet an ihre doppelsträngige Promotor-Sequenz, entwindet die Doppelhelix und synthetisiert am 3'→5'-Strang einen komplementären 5'→3'-RNS-Strang. Der minimale SP6-Promotor besteht aus 18 Nukleotiden (ATTTAGGTGACACTATAG), wobei das letzte Guanin als erstes Nukleotid transkribiert wird.

Zuerst wurden 2,5 µg der betreffenden Plasmid-DNS mit der Restriktionsendonuklease SmaI linearisiert. Dieser Verdau erfolgte in 30 µl NEB4-Puffer für 1 h bei RT. Nach Kontrolle des Verdau durch Agarose-Gelelektrophorese von 1 µl des Ansatzes, wurde die DNS durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt und in 10 µl H₂Odd (RNase frei) gelöst. Für die RNS-Synthese wurden 1 µl 10x-SP6-Polymerase-Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM rNTPs, 1 µl linearisierter Plasmid-DNS (0,25 µg/µl), 0,5 µl SP6-RNS-Polymerase, 0,5 µl RNaseOUT (Fa. Invitrogen) und 7 µl H₂Odd als Transkriptionsansatz

4. Material und Methoden

gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Agarose-Gelelektrophorese wurde die RNS-Synthese überprüft und anhand der Bandenintensität die RNS-Menge abgeschätzt.

4.2.1.15 Gewinnung von Gesamt-RNS mittels RNeasy-Kit

Die Isolation zellulärer Gesamt-RNS erfolgte mit Zellen, die bis zur Konfluenz in einer „Mini-Zellkulturplatte“ (2,5 cm Durchmesser) herangezogen worden waren. Nachdem das Zellkultur-Medium abgenommen worden war, wurden die Zellen für 2 min mit 350 µl RLT-Lysepuffer inkubiert (RT). Das Lysat wurde durch eine QuiaShredder-Säule für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Säulen-Durchlauf wurde gründlich mit 350 µl 70 %igem Ethanol vermischt, auf eine RNeasy-Säule gegeben und für 15 s bei 8.000 g zentrifugiert. Nach den Waschsritten mit 700 µl RW1, 500 µl RPE und weiteren 500 µl RPE (jeweils 15 s 8.000 g), wurde die Säule durch Zentrifugation für 2 min bei 10.000 g getrocknet. Dann wurden 30 µl H₂O_{dd} (RNase frei) auf die Säulenmatrix pipettiert. Nach 2 min Inkubation wurde die RNS-Lösung mittels Zentrifugation (1 min bei 8.000 g) in ein RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

4.2.1.16 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 1:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Orientierung
PR1	5'-AACTCGAGATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT-3'	Sense
PR2	5'-ATGATGATGATGATGATGATGGCTAGCCATATG-3'	Antisense
PR3	5'-CAAGAAACACCTGTCGGCTC-3'	Sense
PR4	5'-ACTCGAGCTATAGACCAACCACCTG-3'	Antisense
PR5	5'-CACCACCACCACCACCATTAAATGACTGGTGGA-3'	Sense
PR6	5'-AACTCGAGGCTAGCCATATGTATATCTCCTTC-3'	Antisense
PR7	5'-AACTCGAGCCAGGAGACACAGAAACAC-3'	Sense
PR8	5'-TAGCTGGCGAATTTTTCCCTC-3'	Antisense
PR9	5'-TCGAGCAATTACATACTAGAGC-3'	Sense
PR10	5'-AACTCGAGCTACATAGAATACTTTTCGCGC-3'	Antisense
PR11	5'-CACCACCACCTAGCGGCCGCATCGTGAC-3'	Sense
PR12	5'-ATGATGATGCTCGAGTCGACCCGGGAATTC-3'	Antisense
PR13	5'-TTTGGATCCTTGCTGTCTAGTAGGGTCAAAGAG-3'	Sense
PR14	5'-AAACTCGAGGAGCTTGGTTGGTTTGAATC-3'	Antisense

4. Material und Methoden

PR15	5'-TTTGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'	Sense
PR16	5'-AAACTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATG-3'	Antisense
PR17	5'-GGGCCAGCTGTTTGCAAGAAGGTTAC-3'	Sense
PR18	5'-AACTCGAGCTATAGACCAACCACCTG -3'	Antisense
PR19	5'-ATGAGTGGGATACAAACGGTTTC-3'	Sense
PR20	5'- CTGCTATAGCTCGAGAAAG-3'	Sense
PR21	5'- GCCAGCTTCCACGGTGCC-3'	Antisense
PR22	5'- CACGTAGGGGGGTACGTCATCTCC-3'	Antisense
PR23	5'- TCTTATTTTTGGGAATAATACC-3'	Antisense
PR24	5'- TGCCATCGGCAGCTCTTCTG-3'	Antisense
PR25	5'- GTAGTTCATCTCTCTGAAGG-3'	Antisense
PR26	5'-GGAGCAACTGGTTACCCATAATG-3'	Antisense
PR27	5'-GGGCCAGCTGTTTGCAAGAAG-3'	Sense
PR28	5'-GAGACATATACCAATGGTCACAGATATATATTC-3'	Sense
PR29	5'-GAATATATATCTGTGACCATTGGTATATGTCTC-3'	Antisense

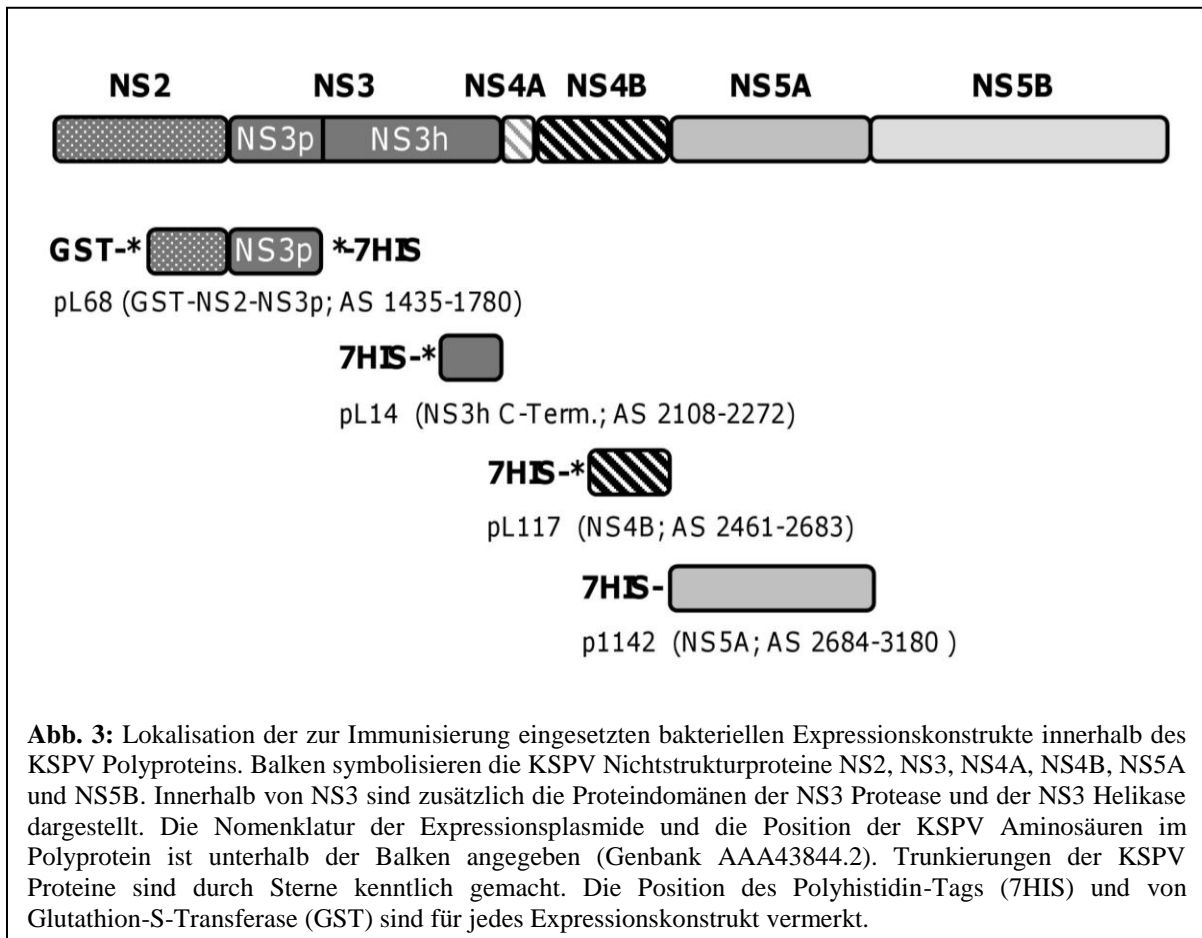
4.2.1.17 Klonierung der Plasmide zur Expression der pestiviralen Nichtstrukturproteine

Mit dem Expressionsvektor pet11a (Fa. Novagen) als Matrize wurde per PCR (PR1 und 2) ein lineares DNS-Fragment erzeugt. Dieses Fragment wurde aus dem PCR-Ansatz gereinigt und mit dem Enzym Xho1 verdaut (Vektor-Fragment 1). Nach Agarose-Gelelektrophorese wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Dieses lineare Vektor-Fragment kodiert am 3'-Ende die Aminosäuresequenz „MASHHHHHH“ (Methionin, Alanin, Serin, 7 x Histidin) vor einem „blunt-end“ und bietet am 5'-Ende ein Xho1 „sticky-end“ zur Klonierung. Ein C-terminales Fragment der KSPV NS3-Helikase wurde per PCR (PR3 und 4) amplifiziert, wobei das Plasmid p447 als Matrize diente. Das PCR-Produkt wurde aus dem PCR-Ansatz gereinigt und mit Xho1 verdaut (Insert-Fragment 1). Nach Agarose-Gelelektrophorese wurde das Insert-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Durch Ligation von Vektor-Fragment-1 und Insert-Fragment-1 entstand das Expressionsplasmid pL14, das die Aminosäuren 2108 bis 2272 von KSPV hinter einem N-terminalen Histidin-Tag kodiert.

Mit dem Expressionsvektor pet11a als Matrize wurde per PCR (PR5 und 6) ein lineares DNS-Fragment erzeugt. Dieses Fragment wurde aus dem PCR-Ansatz gereinigt und mit dem Enzym Xho1 verdaut (Vektor-Fragment 2). Nach Agarose-Gelelektrophorese wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Das lineare Vektor-Fragment 2 hatte am 3'-

4. Material und Methoden

Ende ein Xho1 „sticky-end“ zur Klonierung und am 5'-Ende ein „blunt-end“, hinter dem ein Polyhistidin-Tag mit anschließendem Stop-Kodon kodiert wurde. Ein C-terminales Fragment von CSVF NS4B wurde per PCR (PR7 und 8) anhand der Matrize p447 amplifiziert. Auch dieses Insert-Fragment 2 wurde aus dem PCR-Ansatz gereinigt, mit Xho1 verdaut und durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Die Ligation von Vektor-Fragment-2 und Insert-Fragment-2 ergab das Plasmid pL117, das die KSPV Aminosäuresequenz 2461 bis 2683 vor einem C-terminalen Polyhistidin-Tag kodierte.



Die komplette Nukleotidsequenz von KSPV NS5A wurde per PCR (PR9 und 10) anhand der Matrize p447 amplifiziert. Dieses Insert-Fragment 3 wurde aus dem PCR-Ansatz gereinigt, mit Xho1 verdaut und durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Die Ligation von Vektor-Fragment 1 und Insert-Fragment-3 ergab das Plasmid p1142, das die KSPV Aminosäuresequenz 2684 bis 3180 nach einem N-terminalen Polyhistidin-Tag kodierte.

Zur Generierung eines Expressionsplasmids, das Glutathion-S-Transferase mit einem C-terminalen Fragment von KSPV NS2 und der Protease-Domäne von KSPV NS3 kodiert, wurde zuerst der Vektor pGex-6P-1 (Fa. Amersham) modifiziert. Per PCR (PR11 und 12)

4. Material und Methoden

wurde hinter einer bereits bestehenden Xho1 Erkennungssequenz ein Polyhistidin-Tag und ein Stop-Kodon eingefügt. Dieses PCR-Produkt wurde gereinigt, phosphoryliert und religiert. Nach Transformation, Plasmid-DNS-Präparation und Verifizierung der Mutagenese, wurde der modifizierte pGex-Vektor mit BamH1 und Xho1 verdaut. Dieses lineare Vektor-Fragment-3 wurde nach dem Verdau durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert und gereinigt. Die pestivirale Nukleotidsequenz des C-terminalen NS2 Fragments und des darauffolgenden N-terminalen NS3 Fragments wurden per PCR (PR13 und 14) anhand des Plasmids p447 mit einer N-terminalen BamH1 und einer C-terminalen Xho1 Restriktionsschnittstelle amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit BamH1 und Xho1 verdaut und das Insert-Fragment 4 mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Die Ligation von Vektor-Fragment 3 und Insert-Fragment 4 ergab das Expressionsplasmid pL68. Dieses Plasmid kodiert ein Fusionsprotein aus GST und der KSPV Aminosäuresequenz von 1435 bis 1780 mit einem C-terminalen Polyhistidin-Tag (GST-NS2-3p-His). Eine Übersicht über alle zur Immunisierung von Versuchstieren eingesetzten Proteine liefert Abbildung 3.

Zur Kartierung der Bindungsstelle von Antikörpern gegen das GST-NS2-3p-His Fusionsprotein wurde ein GST-YFP-His Fusionsprotein und das gesamte NS3 mit einem N-terminalen 7His-tag kloniert. Die Sequenz von YFP wurde per PCR (PR15 und 16) mit einer N-terminalen BamH1 und einer C-terminalen Xho1 Restriktionsschnittstelle anhand der Matrize pEYFP amplifiziert und mit beiden Enzymen geschnitten (Insert-Fragment 5). Durch Ligation von Vektor-Fragment 3 und Insert-Fragment 6 wurde das Plasmid pL69 generiert, das GST-YFP mit einem C-terminalen Polyhistidin-Tag kodiert. Die komplette Nukleotidsequenz von KSPV NS3 wurde per PCR (PR17 und 18) anhand der Matrize p447 amplifiziert. Dieses Insert-Fragment 6 wurde aus dem PCR-Ansatz gereinigt, mit Xho1 verdaut und durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Die Ligation von Vektor-Fragment 1 und Insert-Fragment 6 ergab das Plasmid p1039, das die KSPV Aminosäuresequenz 1590 bis 2272 nach einem N-terminalen Polyhistidin-Tag kodiert.

Zur Kartierung der Bindungsstellen von Antikörpern wurde die komplette NS3 Helikase in einen Expressionsvektor kloniert. Die Nukleotidsequenz der NS3 Helikase wurde per PCR (PR19 und 4) anhand der Matrize p447 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit Xho1 verdaut und durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert (Insert-Fragment-7). Vektor-Fragment-1 und Insert-Fragment-7 wurden zum Plasmid p1039 ligiert, das die gesamte KSPV NS3-Helikase (AS 1782-2272) mit einem N-terminalen Polyhistidin-Tag kodiert. Das NS3

4. Material und Methoden

Helikase-Fragment wurde durch Deletions-PCRs seriell am C-Terminus verkürzt. Die Verkürzungen wurden mit Hilfe eines sense Primers (PR20) generiert, der hinter dem Expressionskonstrukt bindet. Mit diesem Primer und einer Serie von antisense Primern (PR21, 22, 23, 24 und 25) die am 3'-Ende der NS3 Helikase in einem Abstand von ca. 90 Nukleotiden binden, wurden die Mutagenesen mittels PCRs am Matrizen-Plasmid p1039 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gereinigt, phosphoryliert und religiert. Mit dieser Strategie wurden die Plasmide pL31 (AS 1782-2263), pL32 (AS 1782-2234), pL33 (AS 1782-2207), pL34 (AS 1782-2174) und pL35 (AS 1782-2144) generiert.

4.2.1.18 Klonierung eines KSPV Replikons

Aus Rindern, die persistent mit BVDV infiziert waren und an „Mucosal Disease“ erkrankt waren, wurden neben zytopathogenen BVD-Viren auch subgenomische BVDV Replikons isoliert. Diese Replikons können selbst keine Partikel bilden, sind folglich auf ein Helfervirus angewiesen und werden daher als „Defective Interfering Particles“ (DIP) bezeichnet. Einige diese Replikons entstanden durch eine vollständige Deletion der RNS-Sequenz, die pestivirale Proteine von Core bis NS2 kodiert, so dass 5'-UTR und N^{PTO} direkt an NS3, alle folgenden Nichtstruktur-Proteine und 3'-UTR fusioniert vorliegt (Tautz et al., 1994). In Analogie zu „Defective Interfering Particle 9“ (DI9) wurde ein KSPV Replikon per Deletions-PCR anhand der Matrize p447 generiert (PR 26 und 27). Das PCR-Produkt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, phosphoryliert und religiert. Zur Verbesserung der Replikationsfähigkeit mussten zusätzlich Punktmutationen in die kodogene Sequenz eingefügt werden (Rümenapf, unveröffentlicht). Das entstandene Plasmid wurde als p1372 benannt.

4.2.1.19 Generierung eines KSPV Replikons und eines CSVF Gesamtklons mit einem radioaktiv markierbaren Methionin im NS4A

Während in BVDV regelmäßig ein Methionin an der zu KSPV NS4A V₂₂₉₉ homologen Position vorkommt, existiert im KSPV Stamm Alfort kein Methionin und kein Cystein. Daher wurde das Valin im KSPV NS4A an Aminosäure-Position 2299 gegen ein Methionin ausgetauscht, um eine metabolische Markierung des Proteins zu ermöglichen. Dieser Aminosäureaustausch wurde im KSPV Replikon per Quick Change PCR (PR 28 und 29) mit der Matrize p1372 eingeführt. Die Template-DNS wurde mittels Dpn1-Verdau eliminiert, das PCR-Produkt per Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, phosphoryliert, religiert und in Bakterien transformiert. Das resultierende Plasmid wurde als p1372V₂₂₉₉M benannt. Um diese Mutation auch in den Gesamtklon einzufügen, wurden p447 (Vektor-Fragment 4) und

4. Material und Methoden

p1372V₂₂₉₉M (Insert-Fragment 8) mit EcoR1 und NgoMIV verdaut. Durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die betreffenden Vektor- und Insert-Fragmente isoliert. Nach der Reinigung wurden die Fragmente ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als p447V₂₂₉₉M benannt.

4.2.2 Arbeiten mit Zellen

4.2.2.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken (LaminAir, Fa. Heraeus) durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 96 % im Brutschrank (Fa. Forma Scientific bzw. Fa. Memmert) kultiviert. Als Zellkulturmedium für SK6-Zellen (Kasza et al., 1972) diente DMEM mit Zusätzen für die eukaryotische Zellkultur (4,5 g/l DMEM Pulvermedium; 0,0178 g/l L-Alanin; 0,03 g/l L-Aspartat; 0,07 g/l Glycin; 0,075 g/l L-Glutaminsäure; 0,025 g/l L-Prolin; 0,1 mg/l Biotin; 0,025 g/l Hypoxanthin; 3,7 g/l NaHCO₃). Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin zum Medium. Als Zellkulturgefäße wurden Schalen und „Multiwell-Platten“ (NuncTM, Fa. Thermo Scientific) verwendet.

Nach jeweils drei bis vier Tagen wurden die zu einem konfluenten Rasen ausgewachsenen adhären Zellen passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen mit 5 ml Trypsinlösung (2,5 g/l Trypsin; 16 mg/l Phenolrot; 3,3 mM EDTA in PBS) überschichtet. Nach 20-30 s - bevor der Zellrasen sich abgelöst hatte - wurde die Trypsinlösung abgenommen und die Zellen für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde die extrazelluläre Matrix abgebaut, so dass die Zellen alle Verbindungen zueinander und zum Boden der Zellkulturschale lösten. Nach der Trypsin-Behandlung wurden die Zellen schließlich durch vorsichtiges Klopfen abgelöst und vereinzelt. Bei der folgenden Resuspendierung in 5 ml Zellkulturmedium wurden Trypsinreste durch im FKS enthaltene Trypsin-Inhibitoren inaktiviert. Zur Erhaltung der Zellkultur wurde ein Teil der Zellsuspension (1/30 bis 1/20) in frische Zellkulturschalen mit frischem Zellkulturmedium überführt und unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Durch Passagierung der Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen wurde die Zelldichte für Experimente eingestellt. So wurden zum Beispiel SK6-Zellen für die RNS-Transfektion mittels Elektroporation am Vortag 1/3 passagiert, so dass ein gerade konfluenten Zellrasen für das Experiment zur Verfügung stand.

4. Material und Methoden

Sp2/0- und Hybridoma-Zellen, die nur eine geringe Adhärenz am Zellkulturgefäßboden zeigen, wurden mit Pipette und Pipettierhilfe abgespült. Nach Zentrifugation konnten die Zellen dann in frisches Medium überführt werden.

4.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Adhärente Zellen wurden vor der Zählung durch Trypsin-Verdau abgelöst und in Medium aufgenommen. Zur Lebend-Tot-Färbung wurde ein Aliquot der durch Vortexen homogenisierten Zellsuspension 1:10 mit einer 0,5 %igen (w/v) Trypanblau-Färbelösung gemischt. Der Farbstoff Trypanblau durchdringt die beschädigte Membran abgestorbener Zellen und bindet an die zellulären Proteine, so dass sie sich blau verfärben. Der Farbstoff kann die intakte Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen, weshalb sie farblos bleiben und von abgestorbenen Zellen unterschieden werden können. Bei der Berechnung der Zellzahl wurden nur lebende Zellen berücksichtigt.

Zur Diskriminierung und Zählung von Leukozyten wurde die Zellsuspension 1:10 mit Türk`s-Färbelösung (Fa. Gibco) versetzt, die Leukocyten selektiv blau anfärbt. Vor der Zählung wurden die Zellen für 2 bis 3 min in der jeweiligen Färbelösung inkubiert. Eine Neubauer-Zählkammer wurde angehaucht und das Deckglas so angedrückt, dass sog. Newton-Ringe entstehen. Vom Rand wurden 20 µl der Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt. Nachdem die Zellen zum Boden der Kammer absedimentiert waren, wurden jeweils vier Großquadrate ausgezählt (n). Jedes dieser Quadrate hat ein Volumen von 0,001 µl (Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,01 mm²). Die Berechnung der Zellzahl pro µl erfolgte durch Multiplikation des Mittelwertes der Zellzahl aus den vier Großquadraten ($n/4$) mit dem Verdünnungsfaktor (10), so dass:

$$\text{Zellzahl / ml} = 2.500 n$$

4.2.2.3 Elektroporation von RNS in SK6-Zellen

In dieser Arbeit wurden eukaryotische Zellen mit synthetisch hergestellter viraler RNS mittels Elektroporation transfiziert. Durch einen elektrischen Impuls wurde dabei das Membranpotential der Zellen kurzzeitig umgekehrt, wobei die Zellmembran permeabilisiert wurde und RNS aus dem Transfektionsmedium ins Zytoplasma gelangte.

Für einen Elektroporationsansatz wurden ungefähr 5×10^6 SK6-Zellen (eine konfluente 10 cm Zellkulturschale) abtrypsiniert und in 5 ml DMEM mit 10 % FKS aufgenommen. Durch Zentrifugation (2 min bei 194 g) wurden die Zellen pelletiert und in 10 ml PBS defiz.

4. Material und Methoden

resuspendiert. Nachdem die Zellen wiederum pelletiert worden waren (2 min bei 194 g), wurden sie nach diesem Waschschrift in 500 µl PBS defiz. aufgenommen und resuspendiert. 300 µl der Zellsuspension wurden in eine Küvette (Elektrodenabstand 2 mm) gefüllt und mit 10 µl eines *in vitro*-Transkriptionsansatzes vermischt. Der Elektroporations-Puls wurde bei unendlichem Widerstand, 950 µF und 0,18 kV im Gene Pulser[®] II (Fa. Biorad) durchgeführt. Nach dem Puls wurden Zellaggregate durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich resuspendiert und in 2 ml DMEM in eine Vertiefung einer „6-well“-Platte (Durchmesser 2,5 cm) ausgesät.

4.2.2.4 Infektion von SK6-Zellen

Zur Infektion wurden die Zellen auf geeigneten Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie einen konfluenten Zellrasen bildeten. Nachdem sich die Zellen an der Unterlage festgesetzt hatten (ca. 4 h), wurde in das Medium die im Versuch in FFU angegebene Dosis des betreffenden Virus gegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Zur Analyse der viralen Proteine wurde 24 h nach der Infektion das Medium abgenommen. Die Zellen wurden dann auf der Kulturschale mit PBS defiz. gewaschen und in SDS-Lysispuffer aufgenommen.

4.2.2.5 Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen

Der Titer von Zellkulturüberständen nach Elektroporation von viraler RNS oder von Virus-Stocklösungen wurde bestimmt, indem SK6-Zellen mit seriellen Verdünnungen des virushaltigen Überstandes infiziert wurden.

Zuerst wurden auf „24-well“-Platten SK6-Zellen so ausgesät, dass sie einen konfluenten Rasen bildeten. Eine Verdünnungsreihe der Virussuspension wurde in sterilen Glasröhrchen mit serumfreiem Zellkulturmedium hergestellt. Beginnend mit dem unverdünnten Überstand wurde der Verdünnungsfaktor der Virussuspension in sechs Stufen von Röhrchen zu Röhrchen jeweils um den Faktor 10 erhöht. Dazu wurden in 6 Röhrchen jeweils 900 µl Medium vorgelegt. Nachdem 100 µl des unverdünnten virushaltigen Überstandes in das erste Röhrchen pipettiert worden waren, wurde die Suspension durch Vortexen gemischt. Mit einer frischen Pipettenspitze wurden nun 100 µl aus der ersten Verdünnungsstufe in das nächste Röhrchen überführt und diese Suspension durchmischt. Nachdem alle Verdünnungsstufen in gleicher Weise hergestellt waren, wurde das Zellkulturmedium von den Zellen der „24-well“-Platte entfernt. Nach Zugabe von 300 µl frischem serumfreiem Medium wurden die Wells mit

4. Material und Methoden

je 100 µl des unverdünnten Überstandes und der einzelnen Verdünnungsstufen infiziert. Nach 2 h wurden die Infektionsüberstände abgenommen und die Zellen vorsichtig mit serumhaltigem Medium überschichtet. 24 h nach der Infektion wurden die Zellen mit PBS defiz. gewaschen und fixiert. Mittels eines Immun-Nachweisverfahrens wurden die infizierten Zellen angefärbt, um ihre Anzahl mikroskopisch zu bestimmen.

Zur Berechnung der FFU/ml wurde die Anzahl der infizierten Zellen mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor der Virussuspension multipliziert. Für jede Titerbestimmung wurden vier Virustitrationen durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Für die Ermittlung der TCID₅₀ wurden die Zellen nach einer Infektionszeit von 72 h fixiert und die infizierten Zellen mit einem Immun-Nachweisverfahren angefärbt. In diesem Endpunktverdünnungsverfahren erfolgte die Titerberechnung nach einem statistischen Schätzverfahren. Mit Hilfe der Formel nach Spearman und Kärber wurde aus mindestens vier Replikaten der Verdünnungsreihe die TCID₅₀ des virushaltigen Überstandes ermittelt:

$$m = x_i + d/2 - d \sum R_i$$

m: negativer Logarithmus des Titers, bezogen auf das Testvolumen

Dieser Wert muss noch mit 10 multipliziert werden, um die TCID₅₀ pro ml zu erhalten, da nur 100 µl des Überstandes und der Verdünnungsreihe zur Infektion genutzt wurden.

x_i: Logarithmus der höchsten Verdünnung des virushaltigen Überstandes, durch die noch eine Infektion in allen Replikaten verursacht wird

d: Logarithmus des Verdünnungsfaktors

∑ R_i: Summe der Reaktionsraten ab und inklusive der höchsten Verdünnung des virushaltigen Überstandes, durch die noch eine Infektion in allen Replikaten verursacht wurde

4.2.1.6 Indirekter Immunperoxidase Test

Nach Infektion von SK6-Zellen oder Transfektion von viraler RNS wurden die Zellen zum Nachweis viraler Proteinexpression fixiert. Dazu wurde zuerst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS defiz. gewaschen. Je nach Zielantigen und verwendetem Antikörper wurden die Zellen entweder mit eiskaltem Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) oder mit 4 %igem Paraformaldehyd (w/v) fixiert. Für die Methanol-Aceton-

4. Material und Methoden

Fixierung wurden die Zellen mit dem eiskalten Methanol-Aceton-Gemisch überschichtet und für 1 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Lösung abgenommen, der Zellrasen für 10 min bei RT unter elektrischer Ventilation getrocknet und anschließend mit PBS defiz. rehydriert. Für die Paraformaldehyd-Fixierung wurde der mit PBS defiz. gewaschene Zellrasen mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung überschichtet und für 20 min bei 6 °C im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde die Paraformaldehyd-Lösung abgenommen und der Zellrasen mit PBS defiz. gewaschen. Zur Demaskierung der Epitope und zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen anschließend mit kalter 1 %iger Octylglycosid-Lösung (w/v) für 5 min bei RT inkubiert. Ein weiterer Waschschrift mit PBS defiz. folgte vor der Bindung der Antikörper.

Zur Bindung der Primärantikörper wurde der Zellrasen mit 20 %igen Hybridoma-Zellkulturüberständen in PBS_{Tween} (v/v) überschichtet und für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung der Primärantikörper-Lösung, wurden die Zellen drei Mal für 5 min mit PBS_{Tween} gewaschen, um ungebundenen Immunglobuline zu entfernen. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte entweder mittels Peroxidase- (z. B. Ziege anti Maus, Peroxidase-gekoppelt, 1:1000 in PBS_{Tween}). Der Zellrasen wurde für eine weitere Stunde bei 37°C im Brutschrank mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach Abnahme der Sekundärantikörper-Lösung wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS_{Tween} gewaschen. Bei Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden enzymatisch katalysierte Oxidationsreaktionen zum Nachweis der Antikörperbindung genutzt. Frisch angesetztes AEC-Substrat (9 ml 50 mM NaAcetat-Lösung pH 5,2; 1 ml Aminoethylcarbazol [4 mg/ml] in Dimethylformamid, 5 µl 30 % H₂O₂ in H₂O) wurde auf die Zellen gegeben und für 10 bis 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation des löslichen AEC-Substrats zu einem unlöslichen roten Farbstoff. Dieser Farbstoff reichert sich spezifisch in infizierten Zellen an, da sich in ihnen virale Proteine, die daran gebundenen Primärantikörper und die an die Primärantikörper gebundenen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper befinden. Die Auswertung des Immunperoxidase Tests erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Eclipse TS 100, Fa. Nikon).

4.2.1.7 Indirekter Immunfluoreszenz Test

Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper ermöglichten die Auswertung der Antikörperbindung anhand fluoreszenzmikroskopischer Befunde. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen entweder, wie oben beschrieben, in „multi-well“-Platten oder auf Glas-

4. Material und Methoden

Deckgläschen (Ø 12 mm, Fa. MAGV) angezogen, die in eine Vertiefung einer „multi-well“-Platte eingelegt worden waren. Nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert (s. 2.2.1.5). Anschließend wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Fa. Sigma) angefärbt, indem der Zellrasen für 5 min bei RT mit einer DAPI-Lösung (66 µg/ml) inkubiert und zweimal mit PBS_{Tween} gewaschen wurde. Zur Herstellung von Deckgläschen-Präparaten wurden die Deckgläschen nach den beschriebenen Inkubationsschritten aus den Vertiefungen geborgen, auf Zellstoff abgetupft und mit dem Zellrasen nach unten auf einen Objektträger in einen Tropfen Mowiol-Einbettungsmedium gedrückt. Überschüssiges Einbettungsmedium wurde mit Zellstoff entfernt und der Rand des Deckgläschens zur Versiegelung mit Klarlack bestrichen. Die Beurteilung der Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert, Fa. Zeiss) oder eines konfokalen Laser Mikroskops (TSC SP5, Fa. Leica).

4.2.2.8 Metabolische Markierung viraler Proteine mit S³⁵

Zur Markierung der KSPV-Proteine wurden SK6-Zellen am Vortag so ausplattiert, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion 80% des Bodens einer 35 mm Zellkulturschale bedeckten. Nach Abnahme des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit PBS defiz. gewaschen und für in 1 ml serumfreiem Zellkulturmedium mit einer MOI von 10 mit KSPV infiziert. Nach einer Stunde wurde der Überstand abgenommen und durch 2 ml serumhaltiges Zellkulturmedium ersetzt. Zur Markierung der Proteine des KSPV-Replikons wurden SK6-Zellen mit *in vitro* synthetisierter RNS wie beschrieben durch Elektroporation (4.2.2.2) transfiziert. Die Effizienz jeder Transfektion wurde durch Abnahme eines 1/10 der Zellen und Aussaat in einem separaten Well einer „24-well“-Platte mit immunhistochemischen Verfahren kontrolliert.

Für die Analyse der viralen Proteine wurde der Zellkulturüberstand eine Stunde vor den angegebenen Markierungs-Zeitpunkten von den Zellen abgenommen. Dann wurden sie mit 2 ml PBS defiz. gewaschen und für 1 Stunde in 1 ml methionin- und cysteinfreiem DMEM-Medium inkubiert (Dulbecco's modified Eagle's medium ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure [Fa. Sigma-Aldrich], supplementiert mit 1 % Glutamax-Lösung [Fa. Invitrogen]). Die metabolische Markierung der Proteine erfolgte für eine Stunde in 1 ml frischem methionin- und cysteinfreiem Medium durch Zugabe von 250 µCi Methionin und Cystein (S³⁵-Promix, Fa. Hartmann Analytik). Zur Analyse der in dieser Stunde synthetisierten Proteine (Puls-Wert) wurden die Zellen mit 2 ml PBS defiz. gewaschen und in 250 µl RIPA-SDS-Puffer unter Zusatz von 5 % (v/v) des Proteinase-Inhibitors Pefabloc-SC

4. Material und Methoden

(Fa. Merck) und 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol lysiert. Um die Prozessierung und den proteolytischen Abbau der viralen Proteine zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Markierung mit 2 ml PBS defiz. gewaschen und für die angegebenen Zeitpunkte in voll supplementiertem Medium mit 10 % FCS im Brutschrank inkubiert (Chase-Werte). Nach dieser Inkubation wurden auch diese Zellen mit 2 ml PBS defiz. gewaschen und in RIPA-SDS_{2%}-Puffer (150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % [w/v] Desoxycholat; 0,1 % [w/v] SDS; 50 mM Tris/HCl, 2 % [w/v] SDS, pH 8,0) mit Pefabloc und β -Mercaptoethanol lysiert. Die Lysate wurden zur vollständigen Denaturierung für 10 min auf 95 °C erhitzt und dann bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

4.2.3 Arbeiten mit Proteinen

4.2.3.1 Radioimmunpräzipitation

Die Autoradiographie von Proteinen nach metabolischer Markierung mit radioaktiven Aminosäuren (S^{35} - Methionin und S^{35} - Cystein) und deren selektive Isolation mittels monoklonaler Antikörper war die Grundlage der im Folgenden beschriebenen Radioimmunpräzipitations-Experimente (RIP). Durch Lysis der Zellen wurden zuerst die zellulären und viralen Proteine freigesetzt. Nach Zugabe der Antikörper bildeten sich im Lysat Antigen-Antikörper-Komplexe. Diese Immunkomplexe wurden durch Zentrifugation nach Bindung der Antikörper an Protein-G, das an eine Affinitätschromatographie-Matrix (z. B. Sepharose) gekoppelt war, isoliert. Nach Auftrennung dieser Immunkomplexe mittels SDS-PAGE lassen sich die an die Antikörper gebundenen radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie nachweisen. Auch andere radioaktiv markierte Proteine, die mit den an die Antikörper gebundenen Zielproteinen in Wechselwirkung treten, werden durch Autoradiographie nachgewiesen. Um Signale solcher sekundärer Bindungspartner zu unterdrücken, wurde dem Zell-Lysispuffer 2 % SDS zugesetzt, so dass alle Proteine nach Erhitzen auf 95 °C für 10 min denaturiert vorlagen.

Zur Immunpräzipitation wurde das radioaktive Zell-Lysat (250 μ l RIPA-SDS_{2%}-Puffer-Lysat, siehe 4.2.2.7) bei 4 °C für 1 h auf einem vertikalen Drehrad aufgetaut. Eine Zentrifugation bei 16.000 g für 30 min bei 4 °C trennte alle unlöslichen Bestandteile als Pellet ab. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,25 ml RIPA-Puffer ohne SDS zu einer SDS-Endkonzentration von 0,2 % (w/v) verdünnt. Jeweils 1,25 ml dieses Proteinextrakts wurden mit 100 μ l Hybridoma-Zellkultur-Überstand versetzt und für 1 h bei 4 °C am Drehrad

4. Material und Methoden

inkubiert. In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen die pestiviralen Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B für Immunpräzipitationen verwendet.

Durch Zugabe von 100 µl 25 %iger Protein-G-Sepharose (v/v) in RIPA-Puffer mit 1 mM NaN_3) und Inkubation für 1 h bei 4 °C am Drehrad wurden die Immunkomplexe durch Zentrifugation bei 16.000 g für 30 min isoliert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet drei Mal mit 900 µl RIPA-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 100 µl SDS-Gel-Probenpuffer aufgenommen, mit 5 % β -Mercaptoethanol (v/v) versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Sepharose abzentrifugiert, der komplette Überstand abgenommen und im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

4.2.3.2 SDS-PAGE, Autoradiographie

Die ladungsunabhängige Auftrennung von Proteingemischen nach der Molekülgröße (Schägger und Jagow, 1987) erfolgte in Tricin-Gelen als vertikale Natrium-dodecyl-sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Dabei wurden für Mini-Gele (8,5 x 6,0 cm) Apparaturen aus der Werkstatt des MZI (Gießen), für mittlere Gele (13 x 15 cm) Apparaturen der Firma Hoefer und für große Gele (16 x 20 cm) Apparaturen der Firma Bio-Rad (PROTEAN II xi) genutzt. Die Trenngele wurden je nach Größe des zu untersuchenden Proteins mit einem Acrylamid-Anteil von 7,5 bis 12 % (w/v) in Gelpuffer (1 M Tris/HCl; 0,1 % [w/v] SDS, pH 8,45) angesetzt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,05 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1 % TEMED gestartet. Die Sammelgele beinhalten jeweils 4 % (w/v) Acrylamid in Gelpuffer mit 0,08 % (w/v) APS und 0,1 % (v/v) TEMED. Die verwendete 40 %ige (w/v) Acrylamidlösung bestand im Verhältnis 29:1 aus Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid (Fa. AppliChem).

Als Molekulargewichts-Größenstandard wurden 3 µl eines vorgefärbten Protein-Markers (Prestained Protein Marker, Fa. Invitrogen) auf jedem Gel in einer separaten Spur des Gels aufgetragen. Für Autoradiographien wurden zusätzlich 2 µl eines durch C^{14} -Methylierung radioaktiv markierten Molekulargewichtsstandards (C^{14} -Protein Marker, Fa. Amersham) in einer separaten Spur aufgetragen. Durch Lysis in SDS-Gel-Probenpuffer (2 % [w/v] SDS; 6 M Harnstoff; 10 % [v/v] Glycerin; 0,01 % [w/v] Bromphenolblau) unter Zusatz von 5 % β -Mercaptoethanol und Inkubation bei 95 °C für 5 min wurden die Proteine aus den Proben (Bakterienzellen, eukaryontische Zellen oder gereinigte Immunkomplexe) freigesetzt und denaturiert. Um im Western Blot Proteine zu detektieren, die in der Zelle nur in sehr niedriger

4. Material und Methoden

Konzentration vorlagen, war es in einigen Fällen nötig, große Proteinmengen in einer Gelspur aufzutrennen. Da größere Mengen von Nukleinsäuren eine Auftrennung der Proteine verhindern, musste in diesen Fällen zuerst ein Proteinextrakt hergestellt werden. Dazu wurden eukaryontische Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 1 % Triton-X 100 (Fa. Sigma) Lösung in PBS für 20 min bei 4 °C lysiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 14.000 g zentrifugiert. Das nukleinsäurehaltige Pellet wurde verworfen und der proteinhaltige Überstand 1:2 mit SDS-Gel-Probenpuffer gemischt.

Als Laufpuffer zur Elektrophorese wurden spezielle Kathoden- (100 mM Tricin; 0,1 % [w/v] SDS; 100 mM Tris/HCl, pH 8,25) und Anoden-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,9) für SDS-PAGE eingesetzt. Bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde eine Spannung von 80 V angelegt; erst dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde abgebrochen, sobald die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Je nach Acrylamid-Konzentration und Format des Gels dauerte die Elektrophorese zwischen 90 und 360 min. Die Gelapparatur wurde anschließend auseinander gebaut und das Gel von den Glasplatten gelöst.

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde das Gel für 2 h in einer Coomassie-Brilliant-Blau R250 Färbelösung (0,25 % [w/v] Coomassie-Brillant-Blau R250; 45 % [v/v] Methanol; 10 % [v/v] Essigsäure) inkubiert. Nach einer mindestens dreistündigen Entfärbung der Gel-Matrix in einer SDS-PAGE Entfärbelösung (40 % [v/v] Methanol; 10 % [v/v] Essigsäure), wurde das Gel für 24 h in einer Konservierungslösung (20 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Glycerin) inkubiert. Zur Dokumentation wurde das Gel in einem Spannrahmen zwischen zwei Cellophan-Folien (Gel Air Cellophane Sheets, Fa. BioRad) getrocknet.

Zur Detektion von Proteinbanden mittels Autoradiographie wurde das Gel nach dem Lauf für 45 min in einer Fixierlösung (30 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure) und darauf für 45 min in einer Amplify-Lösung (NEN; Life Science) zur Fluorographie inkubiert. Dann wurde das Gel auf Whatman-Filterpapier aufgebracht, mit einer wasserfesten Gazefolie abgedeckt und im Vakuum-Geltrockner bei 65 °C für 4 h getrocknet. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das getrocknete Gel wurde die Position und Intensität der radioaktiv markierten Proteine und des C¹⁴-markierten Größenstandards anhand der Schwärzung des Films bestimmt. Zur Herstellung der Autoradiographien wurden Biomax[®] Röntgenfilme (Fa. Kodak) in der Dunkelkammer mit der lichtempfindlichen Beschichtung direkt auf das getrocknete Gel aufgelegt, in einer lichtdichten Röntgenkassette für mindestens 24 h bei -

4. Material und Methoden

70 °C auf dem Gel belassen und in der Entwicklermaschine entwickelt. Abhängig von den jeweiligen Signalen wurden daraufhin noch weitere längere oder kürzere Expositionen durchgeführt.

4.2.3.3 Western Blot (wet)

Um eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu ermöglichen, wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine geeignete Reaktionsoberfläche übertragen (Renart et al., 1979). Zum Transfer der Proteine aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen (Fa. Pall) wurde zuerst das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und das Trenngel in Wet-Blot-Puffer (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % [v/v] Methanol; 0,037 % [w/v] SDS) equilibriert. Zwei 1 mm starke Filterpapiere (Whatman) und die Nitrocellulose-Membran wurden auf die passende Größe zurechtgeschnitten und ebenfalls mit diesem Wet-Blot-Puffer befeuchtet. Unter Luftausschluss wurden in dieser Reihenfolge in einem Pufferbad Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Polyacrylamid-Gel und Filterpapier übereinander platziert. Dieses Gel-Sandwich wurde aus dem Pufferbad gehoben, in eine Halteapparatur eingespannt und in die Blotting-Kammer (Fa. BioRad) überführt. Im elektrischen Feld wurden dann die Proteine bei 77 V für 45 min oder bei 15 V für 12 h auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Proteintransfer wurde anhand des vorgefärbten Markers und einer Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau-Rot (0,5 % [w/v] Ponceau S, 1 % [v/v] Essigsäure; Fa. Roth) überprüft. Dazu wurde die Membran für 2 min bei RT in der Färbelösung inkubiert und dann eine 10 min Entfärbung der Membran in PBS durchgeführt. Störungen im Proteintransfer durch Luftblasen und die Überladung einer Gelspur konnten so ausgeschlossen werden.

Durch eine einstündige Inkubation der Membran bei RT auf einem horizontalen Schüttler (Fa. Bühler) in 5 % (w/v) Magermilchpulver (Fa. Frema) in PBS_{Tween} wurden alle verbliebenen freien Proteinbindungsstellen blockiert. Nach einmaligem Waschen der Membran in PBS_{Tween} wurde die Primär-Antikörperlösung auf die Membran gegeben und eine einstündige Inkubation auf dem Schüttler bei RT durchgeführt. Dazu wurde Hybridoma-Zellkulturüberstand standardmäßig 1:5 mit PBS_{Tween} gemischt; Antikörperkonzentrate und Antiseren wurden in der jeweils angegebenen Verdünnung eingesetzt. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Membran anschließend dreimal für jeweils 10 min bei RT auf dem Schüttler mit PBS_{Tween} gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit der Lösung des Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers (z. B. Ziege anti Maus PO, 1:10.000 in PBS_{Tween}, Fa. Dianova) für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

4. Material und Methoden

Nach drei weiteren Waschschritten (10 min RT) mit PBS_{Tween} wurde die Membran aus dem Inkubationsgefäß genommen, für 20 s zur Trocknung auf Zellstoff abgelegt und nach den Vorschriften des Herstellers mit frisch angesetzttem Chemilumineszenz-Substrat (Western Blot Lightning Plus, Fa. Perkin Elmer) befeuchtet. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde das überschüssige Substrat an Zellstoff abgetupft, die Membran in die Filmkassette eingelegt und mit einer transparenten Plastikfolie abgedeckt. Die Chemilumineszenz-Signale wurden durch Auflegen eines Röntgenfilms (BioMax MR bzw. BioMax light, Fa. Kodak) aufgefangen. Der Röntgenfilm wurde in der Dunkelkammer durch direkte Exposition auf der Folie standardmäßig zunächst für 30 s belichtet und unverzüglich entwickelt. Je nach Signalstärke wurden anschließend weitere kürzere oder längere Expositionen durchgeführt. Nach der Exposition und Entwicklung wurde der Film wieder in die Filmkassette eingelegt und anhand von Leuchtmarkierungen in der Kassette wieder in die exakte Expositionsposition ausgerichtet. Nun wurde das Bandenmuster des vorgefärbten Größenstandards manuell auf den Film übertragen, so dass auch die Position der Chemilumineszenz-Signale relativ zum Marker dokumentiert wurde.

4.2.3.4 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Proteinexpression wurden *E. coli* des Stamms RosettaTM DE3 (Fa. Novagen) mit den Plasmiden transformiert. Dieser Stamm ist defizient in Bezug auf die *E. coli* Proteasen Lon und ompT. Ein zusätzliches Plasmid (pRARE) produziert in Prokaryonten unterrepräsentierte tRNAs, um die Expression eukaryotischer Sequenzen zu verbessern. Obwohl der genetische Kode von Prokaryonten und Eukaryonten weitgehend gleich ist, gibt es deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der Verwendung bestimmter Kodons und damit einhergehend in der Häufigkeit der entsprechenden tRNAs. Die kompetenten Bakterien wurden nach der Transformation auf einer LB-Agar-Platte (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) im Verdünnungsausstrich ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zunächst wurden LB-Medium Flüssigkulturen (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) von 2 ml angeimpft und im Brutschrank bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ von über 0,8 erreicht hatten, wurden sie in zwei Hälften geteilt. Jeweils 1 ml der Flüssigkulturen verblieb im Inkubationsgefäß, während der andere Milliliter in ein frisches Gefäß überführt und die Proteinexpression durch Zugabe von 1 µl Isopropyl-β-D-galactopyranosid (IPTG; 1 M Stocklösung) induziert wurde. 425 µl der nicht induzierten Flüssigkultur der transformierten Bakterien wurden

4. Material und Methoden

mit 75 µl Glycerin-Lösung versetzt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach 1 h wurden jeweils 0,5 ml der induzierten und 0,5 ml der nicht induzierten Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10.000 g, RT, 1 min) und das LB-Medium aus dem Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl H_2O resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl SDS-Gel-Ladepuffer lysiert, um die Proteinexpression in der SDS-PAGE zu analysieren. Dazu wurden die Proteinbanden nach dem Gellauf durch Anfärbung mit Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht.

Zur Proteinreinigung wurde eine sterile Pipettenspitze in die gefrorene Glycerinkultur gestochen und in LB-Expressionsmedium (LB mit Zusatz von 1 % Glukose, 34 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin) in einem Kulturvolumen von 25 ml über Nacht bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen (Vorkultur). Mit 10 ml dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (500 ml vorgewärmtes LB-Expressionsmedium) angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttler inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD_{600} von ca. 1,0 erreicht hatte. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 ml einer 1 M IPTG-Stocklösung induziert (Endkonzentration 1 mM) und der Ansatz bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttler für 2 h inkubiert. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (4225 g für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) geerntet und das Zellpellet gewogen. Auf Eis wurden 25 ml Lysispuffer (1 % [v/v] Triton-X 100, 300 mM NaCl, 50 mM Na_3PO_4 , 20 mM Imidazol, pH 7,9) und 250 µl His-Proteinase-Inhibitor (Fa. Sigma) pro g Zellpellet zugesetzt. Das Zellpellet wurde in dem Puffer gründlich resuspendiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.2.3.5 Affinitätsreinigung von His-Tag-Proteinen

Hexahistidin-Peptide werden als His-Tag (Fa. Roche) bezeichnet und können über die π -Elektronen der Imidazol-Seitenketten zweiwertige Metallionen koordinieren. Daher weisen diese Hexahistidin-Peptide eine mikromolare Affinität zu zweiwertigen Nickel-, Kobalt- und Zinkionen auf. Die Bindung dieses Peptids an immobilisierte Nickel- und Kobaltionen kann zur chromatographischen Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen genutzt werden („immobilized metal affinity chromatography“, IMAC). Die Bindung eines His-Tags an zweiwertige Metallionen kann durch Zugabe hoher Konzentrationen von freiem Imidazol aufgehoben werden.

Vor der Reinigung von His-Tag-Proteinen mittels IMAC wurden die Proteine zuerst durch Lysis aus den Bakterienzellen freigesetzt. Durch drei Zyklen des Frierens und Tauens in

4. Material und Methoden

einem 1 %igen (v/v) Triton-X100-Puffer (s. 4.2.3.4) wurden die Membranen und die Zellwände der Bakterien durch die wiederholte Kristallbildung und das nichtionische Detergenz beschädigt. Das von dem Bakterienstamm RosettaTM synthetisierte Lysozym wurde dabei aus dem Zytoplasma freigesetzt, so dass die Zellwände abgebaut wurden. Dieser Bakterienaufschluss zeigte durch die Freisetzung der bakteriellen Nukleinsäuren eine sehr hohe Viskosität. Zum vollständigen Aufbrechen der Zellwände, zur Scherung der Nukleinsäuren und zur Herabsetzung der Viskosität wurde jeder Ansatz zusätzlich mit 20 Pulsstößen einer Ultraschallsonde behandelt. Dabei wurde eine Überhitzung des Bakterienlysates durch Kühlung verhindert. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die unlöslichen Proteine aus dem Lysat durch Ultrazentrifugation (100.000 g für 1 h bei 4 °C) abgeschieden. Lösliche His-Tag-Proteine wurden aus dem Überstand der Ultrazentrifugation durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Zur Reinigung unlöslicher Proteine wurde das Pellet der Ultrazentrifugation in Puffer „Urea A“ (8 M Harnstoff, 300 mM NaCl, 50 mM Na₃PO₄, 20 mM Imidazol, pH 7,9) oder „Guanidium A“ (4 M Guanidium-HCl, 300 mM NaCl, 50 mM Na₃PO₄, 20 mM Imidazol, pH 7,9) resuspendiert. Durch erneute Ultrazentrifugation (100.000 g für 1 h bei 10 °C) wurden wiederum unlösliche Bestandteile abgetrennt, so dass das His-Tag-Protein denaturierend durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus dem Überstand gereinigt werden konnte.

Nach einer Sterilfiltration (max. Porengröße 0,45 µm) wurde das Bakterienlysate mit 5 % Puffer B (500 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na₃PO₄, pH 7,9) versetzt und mit einer Flussrate von 0,7 ml/min durch eine Ni²⁺-Sephrose-Säule (His-Trap HPTM-1 ml, Fa. Amersham) gepumpt. Die Säule wurde mit 10 ml 20:1 Puffer A (wie B, aber ohne Imidazol) : Puffer B gewaschen. Die Elution der Säule erfolgte auf einer FPLC-Chromatographieanlage (Fa. BioRad) im isochratischen Imidazol-Gradienten (0 bis 500 mM Imidazol, Flussrate 0,7 ml/min), wobei 1 ml Fraktionen aufgefangen und analysiert wurden. 5 µl jeder Fraktion wurden mit 5 µl SDS-Gel-Probenpuffer versetzt, im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Brillant-Blau R250 Färbung visualisiert. Anhand des Molekulargewichtes wurden die Elutionsfraktionen des His-Tag-Proteins identifiziert, gepoolt und durch Zugabe von Puffer A auf eine Imidazol-Konzentration von unter 25 mM eingestellt. Dieses erste Proteinkonzentrat wurde wiederum auf die Ni²⁺-Sephrose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde in gleicher Weise gewaschen und eluiert. Nach Analyse der Proteinreinheit und -quantität mittels PAGE und Coomassie-Färbung wurden die geeigneten Elutionsfraktionen gepoolt, dialysiert und bei -70 °C eingelagert.

4. Material und Methoden

4.2.3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurde das „BCA™ Protein Assay Kit“ (Fa. Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Beim Bicinchoninsäure(BCA)-Assay wird eine Reaktion von 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure und Kupfersulfat mit den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinen genutzt. In der Reaktion werden zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff bilden. Die Absorption der Reaktionslösung bei einer Wellenlänge von 562 nm ist direkt mit der eingesetzten Proteinmenge korreliert.

Zuerst wurden die zu bestimmenden Proben 1:10, 1:50 und 1:100 mit PBS verdünnt. Eine BSA-Stammlösung der Konzentration 2 mg/ml (Fa. Pierce) diente zur Erstellung einer Standardkurve und wurde so mit PBS verdünnt, dass Proteinlösungen der Konzentrationen 500 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml und 5 µg/ml resultierten. Die BCA-Reagenzien A und B des Kits wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Jeweils 200 µl der Reaktionslösung wurden in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit je 25 µl der Protein-Standardlösungen bzw. 25 µl der Probenverdünnungen gemischt. Jede Einzelreaktion wurde im Doppelansatz durchgeführt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 60 °C wurde die Farbreaktion im ELISA-Reader als Extinktion bei 540 nm photometrisch ausgewertet und für jedes Reaktionspaar der Mittelwert bestimmt. Anhand der BSA-Standardkurve konnte die Proteinkonzentration der Probenlösungen errechnet werden.

4.2.3.7 Isotypisierung monoklonaler Antikörper

Zur Iso- und Subtypisierung von monoklonalen Antikörpern wurde ein kommerzielles Typisierungs-Kit (ImmunoPure®, Fa. Pierce) verwendet. Dieses Kit bestand aus spezifischen Antisera und gebrauchsfertigen ELISA-Reagenzien. Gemäß Herstellerprotokoll wurde die ELISA Oberfläche nach jedem der folgenden Arbeitsschritte dreimal mit PBS_{Tween} gewaschen. Zuerst wurden die betreffenden monoklonalen Antikörper aus Zellkultur-Überständen der betreffenden Hybridoma-Zelllinien an die Oberfläche von neun Vertiefungen einer ELISA-Platte gebunden. Zusätzlich wurde der mitgelieferte IgG1-Kontroll-Antikörper an die Oberfläche einer weiteren Vertiefung gebunden. Nach der Blockierung unbesetzter Bindungsstellen wurden polyvalente Kaninchenserum zugegeben (anti IgA, anti IgM, anti IgG1, anti IgG2a, anti IgG2b, anti IgG3, anti kappa light chain, anti lambda light chain, Negativkontrollserum). Durch Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase gekoppelten

4. Material und Methoden

Sekundärantikörpers (Ziege anti Kaninchen PO) und Entwicklung des ELISAs mit ABTS-Substrat erfolgte die Detektion der Antikörperbindung. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37 °C wurde die Extinktion der Reaktionsansätze im ELISA-Reader bei 540 nm photometrisch bestimmt.

4.2.4 Herstellung monoklonaler Antikörper

4.2.4.1 Immunisierung von Mäusen

Als Antigene für die Immunisierung von Mäusen dienten gereinigte His-Tag-Proteine (vgl. 4.2.3.5). Je drei weibliche 12 Wochen alte Balb/C-Mäuse wurden als Versuchsgruppe gemeinsam immunisiert und gehalten. Vor der ersten Immunisierung wurden die Tiere gekennzeichnet und 0,2 ml Normalserum (NS) pro Tier durch Punktion der Schwanzvene gewonnen. Zur Grundimmunisierung („Priming“, Tag 0) wurden 50 µg des betreffenden Proteins (gelöst oder suspendiert in 50 µl PBS) mit 50 µl „Freund`s Adjuvant, incomplete“ (Fa. Sigma) zu einer Emulsion gemischt und subkutan injiziert. An Tag 21, 42 und 63 wurden 40 µg des Proteins in einer gleichartigen Emulsion zur Folgeimmunisierung („Boost“) genutzt. An Tag 50 und 71 wurden Blutproben genommen, um die Serokonversion der Versuchstiere zu überprüfen. In Western-Blot-Analysen (Serumverdünung 1:5.000 und 1:10.000) wurden die Reaktivitäten von Normalseren und Immunsereen (IS1 und IS2) von allen drei Versuchstieren verglichen. Das Tier, das im Immunoblot die stärkste Reaktivität gezeigt hatte, wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 40 µg des Proteins ohne Beimischung eines Adjuvants immunisiert.

4.2.4.2 Präparation von Peritoneal-Zellen

Um das Wachstum von frisch-fusionierten Hybridoma-Zellklonen zu verbessern und die Ausbeute an Antikörper-produzierenden Klonen zu steigern, sollten dem Medium nach der Fusion Wachstumsfaktoren zugesetzt werden. Durch hohe FCS-Konzentrationen im Medium und eine Kokultivierung des Fusionsansatzes mit primären Peritoneal-Zellen wurden optimale Wachstumsbedingungen erzeugt. Dabei waren Peritoneal-Makrophagen von besonderer Bedeutung, da sie unter anderem Interleucin-6 freisetzen, das die Antikörperbildung stark stimuliert.

Einen Tag vor der eigentlichen Zellfusion wurde eine Balb/C-Maus nach CO₂-Betäubung durch zervikale Dislokation euthanasiert. Die Hautoberfläche der Maus wurde mittels 70 %igem Ethanol desinfiziert. Dann wurde die Maus unter einer Sterilbank auf einem

4. Material und Methoden

Operationsbrett fixiert. Die äußere Haut wurde über der „Linea alba“ mit einem Skalpell vom Xyphoid bis zur Beckenlinie eröffnet. Ein orthogonaler Entlastungsschnitt wurde auf mittlerer Höhe angelegt und die „Tunica flava abdominis“ freipräpariert, ohne die Bauchhöhle zu eröffnen. Dann wurden Faszie und Muskelschicht mit einer chirurgischen Pinzette angehoben und die Peritonealhöhle durch eine Stichinzision eröffnet, ohne die Bauchorgane dabei zu verletzen. Durch diese Öffnung wurden mit einer sterilen Glaspipette je 3 ml Hepes-Medium (500 ml DMEM-Medium mit 5 ml Hepes-Lösung [100 µl Hepes in 100 ml PBS]) in die Bauchhöhle eingegeben und achtsam mit den dabei abgeschilferten Zellen wieder aufgesogen. Nachdem auf diese Art 30 ml Peritonealzell-Suspension gewonnen worden waren, wurden die Zellen bei 300 g für 5 min bei RT pelletiert und in 200 ml HAT-Medium (200 ml DMEM, 100 ml F-10 Supplement [Fa. Gibco], 100 ml F-12 Supplement [Fa. Gibco], 75 ml FKS, 5 ml OPI-Supplement [Fa. Sigma], 10 ml HAT-Supplement [Fa. Sigma], 5 ml L-Glutamin [100 mM], 5 ml Hepes-Lösung [1M], 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin) aufgenommen. Je 100 µl Peritonealzell-Suspension pro Vertiefung wurden in 20 Zellkultur-Mikrotiterplatten ausplattiert und für 24 h im Brutschrank bis zur Zellfusion vorinkubiert.

4.2.4.3 Präparation von Splenocyten

Einen Tag nach der Adjuvant-freien Abschlussimmunisierung (s. 4.2.4.1) wurden die Mäuse mit CO₂ betäubt und durch zervikale Dislokation euthanasiert. Zur Organentnahme wurde die äußere Haut der Maus wiederum mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Daraufhin wurde die Maus unter der Sterilbank auf einem Operationsbrett fixiert. Nach der Eröffnung der äußeren Haut über dem Abdomen (s. 4.2.4.2) wurden Faszie und Muskulatur beckennah in der Medianen mit der Pinzette ergriffen. In diesem gedehnten Gewebe wurde die Bauchhöhle durch eine Stichinzision eröffnet. Dieser Zugang wurde entlang der „Linea alba“ mit einer abgerundeten Schere unter Schonung der Eingeweide bis zum Xyphoid erweitert. Durch einen beidseitigen orthogonalen Entlastungsschnitt wurde die Bauchwand mobilisiert, zur Seite gelagert und am Operationsbrett fixiert. Die Bauchorgane im linken oberen Quadranten waren nun zugänglich. Nach Verlagerung des Darms wurde die Milz von Magen, Pankreas und Bauchwand freipräpariert, wobei eine Durchtrennung der Milzkapsel vermieden wurde. Das Organ wurde unverzüglich in eine sterile Petrischale mit vorgewärmtem Hepes-Medium überführt. Nachdem anhaftende Bindegewebsreste entfernt worden waren, wurde der Milz-Hilus und der entgegengesetzte Pol der Organkapsel eröffnet. Daraufhin wurde die Milz in eine frische Petrischale überführt. Durch Einführung einer Pipettenspitze in die eine Inzision konnte Hepes-Medium in das Organ gespült werden, so dass auf der entgegengesetzten

4. Material und Methoden

Organseite eine zellreiche Suspension gewonnen werden konnte. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis makroskopisch keine Trübung des austretenden Hepes-Mediums mehr festzustellen war. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 37 °C inkubiert, so dass grobe Gewebsteile sedimentieren konnten. Der Überstand wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Hepes-Medium gewaschen, zentrifugiert (300 g für 5 min bei RT) und wiederum in 10 ml Hepes-Medium resuspendiert. Zur Ermittlung der Lymphozytenkonzentration dieser Suspension wurde ein Aliquot der Zellen mit Türks-Lösung angefärbt und ausgezählt (s. 4.2.2.2). Im Durchschnitt wurden pro Milz ca. 1×10^8 Lymphozyten gewonnen.

4.2.4.4 Zellfusion und Aussaat der Hybridoma-Zellen

Zur Generierung stabiler immortalisierter Hybridoma-Zelllinien (Taggart et al., 1983) wurden Plasmazellen aus der Milz immunisierter Balb/C-Mäuse mit Sp2/0-Ag14-Myelomzellen (ATCC Nr.: CRL-1581) fusioniert (Köhler et al., 1975; Köhler et al., 1976). Die Myelomzellen wurden vor der Fusion in Myelomzell-Medium (425 ml DMEM-Medium, 75 ml FKS, 5 ml L-Glutamin [100 mM], 1,75 ml β -Mercaptoethanol-Lösung [100 μ l β -Mercaptoethanol in 100 ml PBS], 5 ml Hepes-Lösung [1 M], 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin) angezogen. Vor der Präparation der Plasmazellen wurden die semiadhärenten Myelomzellen von den Zellkulturschalen ab gespült und durch Zentrifugation (300 g für 5 min bei RT) pelletiert. Daraufhin wurden die Myelomzellen in 10 ml Hepes-Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypan-Blau-Lösung angefärbt und in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Die aus der Milz extrahierten Lymphozyten (s. 4.2.4.3) wurden im Verhältnis 1:3 mit den frisch geernteten Myelomzellen gemischt und durch Zentrifugation (300 g für 5 min bei RT) pelletiert. Dieses Zellpellet wurde in einem Wasserbad bei 37 °C unter vorsichtigem Rühren mit 1 ml Polyethylenglycol 1.500 (PEG 1.500, Fa. Sigma) versetzt, wobei das PEG langsam, nach und nach, innerhalb von 60 s zugegeben wurde. Innerhalb der nächsten 60 s wurde 1 ml Hepes-Medium untergerührt, dann innerhalb von 90 s 3 ml Hepes-Medium und anschließend innerhalb von 2 min 10 ml Hepes-Medium hinzugefügt. Durch das Aufrühren des Zellpellets mit einer sterilen Pipettenspitze und durch die Einwirkung des PEG entstand eine inhomogene, klumpige Suspension. Diese Zellsuspension wurde bei 300 g für 5 min bei RT zentrifugiert und dann für weitere 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Zellpellet gründlich in 200 ml HAT-Medium

4. Material und Methoden

resuspendiert. Je 100 µl der Zellsuspension wurden in jede Vertiefung der vorbereiteten 20 Mikrotiter-Platten (s. 4.2.4.2) zu der Peritonealzell-Kultur gegeben. Die frisch fusionierten Zellen wurden für mindestens 7 Tage im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Platten einmal täglich mikroskopisch kontrolliert, wobei besonders auf bakteriologische und mykologische Kontaminationen geachtet wurde. Von Bakterien oder Pilzen befallene Vertiefungen wurden mit der Pipette entleert und mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Bei der mikroskopischen Kontrolle wurde außerdem das Absterben der gegen Aminopterin sensiblen Myelomzellen (s. 4.2.4.5) und das Auswachsen von neu generierten, immortalisierten Hybridoma-Zelllinien verfolgt. Abhängig von der Anzahl der präparierten Milz-Lymphozyten wuchsen im Durchschnitt 0,5 bis 4 klonale Hybridoma-Zelllinien pro Vertiefung aus.

4.2.4.5 Selektion der Hybridoma-Zellen

Primäre, nicht fusionierte Mauszellen aus Milz- oder Peritonealspülung mussten nicht negativ selektiert werden, da sie sich unter Zellkulturbedingungen nur wenige Male teilen können und daher nicht in Konkurrenz zu den auswachsenden Hybridoma-Zellen treten können. Zur negativen Selektion der Myelomzellen wurde die *de novo* Synthese von Nukleotiden durch Zugabe von Aminopterin unterbunden. Aminopterin ist ein Hemmstoff der Tetrahydrofolsäure, die als C₁-Gruppendonator (Methylierung) für die *de novo* Synthese der Purine und für die Synthese von Desoxythymidin-Monophosphat (dTMP) aus Uridin-Monophosphat benötigt wird. Die gleichzeitige Substitution von Hypoxanthin und Thymidin (HAT-Medium) ermöglichte weiterhin die Synthese von Purinen durch den „Salvage Pathway“, einen alternativen Stoffwechselfad. Dabei wird aus Hypoxanthin durch Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) Inosin-Monophosphat (IMP) gebildet, das in weiteren Syntheseschritten zu Guanosin- und Adenosin-Monophosphat umgesetzt werden kann. Die zur Fusion verwendete Myelom-Zelllinie Sp2/0-Ag14 verfügt über keine aktive HGPRT. Weil dieses Enzym ein essentieller Faktor im alternativen Purin-Stoffwechselfad ist, sterben alle Myelomzellen nach Zugabe von Aminopterin ab. In murinen Primärzellen und in fusionierten Hybridom-Zellen ist HGPRT aber aktiv, so dass diese Zellen die HAT-Selektion überleben (Asai et al., 1993). Nach der Fusion wurden die Zellen für insgesamt 14 Tage in Medium mit Aminopterin-Zusatz kultiviert. Nach der Aminopterin-Selektion wurden die Zellen zuerst weiterhin mit Hypoxanthin- und Thymidin-Zusätzen versorgt (HT-Medium: 200 ml DMEM, 100 ml F-10 Supplement [Fa. Gibco], 100 ml F-12 Supplement [Fa. Gibco], 75 ml FKS, 5 ml OPI-Supplement [Fa. Sigma], 10 ml HT-

4. Material und Methoden

Supplement [Fa. Sigma], 5 ml L-Glutamin [100 mM], 5 ml Hepes-Lösung [1M], 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin). Die weitere Kultur der Hybridomzellen erfolgte dann in einem speziellen Hybridommedium (200 ml DMEM, 100 ml F-10 Supplement [Fa. Gibco], 100 ml F-12 Supplement [Fa. Gibco], 75 ml FKS, 5 ml OPI-Supplement [Fa. Sigma], 5 ml L-Glutamin [100 mM], 5 ml Hepes-Lösung [1M], 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin), um eine stabile Antikörperproduktion zu gewährleisten.

4.2.4.6 ELISA zur Detektion monoklonaler Antikörper

Die Hybridom-Zellkulturüberstände wurden in einem indirekten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf Antikörper gegen das betreffende Protein untersucht (Engvall et al., 1971). Dabei wird das betreffende Antigen aus einer Lösung von der Reaktions-Oberfläche einer ELISA-Mikrotiterplatte adsorbiert. Freie Bindungsstellen dieser Reaktions-Oberfläche werden mit einem reaktionsneutralen Protein (z. B. BSA) blockiert. Antikörperhaltige Zellkulturüberstände werden im nächsten Schritt mit dem auf der ELISA-Platte immobilisierten Zielprotein inkubiert, so dass eine Bindung der zu untersuchenden (primären) Antikörper erfolgen kann. Die Menge an gebundenem Primärantikörper wird mit Hilfe eines speziesspezifischen Sekundärantikörpers bestimmt. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym konjugiert, das eine Farbreaktion katalysiert. Dieses Detektions-System bezeichnet man als indirekten ELISA, weil durch die Bindung des Sekundärantikörpers indirekt die Menge des gebundenen Primärantikörpers ermittelt wird. In den im Folgenden beschriebenen Versuchen diente Tetramethylbenzidin (TMB) als Chromogen der Detektions-Farbreaktion. Das farblose TMB wird dabei unter Katalyse der an den Sekundär-Antikörper gebundenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid zu einem löslichen blauen TMB-Radikalkation. Das instabile Radikal des TMB wird anschließend durch Reaktion mit Schwefelsäure zum stabilen gelben TMB-Kation umgesetzt. Dabei steht die Intensität der gelben Färbung in direkter Korrelation zur Menge des katalytischen Enzyms. Da die Peroxidase in der Reaktion an den Sekundär-Antikörper gekoppelt vorliegt, der seinerseits an den Primärantikörper gebunden ist, besteht eine direkte Korrelation zwischen Farbtintensität und gebundener Primärantikörpermenge.

Anhand der Reaktivität eines murinen anti-His mAbs wurden indirekte Screening-ELISAs zur Detektion von Antikörpern gegen die betreffende His-Tag-Proteine etabliert. Diese ELISA wurden zusätzlich mit den während der Immunisierung der Versuchstiere gewonnenen Präimmun- und Immunsereen optimiert. Dabei wurden Adsorptionsoberflächen, Coating-

4. Material und Methoden

Bedingungen (Proteinkonzentration und Lösungspuffer), Blockierungsreagenzien (Konzentration von BSA, FKS) und Sekundärantikörper-Konzentration auf das jeweilige His-Tag-Protein abgestimmt.

In diesen Vorversuchen wurden die His-Tag-Protein-Konzentrate in ELISA Coating-Puffer (0,1 M Na₂CO₂ / NaHCO₂, pH 9,5) zu einer Protein-Endkonzentration von 0,2 bis 3 µg/ml verdünnt. ELISA-Platten wurden auf -20 °C eingefroren und bei RT aufgetaut. Nachdem sich durch die Luftfeuchtigkeit in den Vertiefungen ein Flüssigkeitsfilm gebildet hatte, wurden sie mit 100 µl der Coating-Lösung beschickt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Coating-Lösung wurde am nächsten Morgen entfernt und jede Vertiefung mit 200 µl PBS_{Tween} gewaschen. Die Blockierung der Vertiefungen erfolgte für 1 h bei 37 °C mit 150 µl einer 2 %igen BSA-PBS_{Tween}-Lösung, einer 10 %igen FKS-PBS_{Tween}-Lösung, einer 4 %igen Milchpulver-PBS_{Tween}-Lösung oder einer 10%igen Roti[®]-Block-Lösung (Fa. Carl Roth). Die Platten wurden daraufhin drei Mal mit 200 µl PBS_{Tween} gewaschen und bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (maximal für 4 Wochen). Der Zellkulturüberstand des murinen anti-Penta-His mAks wurde 1:5 in PBS_{Tween} verdünnt und als Positivkontrolle verwendet. Gleichzeitig wurde der Zellkulturüberstand eines Hybridoms, das einen monoklonalen Antikörper produziert, der nicht mit dem Zielprotein reagiert, ebenfalls 1:5 in PBS_{Tween} verdünnt und als Negativkontrolle eingesetzt. Die Präimmun- und Immunsereen der Versuchstiere dienten als weitere Kontrollen und wurden in den Verdünnungen 1:100, 1:500, 1:1.000 und 1:5.000 eingesetzt.

Je 100 µl der verdünnten Reagenzien wurden in die Vertiefungen der vorbereiteten ELISA-Platten gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 200 µl PBS_{Tween} wurde 100 µl der Sekundärantikörper-Lösung in die ELISA-Platten-Vertiefung gegeben. Dabei wurden polyklonale, Meerrettich-Peroxidase konjugierte, anti-Maus Antikörper (HRPO goat anti mouse IgG und HRPO donkey anti mouse IgG, beide Fa. Dianova, beide Stocklösungen 1 mg/ml) in den Verdünnungen 1:1.000, 1:2.000 und 1:5.000 eingesetzt. Nach drei Waschschritten mit 200 µl PBS_{Tween} wurden 100 µl Tetramethylbenzidin-Substrat (9 ml TMB-Puffer [100 mM Na-Acetat], 1 ml TMB-Lösung [10 mg TMB in 4 ml DMSO], 1,5 µl H₂O₂) in die Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Diese Platten wurden für 10 bis 15 min bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 25 %iger (v/v) Schwefelsäure gestoppt. Die Intensität der

4. Material und Methoden

Reaktion wurde als Extinktion der Lösungen bei einer Wellenlänge von 430 nm im ELISA-Reader (Spectra II, Fa. SLT) gemessen.

Zuerst wurden Verdünnungsreihen des Test-Antigens mit den unterschiedlichen Blockierungsreagenzien auf ELISA-Platten adsorbiert. Der ELISA wurde mit Penta-anti-His mAk und einem nicht reaktiven mAk inkubiert und wie oben beschrieben entwickelt. Für die unterschiedlichen Blockierungen wurde so die niedrigste Antigen-Konzentration ermittelt, bei der größtmögliche Intensitätsunterschiede zwischen spezifischer und unspezifischer Antikörperbindung auftraten. Antigen-Konzentration und Blockierung wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen der Präimmun- und Immunseren noch einmal überprüft, um Signalintensität und Reaktionshintergrund weiter zu optimieren. Schließlich wurde überprüft, ob Veränderungen der Sekundärantikörper-Konzentration die Differenz der Reaktionsintensität zwischen spezifischen und unspezifischen Immunreaktion vergrößerten. Mit Hilfe der Vorversuche wurden die ELISA so eingestellt, dass auch hohe Konzentrationen der negativen Seren und negativen mAk keine höhere OD_{430} als 0,2 erreichten, wobei selbst niedrige Konzentrationen der Immunseren und des Penta-anti-His mAks eine OD_{430} von über 0,8 zeigten.

Nach der Aussaat der Zellfusion wurde die Entwicklung der auswachsenden Hybridoma-Zelllinien täglich kontrolliert. Sobald durch Zellteilung klonale Kolonien von durchschnittlich 50 Einzelzellen entstanden waren (7 bis 12 Tage nach der Fusion), wurden die Zellkulturüberstände aus allen Vertiefungen vollständig abgenommen und 200 μ l frisches HAT-Medium zugegeben. Zwei Tage nach diesem Medium-Wechsel wurden die Zellkultur-Überstände der Hybridoma-Zelllinien im ELISA auf Antikörper gegen das betreffende Antigen getestet. Dazu wurde der oben beschriebene, optimierte ELISA mit 100 μ l der Zellkulturüberstände durchgeführt. Die Hybridoma-Kulturen wurden mit 100 μ l frischem Medium versorgt, um sie am folgenden Tag ein zweites Mal im ELISA zu testen. Alle Vertiefungen der Zellkulturschalen, die in beiden Screening-ELISAs OD_{430} Werte von über 0,8 aufwiesen, wurden vorläufig als positiv beurteilt.

4.2.4.7 Klonierung und Stabilisierung der Hybridoma-Klone

Die ELISA-positiven Vertiefungen der Zellkulturschalen wurden mikroskopisch beurteilt. Die Position der klonalen Zelllinien wurde mit einem Filzschreiber an der Unterseite der Kulturschale markiert. Mit einer 10 μ l Pipette wurden Zellen aus diesen Kolonien unter der Sterilwerkbank abgesaugt und in einer seriellen Verdünnungsreihe auf einer frischen

4. Material und Methoden

Zellkulturplatte ausgesät. Nachdem sich die Zellen auf den Boden der Zellkulturschale abgesenkt hatten, wurden sie am nächsten Tag mikroskopisch beurteilt. Nach den ersten Zellteilungen wurden Vertiefungen, in denen aus einer einzelnen Zelle eine Kolonie entstanden war, markiert. Nach 7 bis 10 Tagen wurden die Vereinzlungsreihen der positiven Klone erneut im Screening-ELISA getestet. Falls die gesamte Vereinzlungsreihe positive ELISA-Resultate zeigte, die mit der Zellzahl in den Vertiefungen linear abnahmen, und ein markierter Einzelzellklon vorlag, wurde dieser Klon in einer Vertiefung einer 6-well Zellkulturschale expandiert. Der Zellkulturüberstand des expandierten Hybridoms wurde dann zur weiteren Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers (ELISA gegen die Blockierung, Immunoblot, u.s.w.) genutzt. Falls der betreffende monoklonale Antikörper die erwünschten Eigenschaften aufwies, wurde das Hybridom nach der Expansions- und Stabilisierungsphase ein weiteres Mal selektiert, erneut expandiert und in drei Replikaten eingefroren.

Bei Hybridomen, die als Mischklone vorlagen oder keine stabile Antikörperproduktion aufwiesen, wurde eine positive Einzelzellkolonie ohne Expansionsphase unverzüglich weiter selektiert und getestet. Erst nach drei Selektionsrunden wurde ein ELISA positiver Klon expandiert. Falls keine positive Einzelzellkolonie vorlag, wurden Einzelzellen aus einer positiven Vertiefung der Vereinzlungsreihe in jeweils eine Vertiefung einer 96-well Zellkulturplatte ausplattiert und getestet. ELISA positive Einzelzellkolonien wurden, wie beschreiben, weiter selektiert.

4.2.4.8 Produktion monoklonaler Antikörper

Selektierte und stabilisierte Hybridoma-Klone, die einen Antikörper mit hoher Reaktivität gegen das entsprechende pestivirale Protein produzierten, wurden auf 25 cm Zellkulturschalen expandiert. Auch nachdem die Zellen ausgewachsen waren und eine sehr hohe Dichte erreicht hatten, wurden sie bis zum Absterben im gleichen Medium belassen. Diese Zellkulturüberstände wurden durch Zentrifugation (300 g für 10 min bei RT) geklärt, durch einen 0,45 µl Sterilfilter filtriert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

5. Ergebnisse

5.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen KSPV NS2

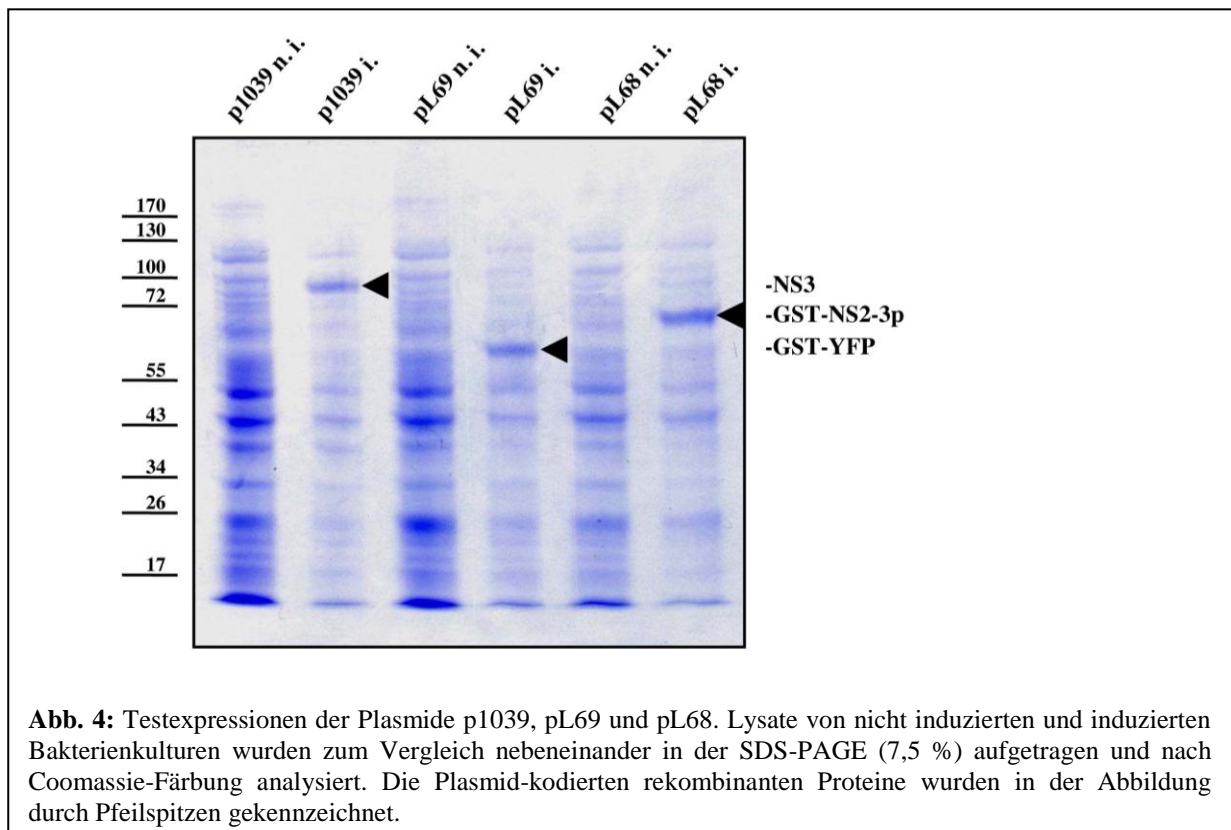
Das Nichtstrukturprotein 2 (NS2) des KSPV besteht aus 456 Aminosäuren, hat eine Molekülmasse von 52 kDa und einen p*K*_i von 9,35. Der N-Terminus des reifen Proteins entsteht durch eine proteolytische Spaltung der zellulären Signal-Peptidase zwischen Glycin und Lysin (AS 1133/2234), während der C-Terminus durch eine autokatalytische Abspaltung von NS3 zwischen Arginin und Glycin (AS 1589/1590) entsteht, die durch die NS2-Protease vermittelt wird (Lackner et al., 2004). Die NS2-3 Spaltung ist essentiell für die virale Replikation, während das ungespaltene NS2-3 Molekül unabdingbar ist für die Bildung infektiöser Virionen (Moulin et al., 2007 and Agapov et al., 2004). Sowohl NS2-3, als auch NS2 sind eng assoziiert mit intrazellulären Membranen, wahrscheinlich weil die N-terminale Hälfte von NS2 sehr hydrophob ist und mehrere vorhergesagte Transmembrandomänen beinhaltet. Subzelluläre Lokalisation, Membrantopologie und biochemische Eigenschaften von NS2 konnten bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Abgesehen von der NS2 Autoprotease und einer ungeklärten Funktion von NS2-3 bei der Bildung der Virionen ist nur wenig über NS2 bekannt. Weder polyklonale Seren noch monoklonale Antikörper gegen pestivirales NS2 wurden bislang vorgestellt, so dass ein direkter Nachweis des Proteins in infizierten Zellen nicht möglich war. NS2 ist unlöslich und sogar toxisch für Bakterien, so dass alle Versuche scheiterten, das vollständige Protein in Bakterien zu exprimieren. Orientierende Versuche zeigten, dass eine Deletion des hydrophoben N-Terminus von NS2 eine minimale Proteinexpression in Bakterien ermöglicht. Zur Verbesserung der Expression wurde das C-terminale NS2-Fragment mit Glutathion-S-Transferase am N-Terminus und der Protease-Domäne von NS3 am C-Terminus fusioniert.

5.1.1 Klonierung und Expression eines GST-NS2-3p-Fusionsproteins, eines GST-YFP-Fusionsproteins und von NS3

Die Nukleotidsequenz der Aminosäuren 1435 bis 1780, d. h. der C-Terminus von NS2 und der N-Terminus von NS3 (Protease Domäne – NS3p) von KSPV Alfort/Tübingen wurde in das Plasmid pGEX6P-1 eingesetzt. Die KSPV Sequenz wurde so in ein bestehendes Leseraster inseriert, dass sie auf das 3'-Ende der für GST kodierenden Sequenz folgt. Am 5'-Ende dieses GST-NS2-NS3p Leserasters schließt eine für 7 Histidine kodierende Sequenz (C-terminales 7His-Tag) an, die eine Ni²⁺-Ionen-Affinitätsreinigung des kodierten Fusionsproteins ermöglicht. Zur Unterscheidung der generierten Antikörper wurde ein GST-Fusionsprotein vergleichbarer Größe benötigt. Dazu wurde in den Vektor pGEX6P in die

5. Ergebnisse

gleiche Insertionsposition die Nukleotidsequenz des „yellow fluorescent proteins“ (YFP, Shimomura et al., 1962) integriert, so dass ein GST-YFP-Fusionsprotein mit einem C-terminalen 7His-Tag (pL69) entstand. Außerdem wurde die Nukleotidsequenz des gesamten KSPV NS3 (AS 1590-2272) mit einem N-terminalen 7His-Tag in das Expressionsplasmid pET11a eingesetzt (p1039). Die Plasmide wurden vor der Expression durch analytischen DNS-Verdau und DNS-Sequenzierung überprüft.



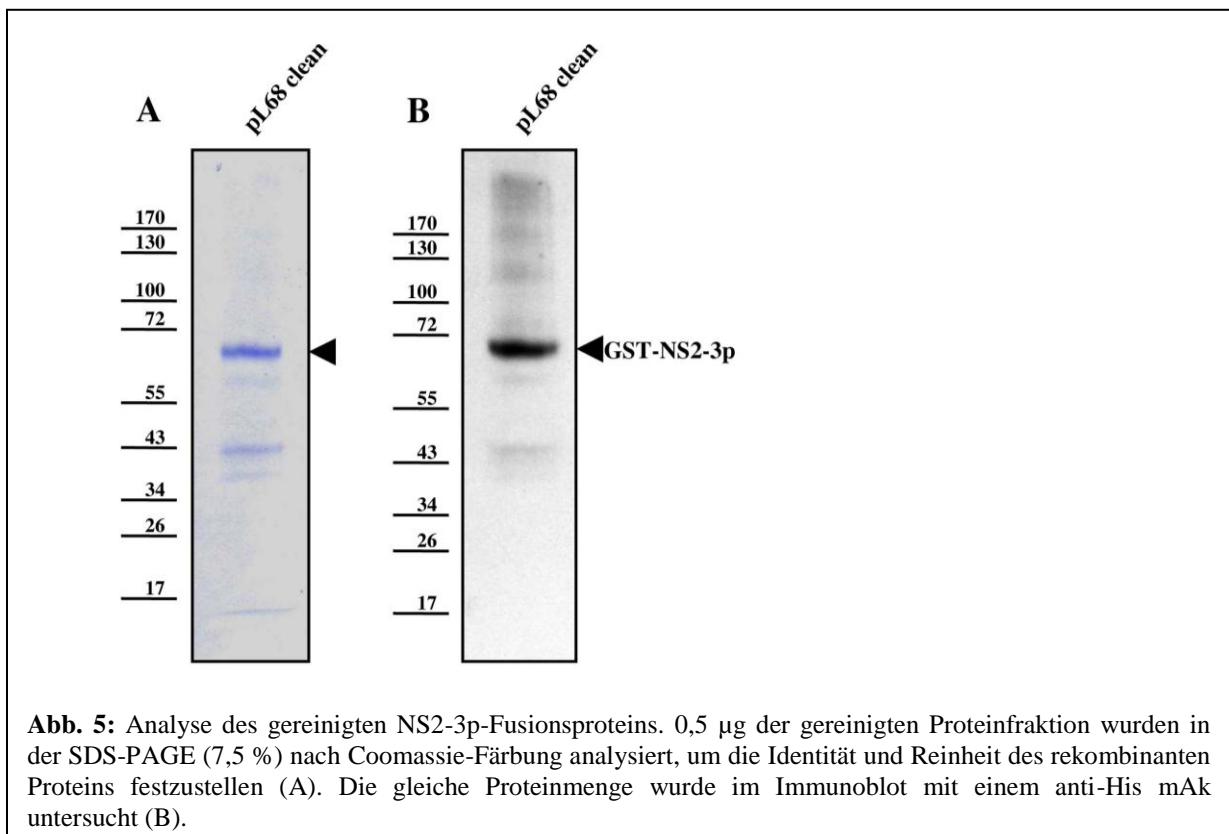
Nach Induktion konnte die Überexpression von NS3 (p1039, bMW: 76,9 kDa) und des GST-YFP-Fusionsproteins (pL69, bMW: 54,7 kDa) durch Anfärbung der zellulären Proteine detektiert werden. Im Falle von GST-NS2-3p (pL68, bMW: 66,1 kDa) konnte im Gesamtprotein der Bakterienzellen ebenfalls eine starke Expressionsbande beobachtet werden, die der berechneten Größe des rekombinanten Proteins entsprach (Abb. 4). Zur eindeutigen Identifizierung wurden die rekombinanten Proteine im Immunoblot mit Hilfe eines murinen anti-His mAbs nachgewiesen.

5.1.2 Reinigung des GST-NS2-3p-Fusionsproteins

Die bakterielle Proteinexpression wurde für 2 h bei 30 °C durchgeführt und die Bakterien durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Nach der Zellyse (1 % Triton-X 100, 3-faches Frieren/Tauen und Ultraschall-Behandlung) wurden lösliche und unlösliche

5. Ergebnisse

Bestandteile des Lysates durch Ultrazentrifugation (100.000 g, 1 h, 4 °C) aufgetrennt. Das GST-NS2-3-Fusionsprotein befand sich ausschließlich im unlöslichen Pellet. Immunoblot-Analysen zeigten, dass sich die Löslichkeit auch durch Verwendung anderer Tenside (1 % Chaps, 1 % NP-40, 1 % Octyl-Glykosid) nicht steigern ließ. Daher wurde das unlösliche Proteinpellet in 8 M Harnstoff solubilisiert und mit denaturierender IMAC gereinigt. Das GST-NS2-3p-Fusionsprotein konnte im 8 M Harnstoff-Puffer A quantitativ an die Ni²⁺-Affinitätsmatrix gebunden werden. Bei einer Konzentration von 250 mM Imidazol eluierte das Protein zusammen mit einem Abbauprodukt von der Matrix.



Orientierende Versuche zur Löslichkeit des GST-NS2-3p-Fusionsproteins ergaben, dass für eine Solubilisierung eine Harnstoff-Konzentration von mindestens 6 M benötigt wird. Die Protein-Elutionsfraktionen der chromatographischen Reinigung wurden vereinigt und im Verhältnis 1:4 mit PBS versetzt. Nach Durchmischung bildete sich ein unlöslicher Niederschlag, der durch Zentrifugation geerntet wurde. Überstand und Niederschlag dieser Fällung wurden im Immunoblot analysiert. Im Überstand der Fällung war das Zielprotein nicht nachweisbar, so dass ein quantitativer Ausfall des GST-NS2-3p-Fusionsprotein erfolgte. Das ausgefällte Protein wurde in 2 ml PBS resuspendiert. Ein Aliquot der Resuspension wurde durch Zugabe von Harnstoff resolubilisiert und die enthaltene Proteinmenge im BCA-

5. Ergebnisse

Assay bestimmt. Insgesamt wurden durch eine solche Reinigung 0,8 mg des GST-NS2-3-Fusionsproteins mit einem Reinheitsgrad von ca. 80 % präpariert (Abb. 5).

Eine bakterielle Expression von GST-NS2-3p (pL68), GST-YFP (pL69) und NS3 (p1039) wurde in 2 ml für 2 h bei 37 °C durchgeführt, die Bakterien durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C) geerntet, das Bakterienpellet in 250 µl H₂O resuspendiert und eine Zelllyse durch Zugabe von 250 µl SDS-PAGE Puffer herbeigeführt. Diese Zelllysate wurden in vergleichenden Immunoblotanalysen verwendet, um die Spezifität der generierten Antikörper zu überprüfen.

5.1.3 Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen GST-NS2-NS3p

Zwei 12 Wochen alte Mäuse des Stamms „Balb/C“ wurden mit jeweils 50 µg des gereinigten denaturierten GST-NS2-3p-Fusionsproteins mit inkompletem „Freund's Adjuvant“ immunisiert. Die Folgeimmunisierungen erfolgten nach drei und sechs Wochen mit 40 µg des Proteins. Am 50. Tag des Immunisierungsschemas konnte eine Serokonversion bei beiden Versuchstieren im Immunoblot detektiert werden. Die Reaktivitäten von Präimmun- und Immunseren gegen Lysate von induzierten und nicht induzierten pL68-Bakterienkulturen wurde hierzu verglichen (Abb. 6). Die Versuchstiere wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 40 µg des denaturierten Proteins immunisiert und am darauffolgenden Tag euthanasiert. Nach chirurgischer Extraktion der Milz wurden Lymphozyten aus der Milzpulpa gespült und mit Sp2/0-Ag14 Zellen fusioniert. Bei beiden Fusionen wurden ungefähr 3.000 Hybridoma-Zelllinien generiert.

In einem Screening-ELISA wurde die Reaktivität der Hybridoma-Zellkulturüberstände gegen das GST-NS2-3p-Fusionsprotein getestet. Dazu wurden pro ELISA-Vertiefung ca. 100 ng des in 8 M Harnstoff-Puffer A/B₂₅₀ gelösten Proteins gecoatet. Orientierende Versuche hatten gezeigt, dass eine effektive Beschichtung der ELISA-Oberflächen mit dem Fusionsproteins sehr schwierig zu erreichen war. Die besten Resultate wurden erzielt, wenn die harnstoffhaltige Proteinlösung (500 µg/ml) in einer Verdünnung von 1:1000 direkt in den salzarmen ELISA-Coating-Puffer pipettiert und die Lösung dabei gleichzeitig kräftig durchgerührt wurde. Wenn der Coating-Ansatz zu lange stand, bildete sich ein feiner Niederschlag, der bei weiterem Rühren aggregierte. Daher wurden 200 µl des Coating-Ansatzes (100 ng des Proteins) unverzüglich in die ELISA-Vertiefungen gegeben und 12 h bei 4 °C inkubiert. Mit dieser Coating-Methode erreichten Test-ELISA mit anti-His mAk und

5. Ergebnisse

mit den Immunsereen der Versuchstiere OD-Werte von über 2,0. Gleichzeitig blieben die OD-Werte in negativen Kontroll-ELISAs mit einem anti-E2 mAk (A18) und den Präimmunsereen der Versuchstiere unter 0,3.

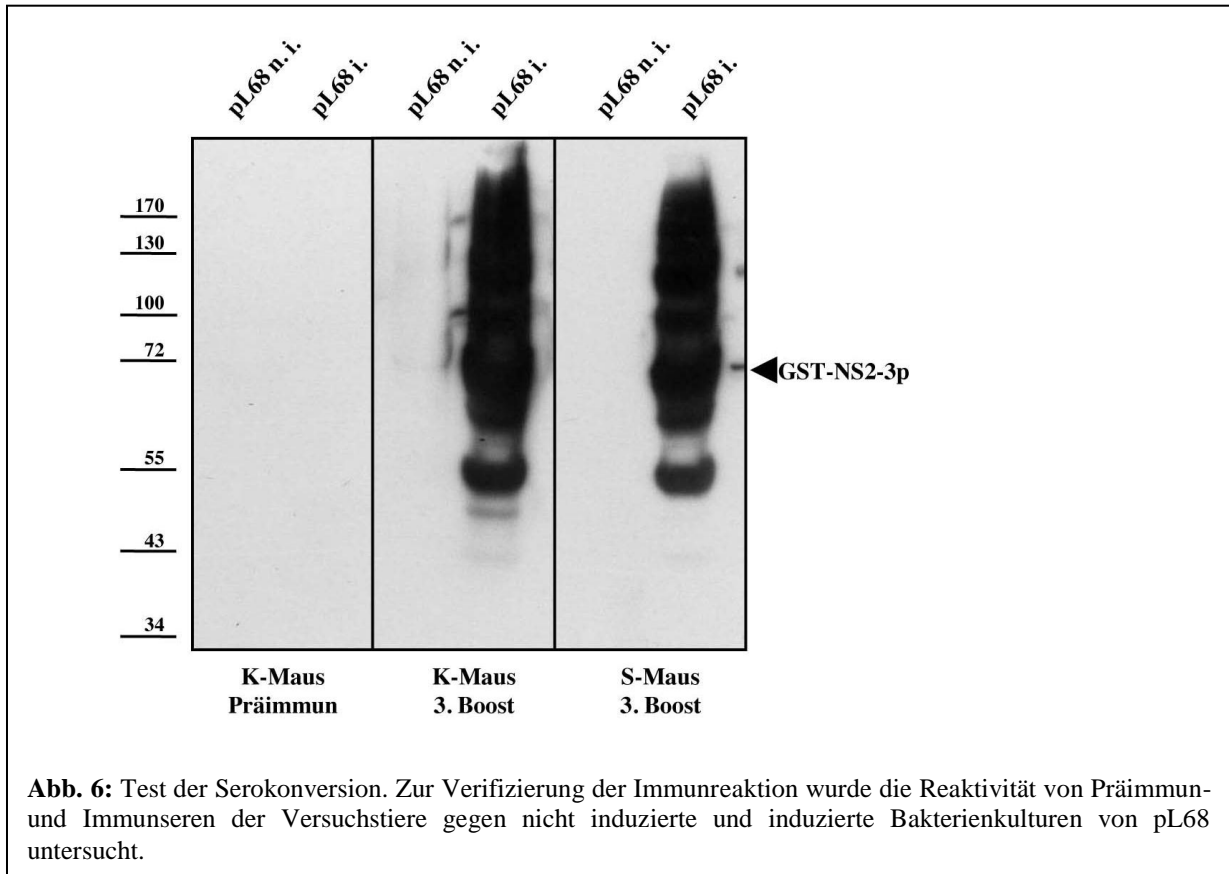


Abb. 6: Test der Serokonversion. Zur Verifizierung der Immunreaktion wurde die Reaktivität von Präimmun- und Immunsereen der Versuchstiere gegen nicht induzierte und induzierte Bakterienkulturen von pL68 untersucht.

Insgesamt wurden in beiden Fusionen durch den beschriebenen Screening-ELISA sechs Zellkulturplatten-Vertiefungen identifiziert, die Antikörper gegen das Zielprotein enthielten. Aus diesen Zellkulturen wurden 9 einzelne Hybridoma-Zelllinien kloniert. Die Überstände der klonierten Zelllinien wurden im ELISA erneut gegen das GST-NS2-3p Fusionsprotein getestet. Daraufhin wurde die Reaktion der positiven Zellkulturüberstände im Immunoblot gegen das GST-NS2-3p Fusionsprotein, gegen GST-YFP und gegen das komplette KSPV NS3 untersucht.

Zwei der Zellkulturüberstände zeigten spezifische Reaktionen mit bakteriellen Kontaminationsproteinen und wurden deshalb nicht weiter untersucht. Zwei Hybridome reagierten neben dem GST-NS2-3p Fusionsprotein auch mit GST-YFP, aber nicht mit KSPV NS3 und waren somit gegen den GST-Anteil des Fusionsproteins gerichtet. Drei Hybridoma-Klone wurden gefunden, die mit dem GST-NS2-3p Fusionsprotein, aber weder mit GST-YFP noch mit KSPV NS3 reagierten, folglich gegen den NS2-Anteil des Fusionsproteins gerichtet

5. Ergebnisse

waren. Zwei weitere Hybridome zeigten eine Reaktion mit dem GST-NS2-3p Fusionsprotein und mit NS3, aber nicht mit GST-YFP, so dass auf eine spezifische Reaktivität gegen die Protease-Domäne von NS3 geschlossen werden konnte (Abb. 7). Die Nomenklatur der Hybridoma-Zelllinien, Typisierung und Reaktivitäten der Antikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

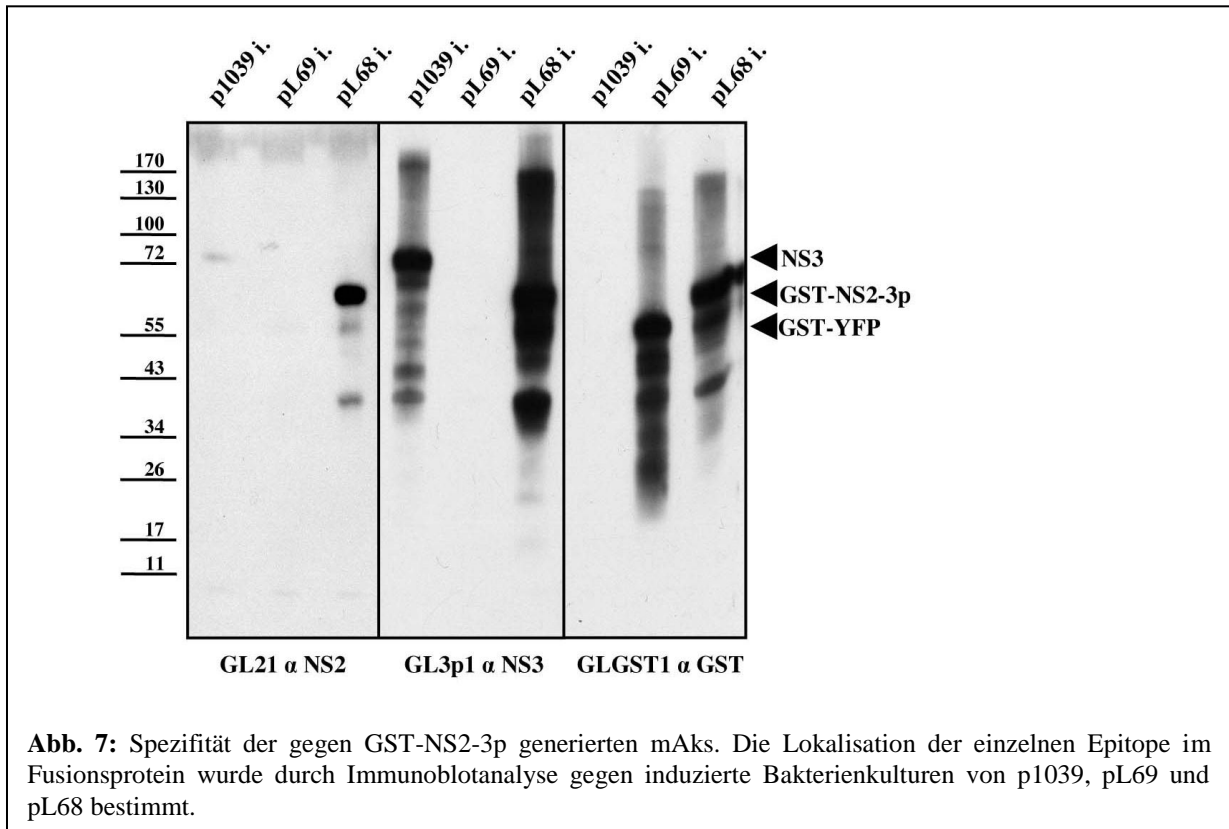


Tabelle 2:

Hybridom	Well (Fusion)	Spezifität	Subtyp	Reaktivität IB = Immunoblot, IF = Immunfluoreszenz, IP = Immunpräzipitation
GL21	9D11 (I.)	NS2	IgG1	IB, IF, IP
GL22	9B7 (II.)	NS2	IgG1	IB, IF, IP
GL23	17D12 (I.)	NS2	IgG1	IB
GL3p1	18H5 (I.)	NS3p	IgG1	IB, IP
GL3p2	4G6 (I.)	NS3p	IgG1	IB, IP
GLGST1	8H10 (I.)	GST	IgG1	IB
GLGST2	12A9 (I.)	GST	IgG1	IB

5. Ergebnisse

Die Hybridome GL21 (9D11) und GL23 (17D11) wurden in der ersten Fusion und GL22 (9B7) im zweiten Fusionsexperiment generiert (zwei verschiedene Versuchstiere). Alle drei Hybridome sezernieren Antikörper der Subklasse IgG1, die gegen KSPV NS2 gerichtet sind. Die von den Hybridomen GL3p1 (4G6) und GL3p2 (18H5) sezernierten Antikörper, die gegen die Protease-Domäne von NS3 gerichtet sind, produzieren Antikörper der Subklasse IgG1 und entstammten der ersten Fusion.

5.2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen ein C-terminales Fragment der Helikase von KSPV NS3

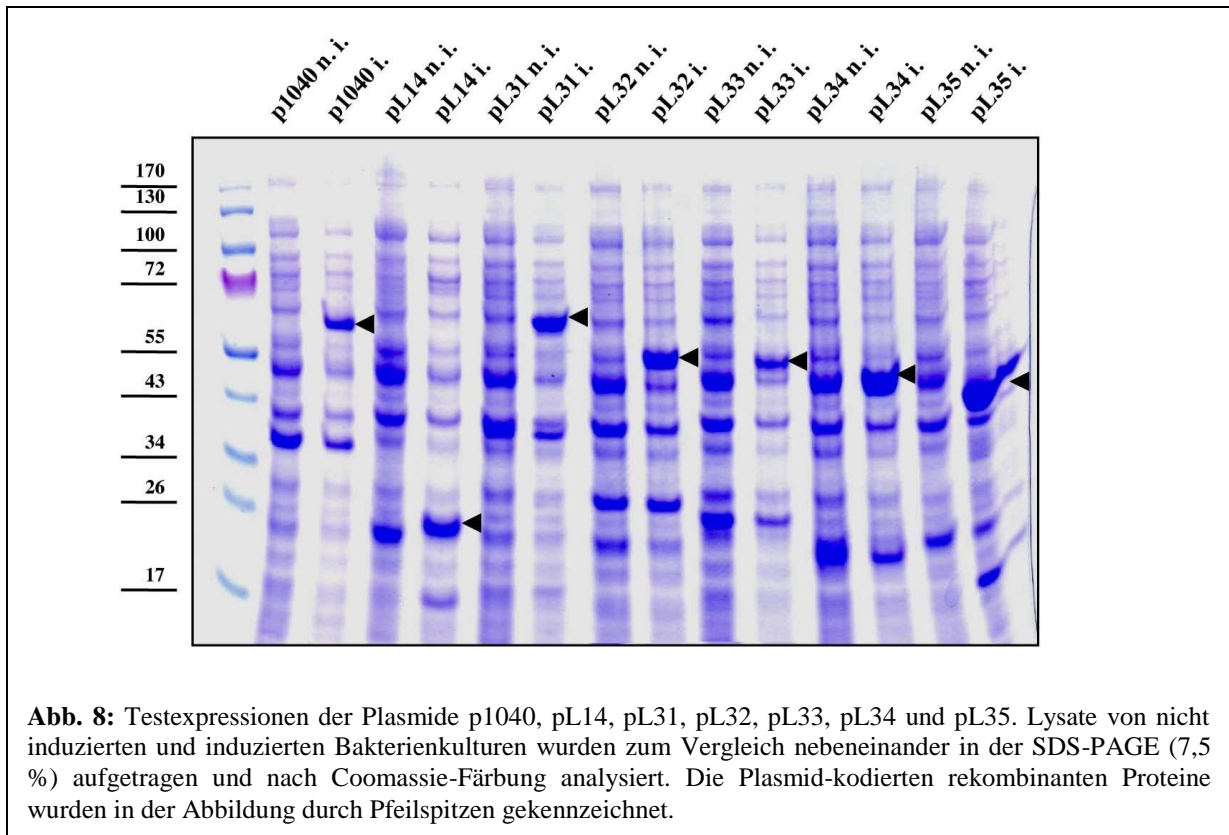
Das Nichtstrukturprotein 3 (NS3) des KSPV besteht aus 683 Aminosäuren, hat eine berechnete Molekülmasse von 75,7 kDa und einen p*K*_i von 8,22. Der N-Terminus des reifen Proteins wird von der NS2 Autoprotease und einem zellulären J-Domänen Protein (JIV) durch proteolytische Spaltung zwischen Arginin und Glycin (AS 1589/1590) generiert (Lackner et al., 2004). Der C-Terminus von NS3 wird autokatalytisch durch eine *cis*-Spaltung der NS3-Serinprotease zwischen Leucin und Serin (AS 2272/2273) gebildet durch Abspaltung von NS4A. NS3 ist ein multifunktionelles Protein. Im N-Terminus von NS3 wurde eine Serinprotease-Domäne identifiziert, die zusammen mit dem Kofaktor NS4A an L/S und L/A Motiven die endoproteolytischen Spaltungen zwischen NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A und NS5A/NS5B katalysiert (Tautz et al., 1997). Der C-Terminus von NS3 besitzt NTPase- und Helikase-Aktivität (Warrener et al., 1995 and Tamura et al., 1993). Nach Infektion mit Pestiviren entwickeln die natürlichen Wirtsspezies eine Immunreaktion gegen NS3, die zur Diagnostik genutzt werden kann. Monoklonale Antikörper gegen pestivirales NS3 wurden schon früh erzeugt (Corapi et al., 1990). Die Aminosäuresequenz von NS3 ist innerhalb des Genus Pestivirus hoch konserviert. Daher ermöglichen einige monoklonale Antikörper gegen NS3 eine speziesübergreifende Detektion von Pestiviren. NS3 kann als vollständiges Protein in Bakterien exprimiert werden. Durch die bereits vorhandenen mAk ergaben sich Hinweise auf eine interne Spaltung innerhalb des NS3-Moleküls. Um neben den beschriebenen Antikörpern gegen den N-Terminus von NS3 auch Reagenzien zu generieren, die den C-Terminus des Moleküls nachweisen, wurde ein C-terminales Fragment der Helikase exprimiert.

5.2.1 Klonierung und Expression des C-terminalen NS3-Helikase-Fragments

Die Sequenz der KSPV NS3-Helikase (Domänen 1, 2 und 3 der NS3-Helikase; AS 1782-2272) wurde in das Expressionsplasmid pet11a eingesetzt. Dabei wurde die Proteinsequenz so

5. Ergebnisse

in ein Leseraster integriert, dass ein Protein der AS-Sequenz MASHHHHHHH-NS3h kodiert wurde (p1040).



Zur Immunisierung der Versuchstiere wurde die C-terminale Domäne der NS3-Helikase (NS3hd3) ausgewählt. Per PCR wurden die beiden N-terminalen Domänen der NS3-Helikase aus dem Plasmid p1040 deletiert und das Expressionsplasmid pL14 generiert, dass ein C-terminales NS3-Helikase-Fragment (AS 2108-2272) kodiert. Zur Kartierung der monoklonalen Antikörper wurde zusätzlich in gleicher Weise eine Serie C-terminaler Verkürzungen der gesamten NS3-Helikase (p1040) generiert, so dass die Plasmide pL31 (AS 1782-2264), pL32 (AS 1782-2234), pL33 (AS 1782-2207), pL34 (AS 1782-2174) und pL35 (AS 1782-2144) entstanden. Anhand dieser C-terminalen Deletionen der NS3-Helikase wurde die Reaktivität der generierten mAk untersucht. Alle Plasmide wurden vor der Expression durch analytischen DNS-Verdau und DNS-Sequenzierung überprüft.

Nach Induktion konnte die Überexpression der gesamten NS3-Helikase (p1040, bMW: 56,1 kDa), der C-terminalen NS3-Helikase-Domäne (pL14, bMW: 20,0 kDa) und der C-terminalen Verkürzungen der NS3-Helikase (pL31, bMW: 55,3 kDa; pL32, bMW: 52,1 kDa; pL33, bMW: 49,0 kDa; pL34, bMW: 45,3 kDa; pL35, bMW: 41,7 kDa) in der SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung der zellulären Proteine detektiert werden (Abb. 8). Zur eindeutigen

5. Ergebnisse

Identifizierung wurden die rekombinanten Proteine im Immunoblot mit Hilfe eines murinen anti-His mAks nachgewiesen (Abb. 9).

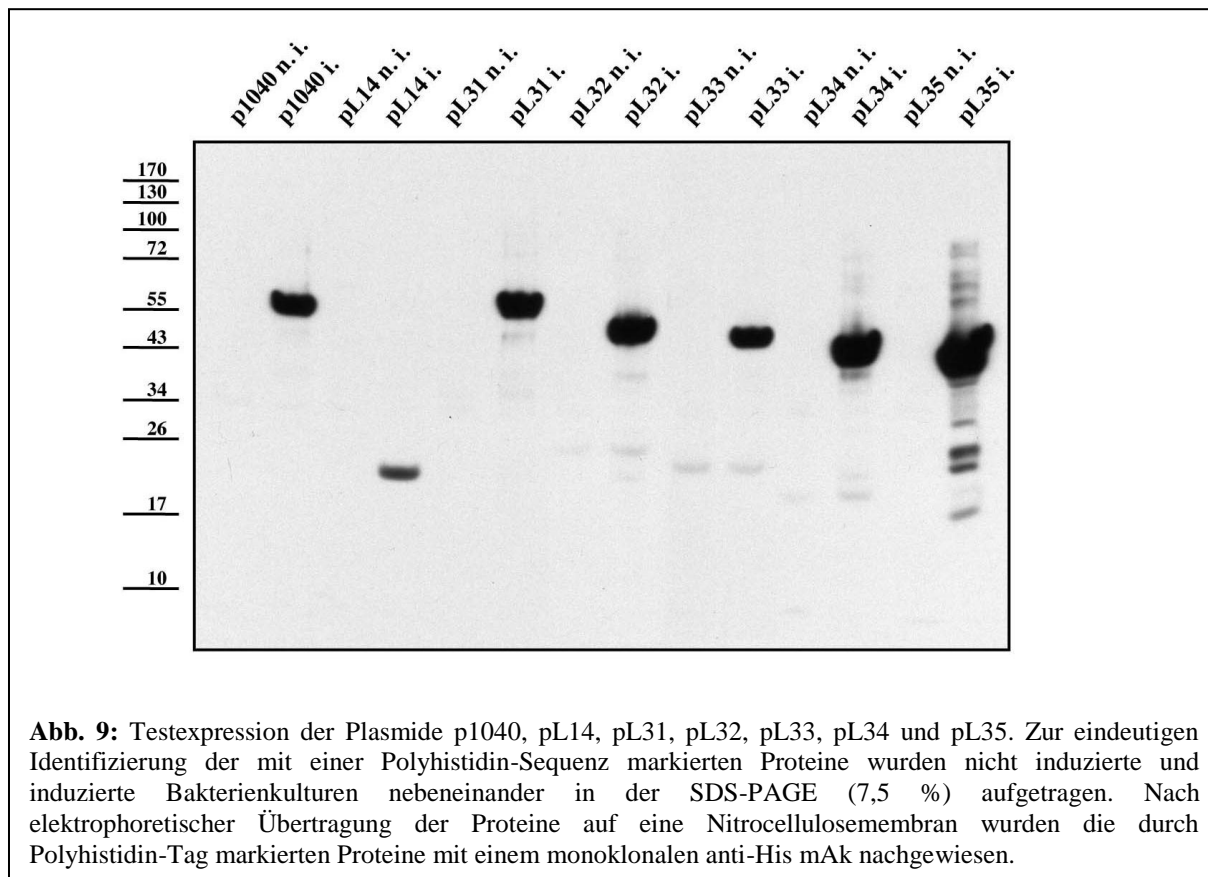


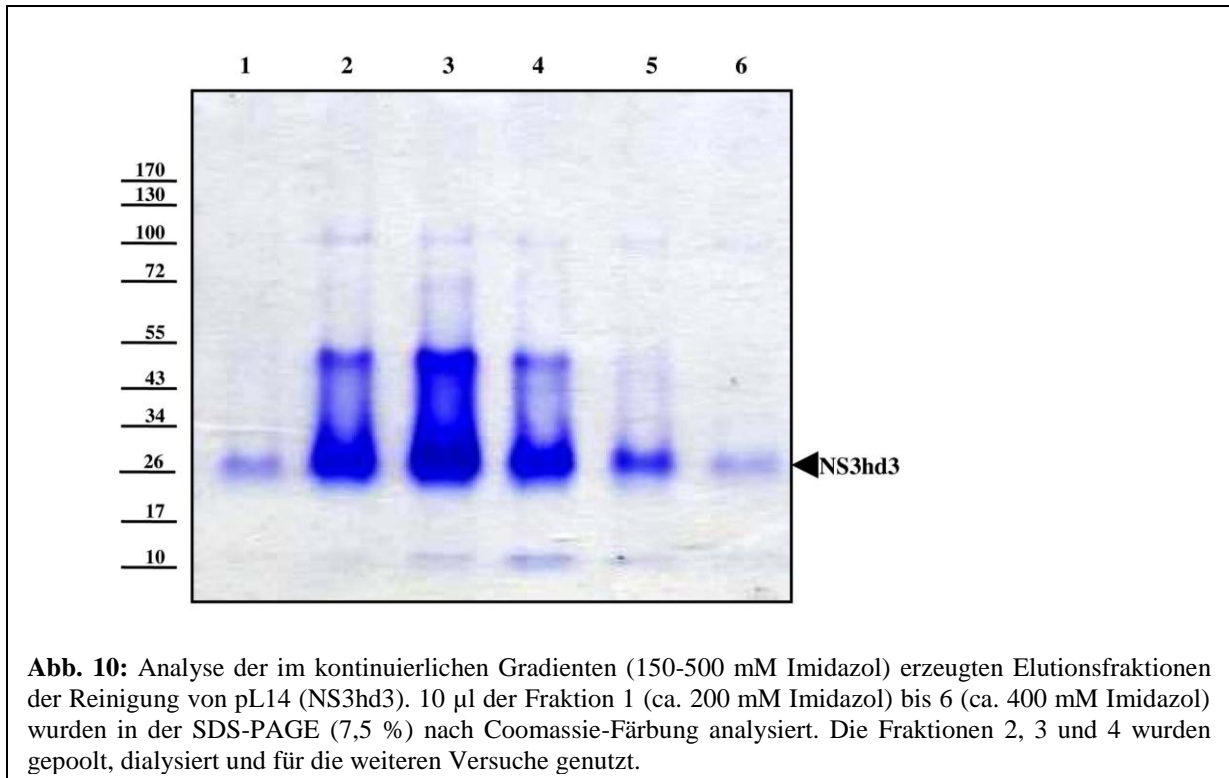
Abb. 9: Testexpression der Plasmide p1040, pL14, pL31, pL32, pL33, pL34 und pL35. Zur eindeutigen Identifizierung der mit einer Polyhistidin-Sequenz markierten Proteine wurden nicht induzierte und induzierte Bakterienkulturen nebeneinander in der SDS-PAGE (7,5 %) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die durch Polyhistidin-Tag markierten Proteine mit einem monoklonalen anti-His mAk nachgewiesen.

5.2.2 Reinigung des C-terminalen NS3-Helikase-Fragments

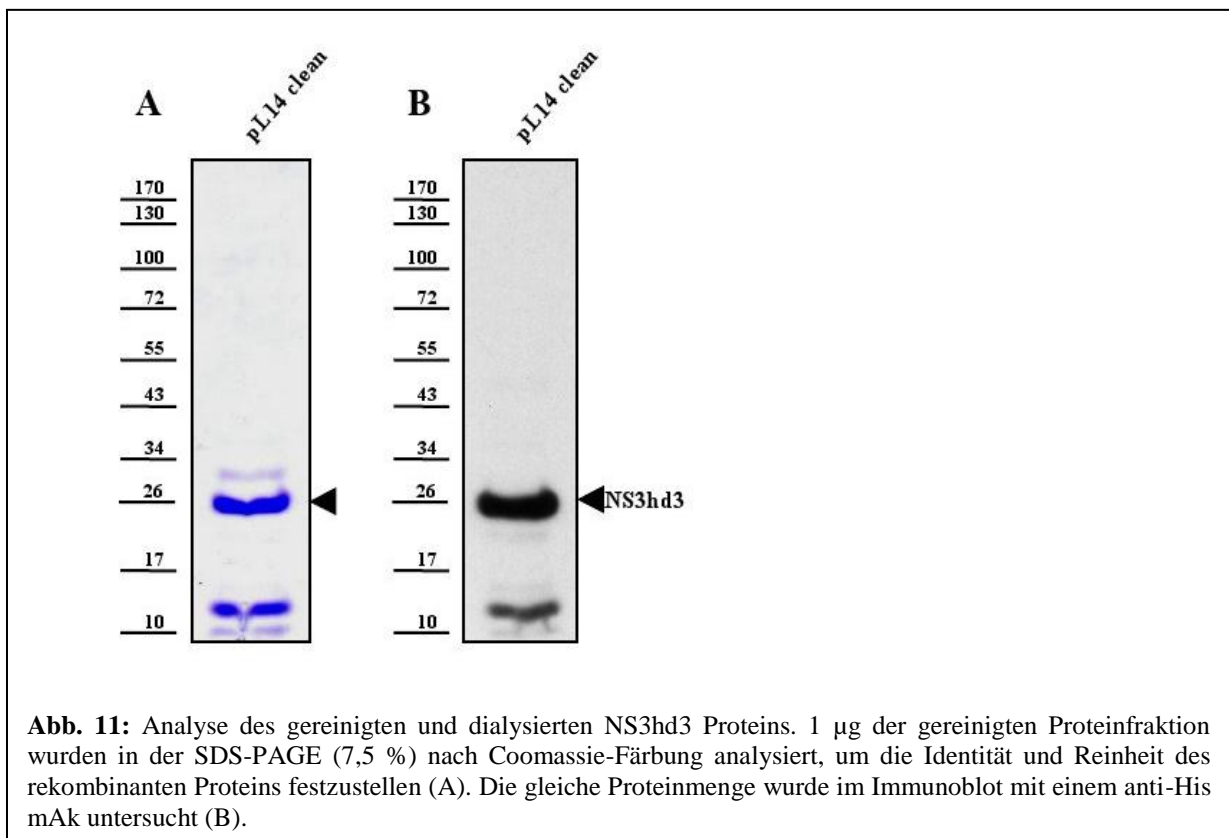
Bakterielle Proteinexpression und Zellyse wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach Ultrazentrifugation des Lysates (100.000 g, 1 h, 4 °C) befand sich das Polyhistidin markierte NS3-Helikase-Fragment überwiegend im löslichen Überstand und wurde nativ mittels IMAC gereinigt. Das NS3-Helikase-Fragment wurde in FPLC-Puffer A quantitativ an die Ni²⁺-Affinitätsmatrix gebunden und eluierte von der Affinitätsmatrix ab einer Konzentration von 200 mM Imidazol (Fraktion 1). Zur Steigerung der Reinheit wurde die Elution von der Affinitätsmatrix im kontinuierlichen Gradienten durchgeführt (Abb. 10).

Das Eluat der Fraktionen 2, 3 und 4 wurden vereinigt und gegen PBS defiz. bei 4 °C dialysiert. Bei der Dialyse bildete sich unlöslicher Niederschlag, der mittels Zentrifugation abgetrennt wurde. SDS-PAGE und Immunoblot Analysen von Überstand und unlöslichem Pellet ergaben, dass nur geringe Mengen des Zielproteins, vor allem das in Abb. 10 gut sichtbare Dimer, bei der Dialyse ausgefallen waren. Das nativ gereinigte Protein war nach der Dialyse in 3,4 ml PBS gelöst, wobei im BCA-Assay eine Proteinkonzentration von 0,9 mg/ml bestimmt wurde.

5. Ergebnisse



Insgesamt konnte durch diese Reinigung also ungefähr 3,0 mg NS3hd3 mit einem Reinheitsgrad von ca. 95 % präpariert werden (Abb. 11).

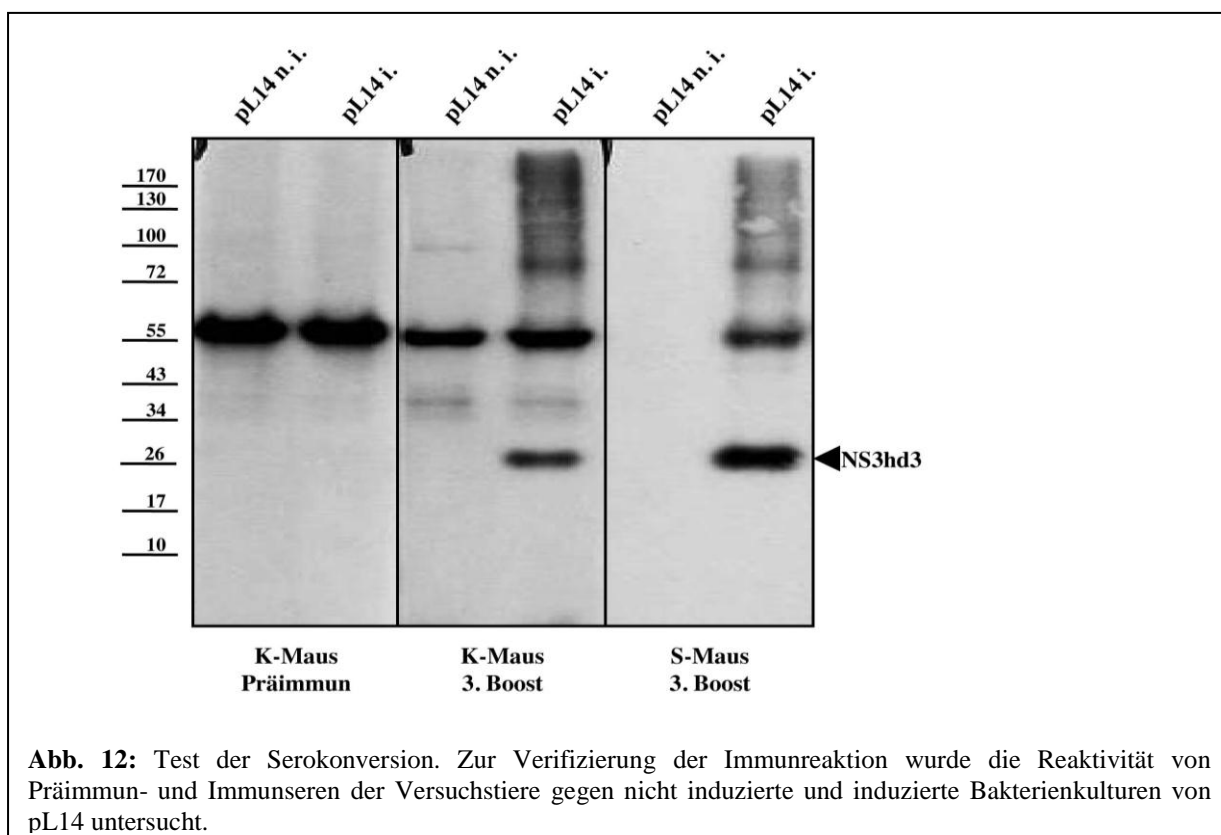


5. Ergebnisse

Eine bakterielle Expression der gesamten NS3-Helikase (p1040) und der C-terminalen Verkürzungen der NS3-Helikase (pL31, pL32, pL33, pL34 und pL35) wurde in 2 ml für 2 h bei 37 °C durchgeführt, die Bakterien durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C) geerntet, das Bakterienpellet in 250 µl H₂O resuspendiert und eine Zellyse durch Zugabe von 250 µl SDS-PAGE Puffer herbeigeführt. Diese Zellysate wurden in vergleichenden Immunoblotanalysen verwendet, um das Epitop der generierten Antikörper in der NS3-Helikase zu lokalisieren.

5.2.3 Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen das C-terminale NS3-Helikase-Fragment

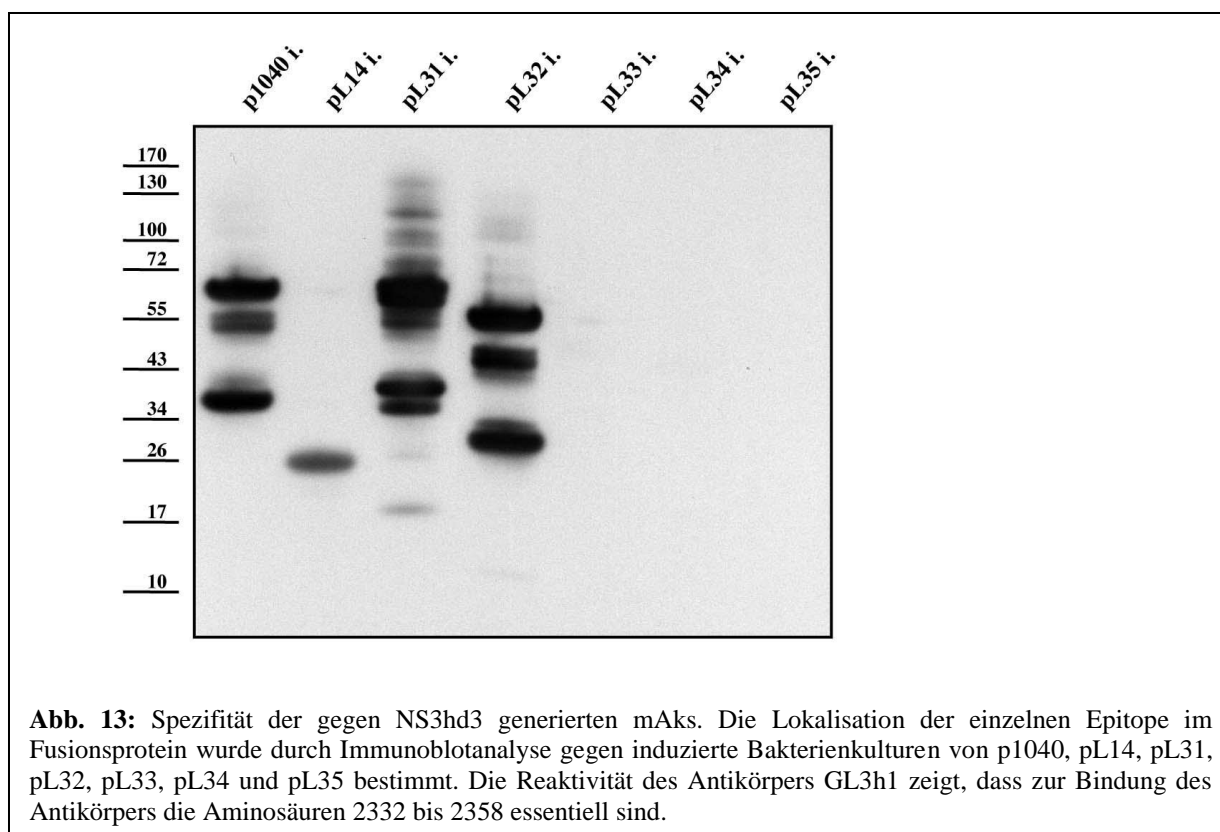
Die Immunisierung von zwei Versuchsmäusen des Stamms „Balb/C“ wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Reaktivität der Immunsereen gegen Lysate von induzierten und nicht induzierten pL14-Bakterienkulturen belegen eine Serokonversion beider Versuchstiere am 50. Tag des Immunisierungsschemas (Abb. 12). Die Lymphozyten eines Versuchstieres wurden präpariert und mit Sp2/0-Ag14 Zellen fusioniert. Durch diese Fusion konnten ungefähr 2.200 Hybridoma-Zelllinien generiert werden.



In einem Screening-ELISA wurde die Reaktivität der Hybridoma-Zellkulturüberstände gegen das NS3-Helikase-Fragment untersucht. Der anti-His mAk detektierte das Protein in

5. Ergebnisse

orientierenden Test-ELISAs selbst bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen. Daher wurden pro ELISA-Vertiefung ca. 45 ng des dialysierten gereinigten Proteins an die Reaktionsoberfläche gebunden. Die konzentrierte Protein-Stammlösung (900 µg/ml) wurde 1:2.000 verdünnt, 100 µl dieses Coating-Ansatzes in die ELISA-Vertiefungen gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Coating-Methode erreichten Test-ELISA mit anti-His mAk und mit den Immunsereen der Versuchstiere OD-Werte von über 2,4. Gleichzeitig blieben die OD-Werte in negativen Kontroll-ELISAs mit einem anti-E2 mAk (A18) und den Präimmunsereen der Versuchstiere unter 0,15.



Im beschriebenen Screening-ELISA wurden 211 reaktive Zellkultur-Vertiefungen gefunden. In einem weiteren ELISA wurden die Überstände dieser Zellkulturschalen-Vertiefungen nur mit der Blockierung ohne Antigen getestet, wobei nur wenige Überstände eine unspezifische Reaktion zeigten. Hybridoma-Zelllinien aus 96 Vertiefungen, in denen die stärkste Reaktion im ELISA bestimmt worden war, wurden auf eine neue Platte umgesetzt. Die Überstände dieser Zelllinien erwiesen sich auch nach Passage im beschriebenen Screening-ELISA als reaktiv. Da nicht alle Zelllinien näher charakterisiert werden konnten, wurden 25 Hybridomazelllinien aus den Vertiefungen, deren Überstände im ELISA die stärkste Reaktivität gezeigt hatten, durch Endpunktverdünnung kloniert. Die Analyse der Reaktionen dieser 25 positiven Zellkulturüberstände im Immunoblot gegen die gesamte NS3-Helikase

5. Ergebnisse

und die C-terminalen Verkürzungen der NS3-Helikase belegen eine spezifische Reaktion gegen NS3. Dabei konnten die Bindungsstellen der Antikörper anhand der Reaktivität mit den C-terminalen Verkürzungen der NS3-Helikase lokalisiert werden (Abb. 13). Auch der Subtyp der sezernierten mAKs wurde bestimmt. Die Nomenklatur der 10 in dieser Arbeit verwendeten Hybridome, sowie die Reaktivität und der Subtyp der sezernierten mAKs sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3:

Hybridom	Well	Spezifität NS3hd3 (essentielle Bindungssequenz)	Subtyp	Reaktivität IB = Immunoblot, IF = Immunfluoreszenz, IP = Immunpräzipitation
GL3h1	9D9	AS 2207-2234	IgG1	IB, IF, IP
GL3h2	10C11	AS 2207-2234	IgG1	IB, IF, IP
GL3h3	12°6	AS 2207-2234	IgG1	IB, IF, IP
GL3h4	2F8A	AS 2207-2234	IgG2b	IB, IF, IP
GL3h5	2F9A	AS 2174-2144	IgG2b	IB, IF, IP
GL3h6	14E7C	AS 2174-2144	IgG2a	IB
GL3h7	9E2	AS 2234-2264	IgG1	IB
GL3h8	13B1B	AS 2144-2174	IgG1	IB
GL3h9	3F10B	AS 2144-2174	IgG1	IB
GL3h10	9E1B	AS 2174-2144	IgG1	IB

5.3 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen KSPV NS4B

Das Nichtstrukturprotein 4B (NS4B) des KSPV besteht aus 348 Aminosäuren, hat eine berechnete Molekülmasse von 38,3 kDa und einen pKi von 8,98. Die Abspaltung von NS4A durch die NS3-Protease zwischen Leucin und Alanin (AS 2272/2273) generiert den N-Terminus des reifen Proteins. Der C-Terminus entsteht nach einer Abspaltung von NS5A, die ebenfalls von der NS3-Protease katalysiert wird, zwischen Leucin und Serin (AS 2683/2684). Untersuchungen des NS4B von Viren aus anderen Genera der Familie *Flaviviridae* haben gezeigt, dass NS4B als integrales Membranprotein eng mit den Membranen des endoplasmatischen Retikulums assoziiert ist (HCV; Hügle et al., 2001). Die N- und C-terminalen zytoplasmatischen Regionen des Proteins umrahmen mindestens vier Transmembran-Domänen (HCV; Lundin et al., 2006). Mutationsanalysen ergaben, dass NS4B

5. Ergebnisse

sowohl in der Replikation als auch an der Bildung der Virionen beteiligt ist (HCV; Jones et al., 2009). Der Versuch, das vollständige Protein im Kontext des pet11a Vektors oder des pGEX Vektors in *E. coli* zu exprimieren, scheiterte. Die Expression der C-terminalen Hälfte von NS4B (AS 2461-2683) gelang jedoch, wobei die produzierten Proteinmengen gering blieben. Transformierte Bakterien produzierten dieses C-terminale NS4B-Fragment mit einem N-terminalen Polyhistidin-Tag und auch als GST-Fusionsprotein mit C-terminalem Polyhistidin-Tag.

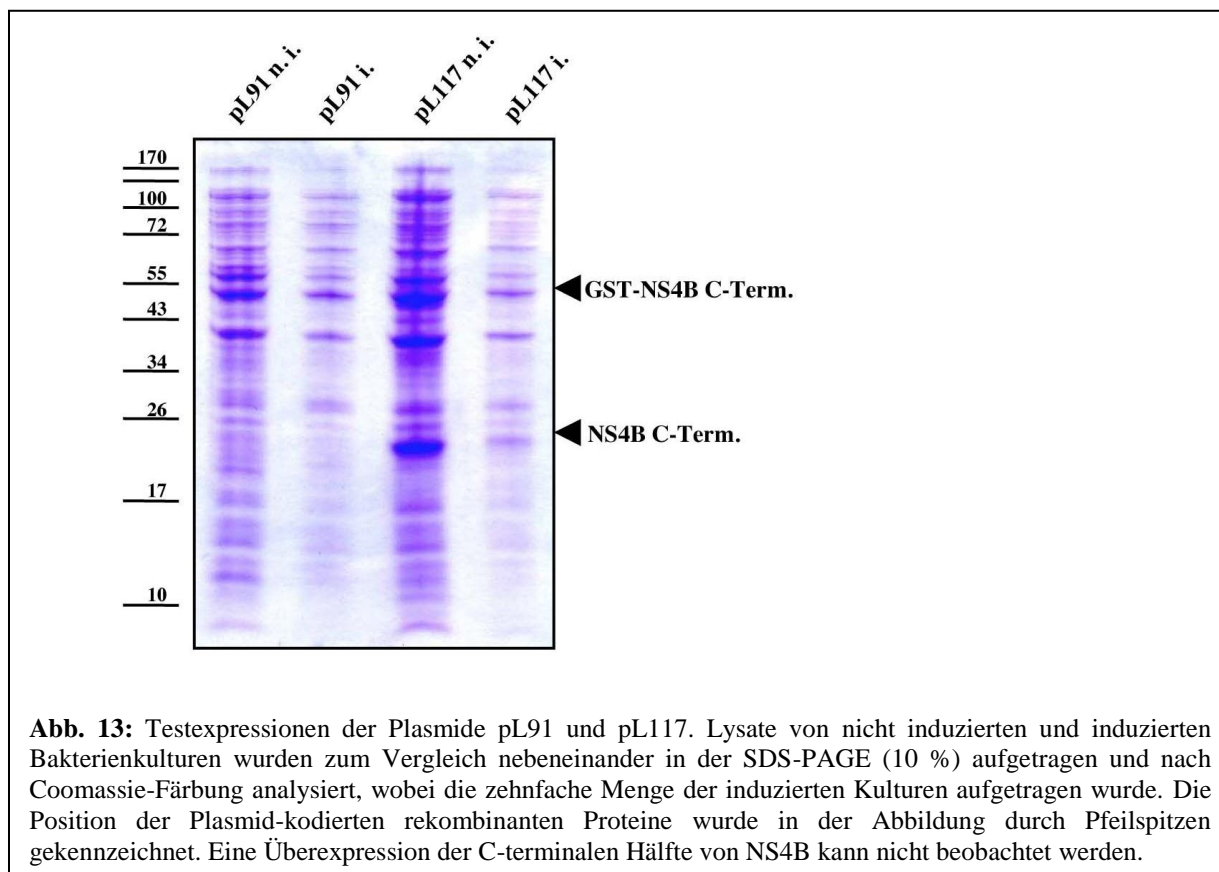


Abb. 13: Testexpressionen der Plasmide pL91 und pL117. Lysate von nicht induzierten und induzierten Bakterienkulturen wurden zum Vergleich nebeneinander in der SDS-PAGE (10 %) aufgetragen und nach Coomassie-Färbung analysiert, wobei die zehnfache Menge der induzierten Kulturen aufgetragen wurde. Die Position der Plasmid-kodierten rekombinanten Proteine wurde in der Abbildung durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Eine Überexpression der C-terminalen Hälfte von NS4B kann nicht beobachtet werden.

5.3.1 Klonierung und Expression eines C-terminalen NS4B-Fragments

Die Nukleotidsequenz der Aminosäuren 2461-2683 von KSPV, d. h. die C-terminale Hälfte von NS4B, wurde wie oben beschrieben in die Plasmide pet11a und pGEX6P-1 insertiert. Dabei entstand das Plasmid pL117, das die C-terminale Hälfte von NS4B nach der Sequenz MASHHHHHHHH kodiert. Zusätzlich wurde auf der Basis des PGex-Vektors das Plasmids pL91 generiert, das ein Fusionsprotein aus N-terminalem GST, der C-terminalen Hälfte von NS4B und einem C-terminalen Polyhistidin-Tag kodiert. Die Sequenzidentität beider Plasmide wurde vor der Expression durch analytischen DNS-Verdau und DNS-Sequenzierung überprüft. Nach Induktion der Expression wurde in 2 ml Bakterienkulturen der Plasmide pL117 und pL91 ein stark vermindertes Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollkulturen

5. Ergebnisse

beobachtet. Im Vergleich der zehnfachen Menge exprimierender Bakterienkulturen mit den Kontrollkulturen wurde keine Überexpression der rekombinanten Proteine durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nachgewiesen (Abb. 13). Die Analyse der Expression mittels Immunoblot mit anti His mAk belegte die Expression der C-terminalen Hälfte von NS4B (pL117; bMW: 25,6kDa) und des Fusionsproteins aus GST und NS4B-C-Terminus (pL91; bMW: 52,4 kDa), wobei wiederum eine schwächere Reaktion des anti His mAks mit dem C-terminalen Polyhistidin-Tag berücksichtigt werden muss (Abb. 14).

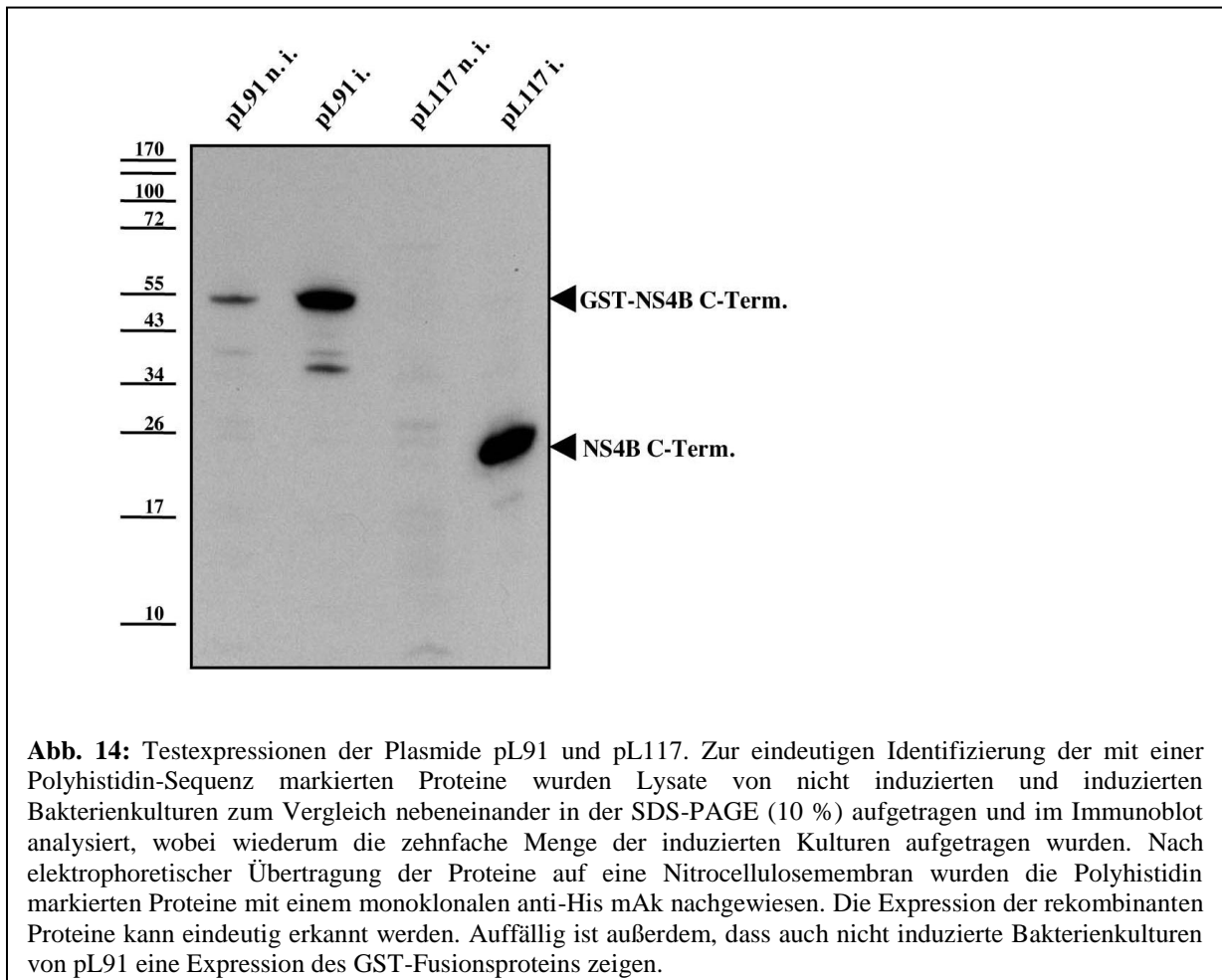


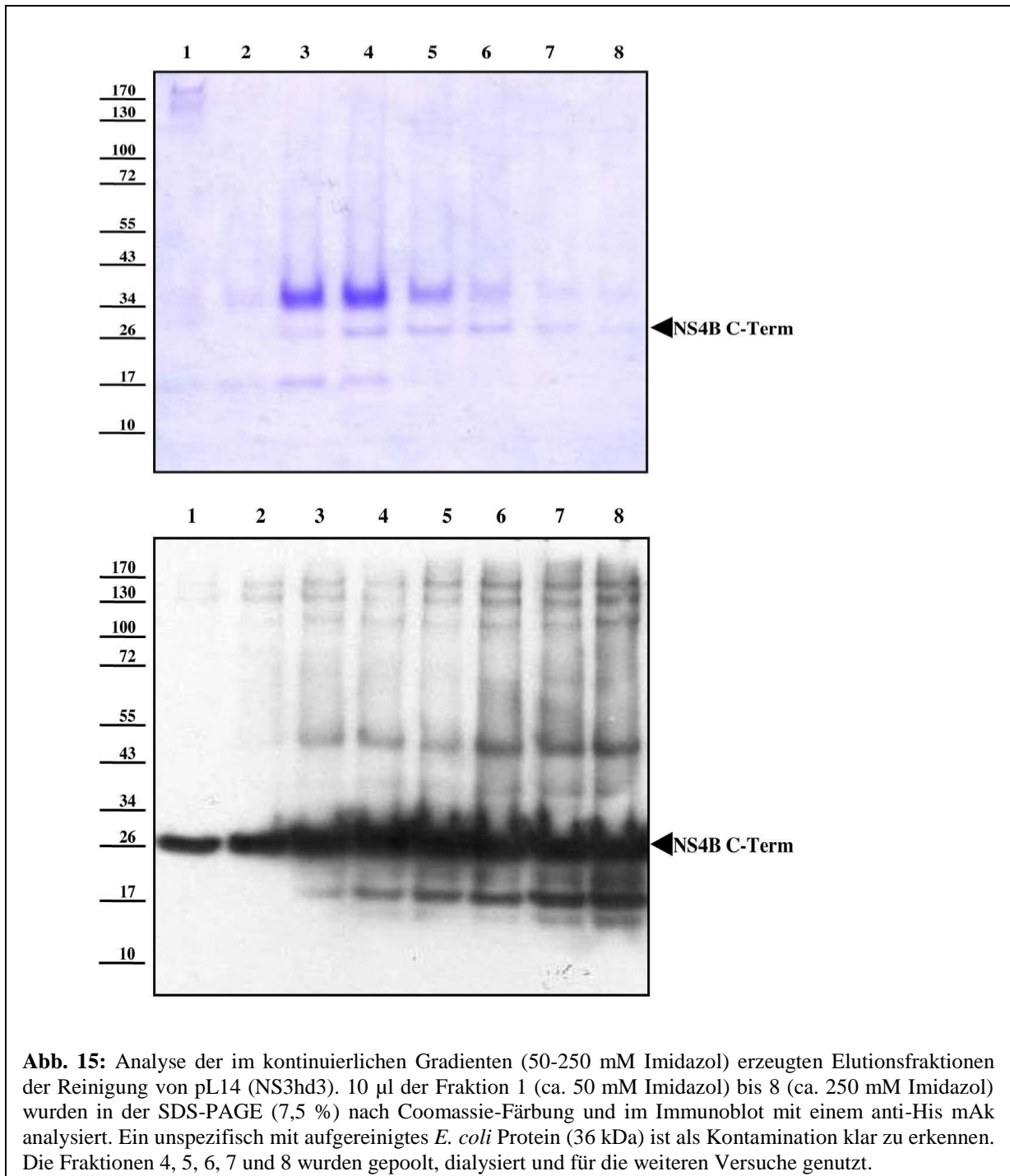
Abb. 14: Testexpressionen der Plasmide pL91 und pL117. Zur eindeutigen Identifizierung der mit einer Polyhistidin-Sequenz markierten Proteine wurden Lysate von nicht induzierten und induzierten Bakterienkulturen zum Vergleich nebeneinander in der SDS-PAGE (10 %) aufgetragen und im Immunoblot analysiert, wobei wiederum die zehnfache Menge der induzierten Kulturen aufgetragen wurden. Nach elektrophoretischer Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Polyhistidin markierten Proteine mit einem monoklonalen anti-His mAk nachgewiesen. Die Expression der rekombinanten Proteine kann eindeutig erkannt werden. Auffällig ist außerdem, dass auch nicht induzierte Bakterienkulturen von pL91 eine Expression des GST-Fusionsproteins zeigen.

5.3.2 Reinigung des C-terminalen NS4B-Fragments

Zuerst wurden zur präparativen Expression von pL117 Bakterien aus einer Glycerin-Kryokultur entnommen und in einer Flüssigmedium-Vorkultur angezogen. Die 500 ml Expressionskultur zeigte nach Induktion nicht die erwartete Wachstumshemmung. Immunoblot-Analysen der Proteinexpression von pL117 im 500 ml Maßstab ergaben, dass die Produktion des NS4B-Fragments nicht nachweisbar war. Auch die Expression von pL91 aus Glycerin-Kryostocks erbrachte nicht die erhoffte Überexpression des Proteins. Diese Daten ließen vermuten, dass die Expression des C-terminalen NS4B-Fragments toxisch auf

5. Ergebnisse

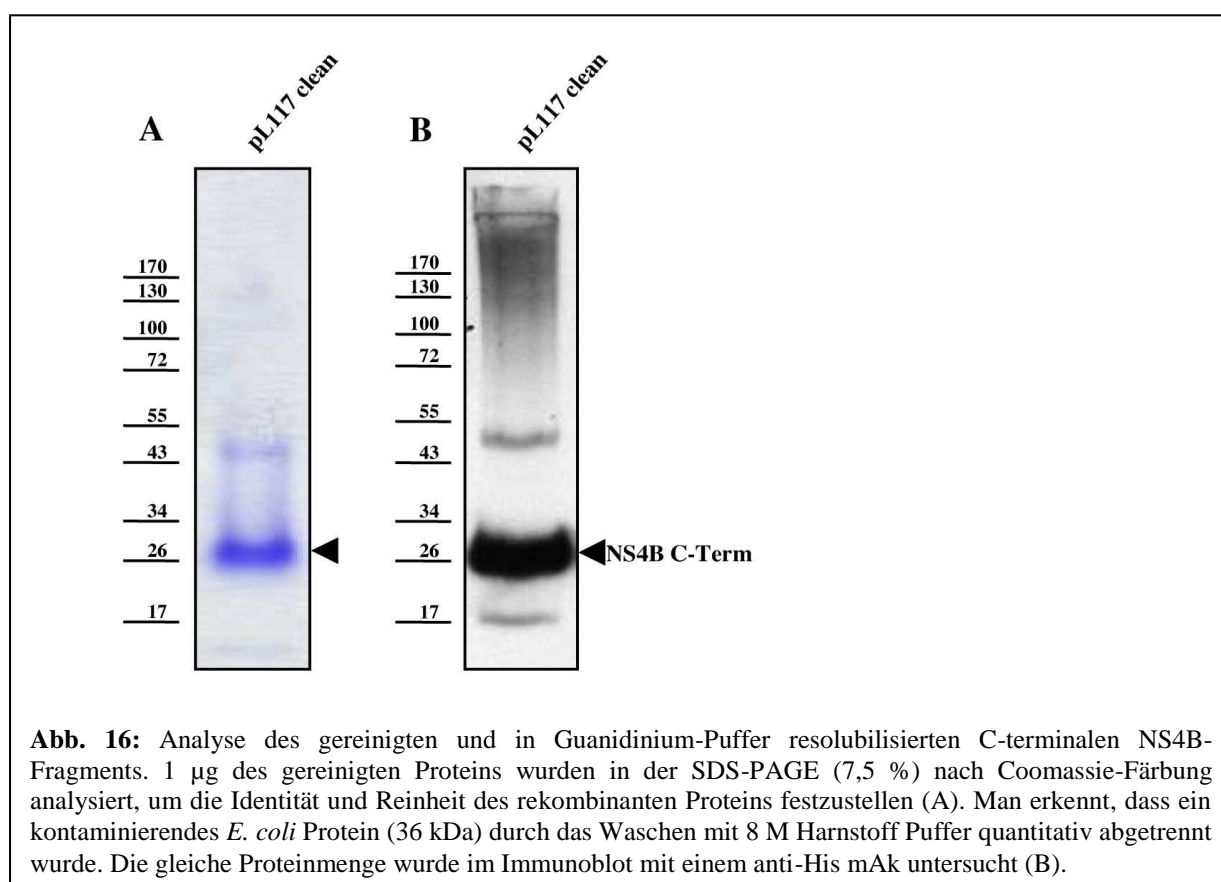
Bakterien wirkt und deshalb eine negative Selektion auf die Proteinexpression und das Expressionsplasmid ausgeübt wurde.



Daraufhin wurden Transformationen von pL117 in *E. coli*, Stamm Rosetta auf LB-Platten mit Ampicillin und 0,1% Glukose ausgestrichen, um eine positive Selektion auf das Zielplasmid auszuüben und gleichzeitig die Proteinexpression zu supprimieren. Die Bakterien von zehn Selektionsplatten wurden mittels eines Zellschabers geerntet und in 200 ml LB-Medium resuspendiert. Die resultierende Bakterienkultur wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und

5. Ergebnisse

dann die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei Raumtemperatur wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (3000 g, 10 min, 4 °C). Immunoblotanalysen belegten eine Proteinexpression, die mit den Ergebnissen der beschriebenen Kulturen im 2 ml Maßstab vergleichbar war. Nach der Zellyse (1 % Triton-X 100, 3-faches Frieren/Tauen und Ultraschall-Behandlung) wurden lösliche und unlösliche Bestandteile des Lysates durch Ultrazentrifugation (100.000 g, 1 h, 4 °C) aufgetrennt. Das mit einem Polyhistidin-Tag markierte C-terminale NS4B-Fragment befand sich ausschließlich im unlöslichen Pellet. Das denaturierende Solubilisieren des Ultrazentrifugationspellet in 8 M Urea-Puffer und eine nachfolgende weitere Ultrazentrifugation (100.000 g, 1 h, 12 °C) zeigten, dass nur ein geringer Teil des Zielproteins im 8 M Urea-Puffer gelöst worden war.



Der Versuch wurde wiederholt und eine Solubilisierung des Zielproteins in 4 M Guanidiniumchlorid untersucht. Das Expressionsprodukt von pL117 wurde vollständig im 4 M Guanidiniumchlorid-Puffer gelöst, so dass die Bindung des Polyhistidin markierten NS4B-Fragments in diesem Puffer an eine Ni²⁺-Sephrose-Matrix untersucht werden konnte. Das Zielprotein wurde quantitativ an die Affinitätsmatrix gebunden und zur Steigerung der Reinheit im kontinuierlichen Gradienten (50-250 mM Imidazol) von der Ni²⁺-Sephrose-

5. Ergebnisse

Säule eluiert. Immunoblot-Analysen belegten die Anreicherung des NS4B-Fragments, doch wurde neben dem C-terminalen NS4B-Fragment (27 kDa) auch ein bakterielles Protein von ungefähr 34 kDa mit aufgereinigt (Abb. 15). Die Elutionsfraktionen 4 bis 8 wurden gepoolt und gegen PBS defiz. dialysiert. In der Dialyse bildete sich ein proteinhaltiges Präzipitat, das wiederum in 8 M Urea Puffer resolubilisiert wurde. Dabei lösten sich nur kontaminierende bakterielle Proteine. Das C-terminale NS4B-Fragment konnte durch Zentrifugation (3.000 g, 10 min, 4 °C) abgetrennt werden. Durch eine solche Reinigung konnten ungefähr 250 µg des Zielproteins isoliert werden (Abb. 16).

5.3.3 Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen das C-terminale NS4B-Fragment

Am 50. Tag zeigten die Versuchsmäuse nach Immunisierung mit dem gereinigten C-terminalen NS4B-Fragment keine Serokonversion. Daher wurden sie am 63. Tag und am 84. Tag nochmals immunisiert. Erst am 92. Tag nach der ersten Immunisierung wurde bei einem einzelnen Versuchstier eine schwache Reaktion gegen das C-terminale NS4B-Fragment beobachtet. Dieses Versuchstier wurde zur Herstellung von mAbs genutzt, wobei in dieser Fusion ungefähr 1.900 Hybridoma-Zelllinien generiert werden konnten.

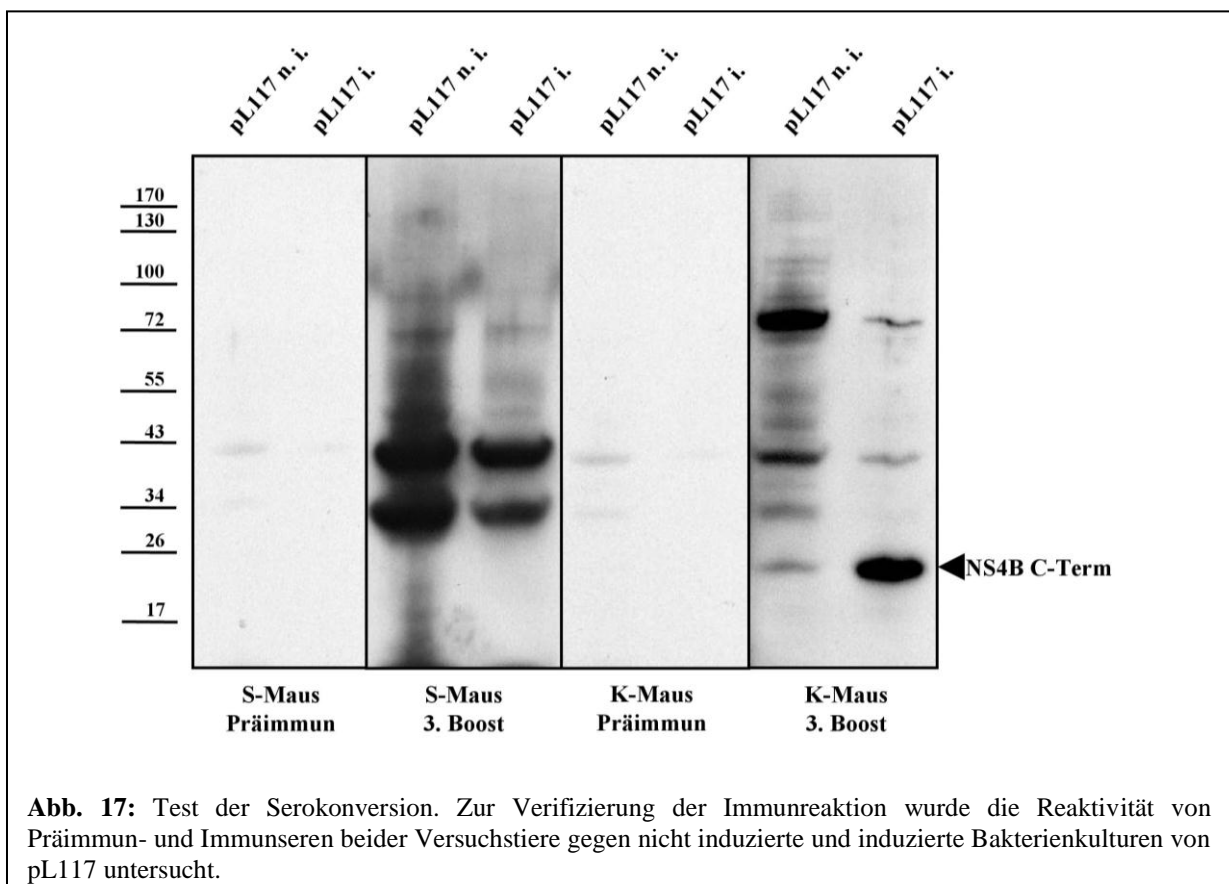


Abb. 17: Test der Serokonversion. Zur Verifizierung der Immunreaktion wurde die Reaktivität von Präimmun- und Immunsereen beider Versuchstiere gegen nicht induzierte und induzierte Bakterienkulturen von pL117 untersucht.

5. Ergebnisse

Die Vertiefungen der ELISA-Platten wurden mit ca. 100 ng des gereinigten und in Guanidinium gelösten Proteins beschichtet. Dazu fand eine 1:200 Verdünnung der Guanidinium-Puffer-Stammlösung des Proteins (200 µg/ml) Verwendung. 100 µl dieses Coating-Ansatzes wurden unverzüglich in die ELISA-Vertiefungen gegeben und 12 h bei 4 °C inkubiert. Mit der Coating-Methode erreichten Test-ELISA mit anti-His mAk und mit den Immunseren der Versuchstiere OD-Werte von über 2,0. Gleichzeitig blieben die OD-Werte in negativen Kontroll-ELISAs mit einem anti-E2 mAk und den Präimmunseren der Versuchstiere unter 0,4. Es wurden 12 Zelllinien isoliert, die im ELISA positive Reaktionen zeigten. Immunoblot-Analysen mit dem gereinigten rekombinanten Protein ergaben aber, dass alle sezernierten Antikörper mit dem bakteriellen Kontaminationsprotein reagierten.

In einem weiteren Versuch wurden zwei 12 Wochen alte Versuchsmäuse des Stamms „Balb/C“ mit jeweils 150 µg des gereinigten C-terminalen NS4B-Fragments mit inkomplettem „Freund's Adjuvant“ immunisiert. Die Folgeimmunisierungen erfolgten nach drei und sechs Wochen mit 100 µg des Proteins. Am 50. Tag dieses Immunisierungsschemas konnte eine deutliche Serokonversion bei einem der Versuchstiere nachgewiesen werden (K-Maus, Abb. 17). Diese Maus wurde an drei aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 100 µg des denaturierten Proteins immunisiert und am darauffolgenden Tag euthanasiert. Die Zellfusion generierte ungefähr 1.500 Hybridoma-Zelllinien, die im oben beschriebenen ELISA gegen das gereinigte C-terminale NS4B-Fragment getestet wurden. Es wurden insgesamt über 100 Zelllinien identifiziert, die gegen das Immunisierungsprotein gerichtete Antikörper produzierten. Die Spezifität aller sezernierten monoklonalen Antikörper wurde im Immunoblot untersucht. Nur zwei der Antikörper (Tabelle 4) aus der Fusion der Milzzellen der „K-Maus“ zeigten eine Reaktivität mit der C-terminalen Hälfte von NS4B (Abb. 18).

Tabelle 4:

Hybridom	Well	Spezifität	Subtyp	Reaktivität IB = Immunoblot, IP = Immunpräzipitation
GL4B1	4G11	NS4B	IgG1	(IB), IP
GL4B2	4G10	NS4B	IgG1	(IB)

5. Ergebnisse

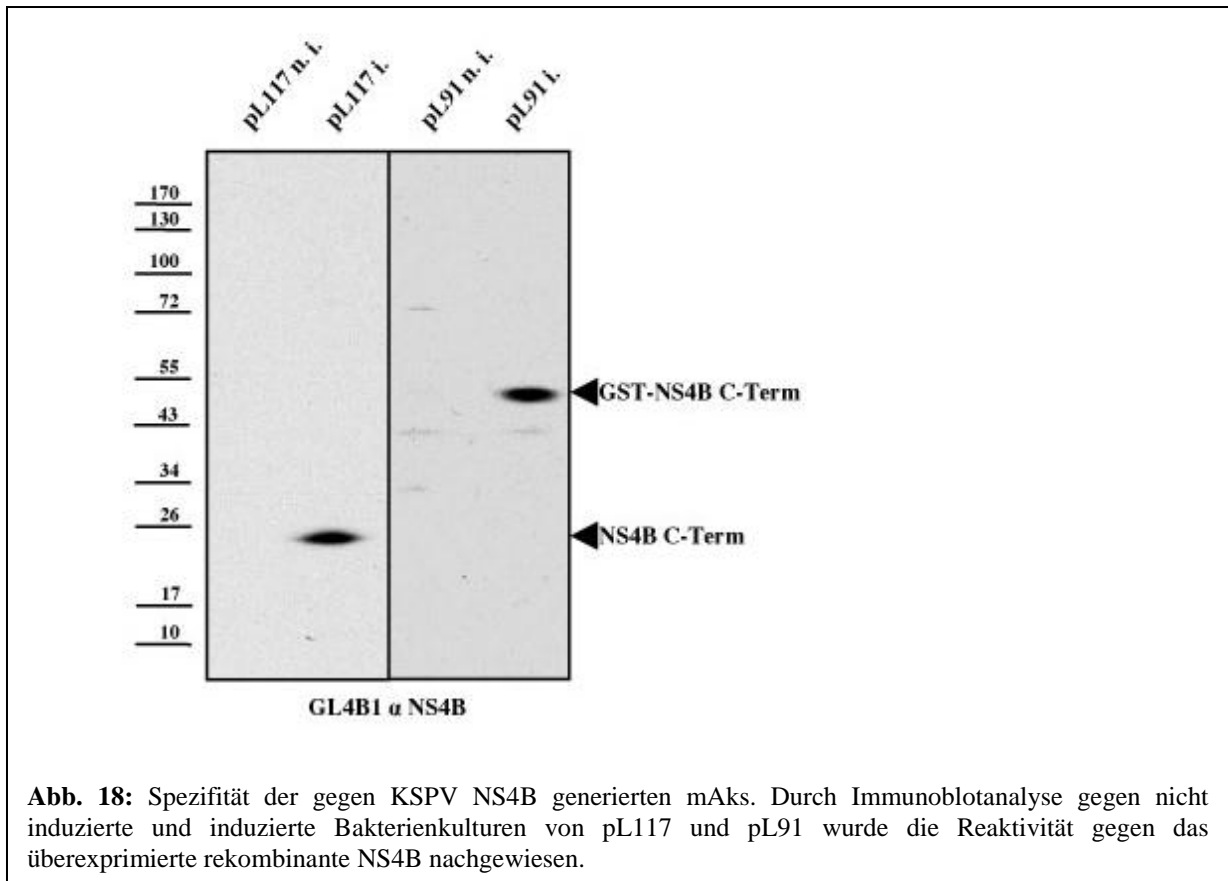


Abb. 18: Spezifität der gegen KSPV NS4B generierten mAbs. Durch Immunoblotanalyse gegen nicht induzierte und induzierte Bakterienkulturen von pL117 und pL91 wurde die Reaktivität gegen das überexprimierte rekombinante NS4B nachgewiesen.

5.4 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen KSPV NS5A

Das Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) des KSPV besteht aus 497 Aminosäuren, hat eine Molekülmasse von 56,1 kDa und einen p*K*_i von 9,34. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus des reifen Proteins entstehen durch proteolytische Spaltungen, die von der NS3-Protease zwischen Leucin und Serin (AS 2683/2684 bzw. AS 3180/3181) vermittelt werden. NS5A ist ein relativ hydrophiles Phosphoprotein, das durch eine hydrophobe N-terminale Alpha-Helix („Membrananker“) mit Membranen des endoplasmatischen Retikulums infizierter Zellen verbunden ist (Reed et al. 1998). Es ist essentiell für die pestivirale Replikation und beinhaltet eine zinkbindende Domäne, die Interaktionen mit der viralen RNS ermöglicht (Tellinghuisen et al., 2006). Monoklonale Antikörper gegen das NS5A Protein von BVDV wurden erstmals im Jahr 2009 vorgestellt (Zahdoor et al., 2009). Gegen KSPV NS5A gerichtete monoklonale Antikörper wurden bislang nicht präsentiert. Eigene Versuche ergaben, dass eine Expression des vollständigen KSPV NS5A in Bakterien möglich ist.

5.4.1 Klonierung und Expression von NS5A

Die Insertion der Nukleotidsequenz des vollständigen Nichtstruktur-Proteins 5A (NS5A, AS 2684 bis 3180) von KSPV Alfort/Tübingen in den Expressionsvektor pet11a generierte das

5. Ergebnisse

Plasmid p1142. Die Sequenz von NS5A wurde dabei ans 3'-Ende der MASHHHHHHHH kodierenden Sequenz in das bestehendes Leseraster inseriert. Das N-terminal 7His markierte Expressionskonstrukt beinhaltet die N-terminale hydrophobe NS5A Domäne und konnte nicht unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Außerdem wurde das pGEX-Plasmid pL63 generiert, das ein Fusionsprotein aus N-terminalem GST, NS5A und einem C-terminalen Polyhistidin-Tag kodiert. Die Sequenzidentität beider Plasmide wurde vor der Expression durch analytischen DNS-Verdau und DNS-Sequenzierung überprüft.

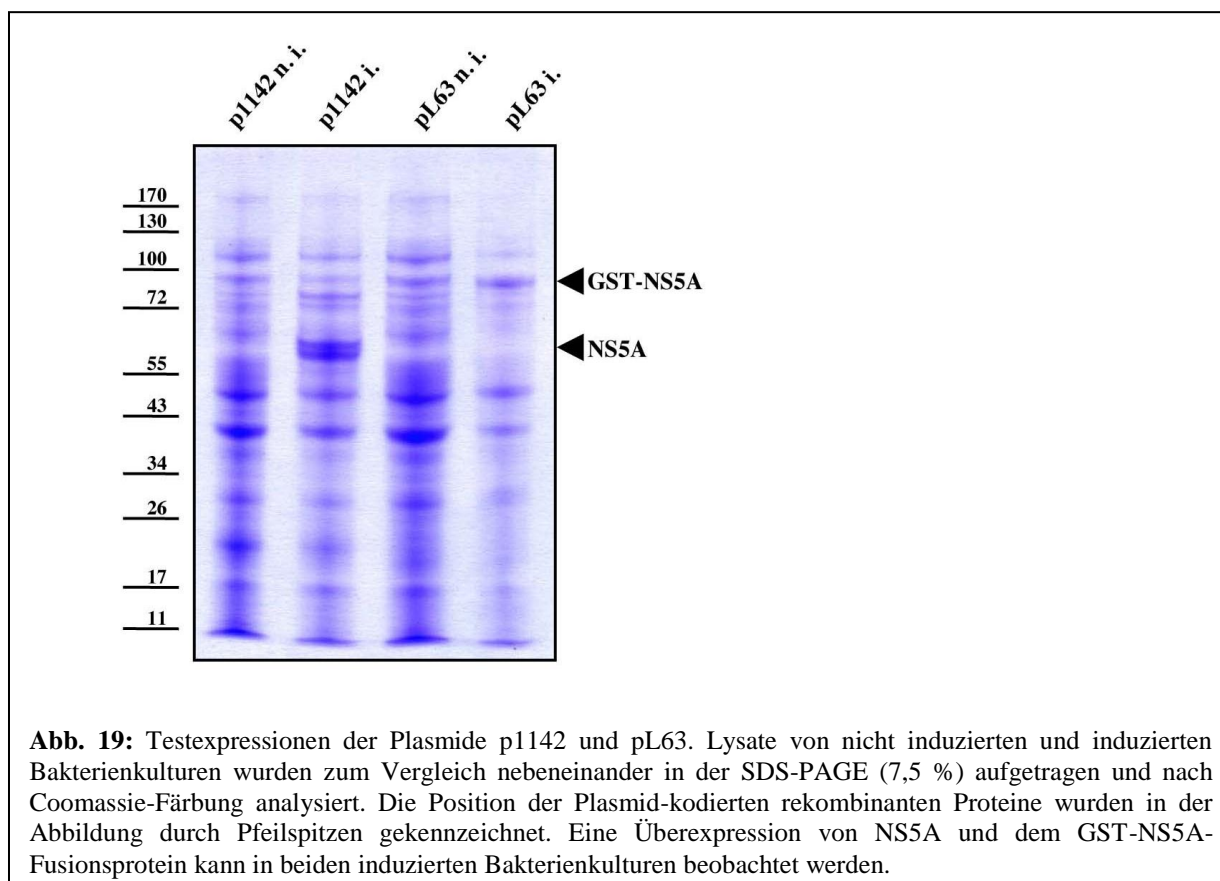


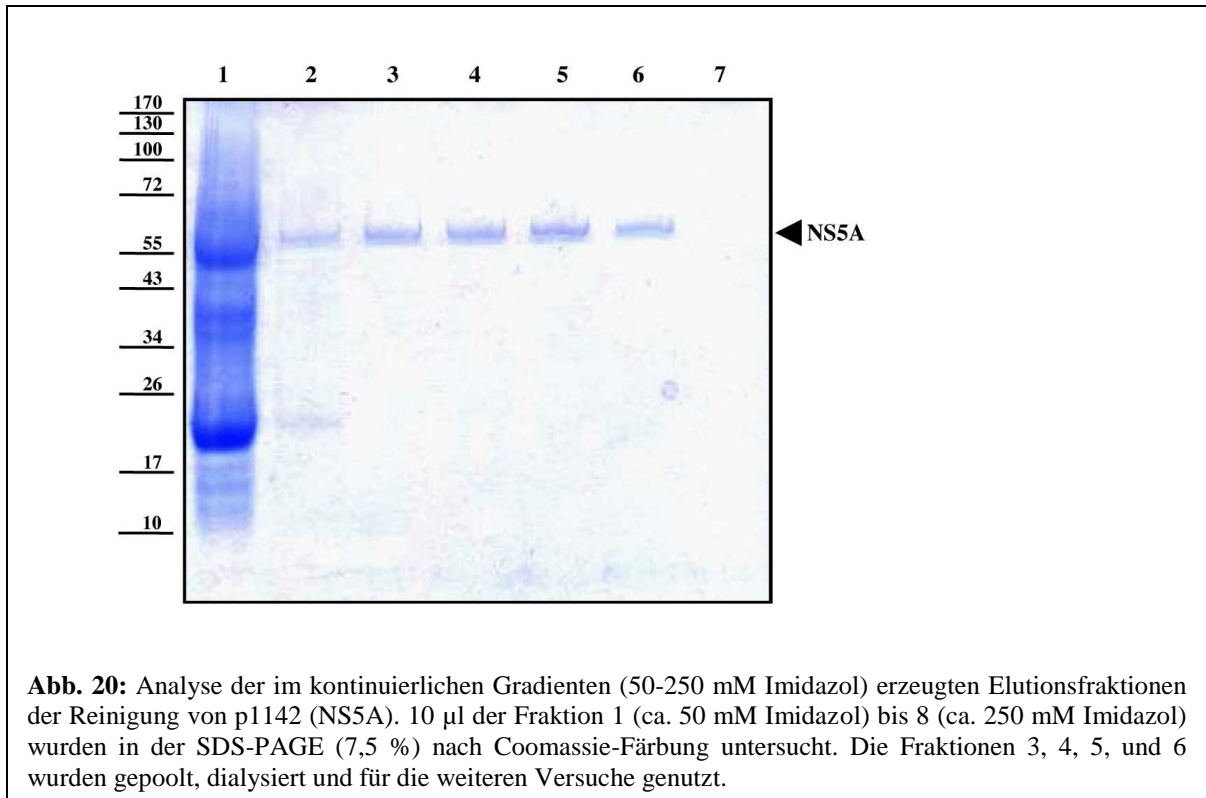
Abb. 19: Testexpressionen der Plasmide p1142 und pL63. Lysate von nicht induzierten und induzierten Bakterienkulturen wurden zum Vergleich nebeneinander in der SDS-PAGE (7,5 %) aufgetragen und nach Coomassie-Färbung analysiert. Die Position der Plasmid-kodierten rekombinanten Proteine wurden in der Abbildung durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Eine Überexpression von NS5A und dem GST-NS5A-Fusionsprotein kann in beiden induzierten Bakterienkulturen beobachtet werden.

Nach Induktion konnte die Expression vom N-terminal Polyhistidin markierten NS5A (p1142, bMW: 57,3 kDa) im Coomassie-Brillant-Blau R250 gefärbten Gel detektiert werden. Auch die Überexpression des C-terminal Polyhistidin markierten GST-NS5A-Fusionsproteins (pL63, bMW: 83,9 kDa) wurde nach Anfärbung der zellulären Proteine sichtbar (Abb. 19). Zur eindeutigen Identifizierung wurden die rekombinanten Proteine im Immunoblot mit Hilfe des anti-His mAbs nachgewiesen.

5.4.2 Reinigung von NS5A

Nach Proteinexpression und Bakterienlyse wurden lösliche und unlösliche Bestandteile des Lysates durch Ultrazentrifugation (100.000 g, 1 h, 4 °C) aufgetrennt.

5. Ergebnisse

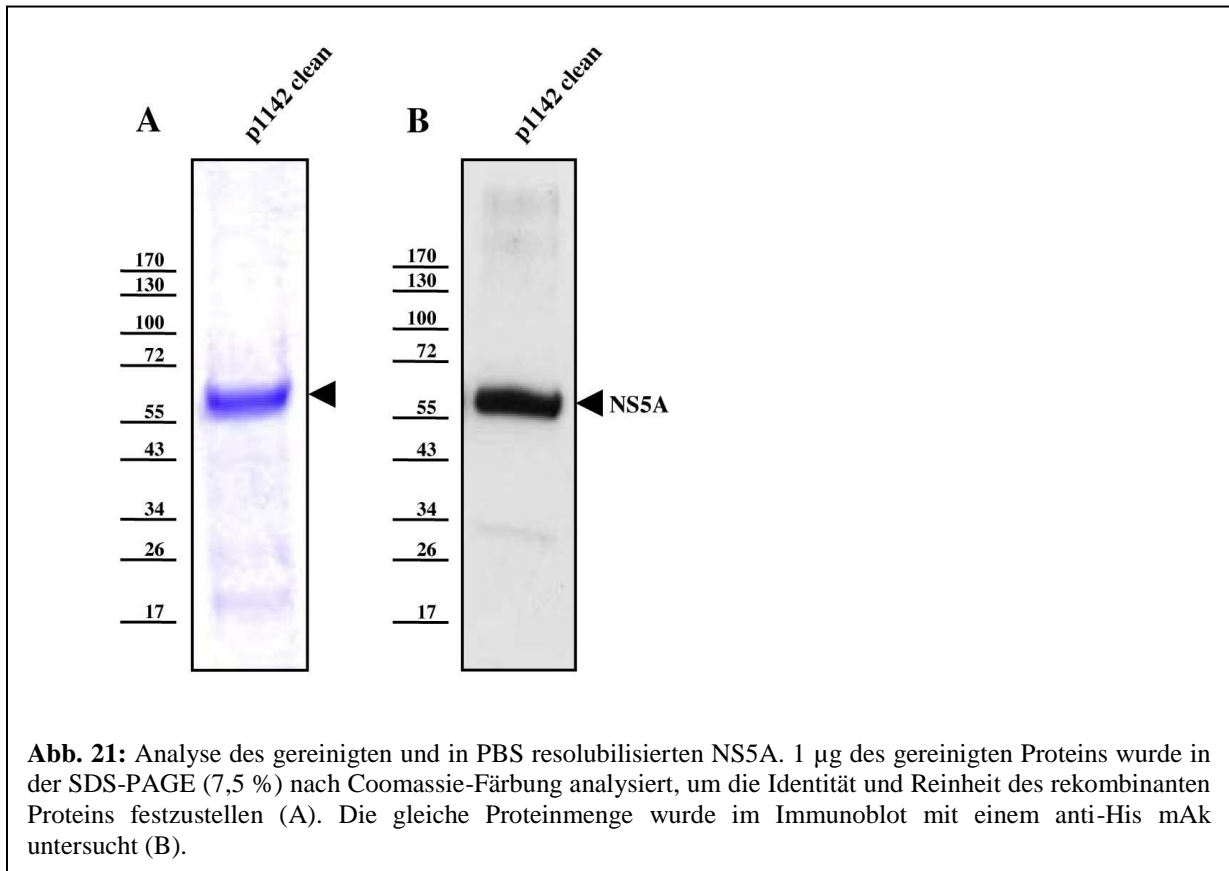


Sowohl das N-terminal Polyhistidin markierte NS5A, als auch das GST-NS5A-Fusionsprotein befand sich ausschließlich im unlöslichen Pellet. Nach Resolubilisierung des Pellets in 8 M Urea Puffer wurden wiederum die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (100.000 g, 1 h, 4 °C) abgetrennt. Beide rekombinanten Proteine ließen sich vollständig im 8 M Urea Puffer lösen. Weil das GST-Fusionsprotein keine verbesserte Löslichkeit zeigte, wurde nur das N-terminal Polyhistidin markierte NS5A mittels denaturierender IMAC im 8 M Urea Puffer gereinigt. Im 8 M Urea FPLC-Puffer A konnte eine quantitative Bindung von NS5A an die Ni²⁺-Affinitätsmatrix erzielt werden. Das Protein eluierte von der Affinitätsmatrix ab einer Konzentration von 100 mM Imidazol. Zur Steigerung der Reinheit wurde die Elution von der Affinitätsmatrix im kontinuierlichen Gradienten durchgeführt (Abb. 20).

Das Eluat der Fraktionen 3, 4, 5 und 6 (ungefähr 150-200 mM Imidazol) wurde vereinigt und gegen PBS bei 4 °C dialysiert. Bei der Dialyse bildete sich unlöslicher Niederschlag, der mittels Zentrifugation (3.000 g, 10 min, 4 °C) abgetrennt wurde. Immunoblot Analysen von Überstand und unlöslichem Pellet ergaben, dass sich das Zielprotein vollständig im Pellet befand. Das denaturierend gereinigte Protein wurde nach der Dialyse in 2 ml PBS aufgenommen. Im BCA-Assay wurde in einem resolubilisierten Aliquot des gereinigten Proteins eine Proteinkonzentration von 1,2 mg/ml bestimmt. Insgesamt konnte durch diese

5. Ergebnisse

Reinigung also ungefähr 2,4 mg NS5A mit einem Reinheitsgrad von ca. 95 % dargestellt werden (Abb. 21).



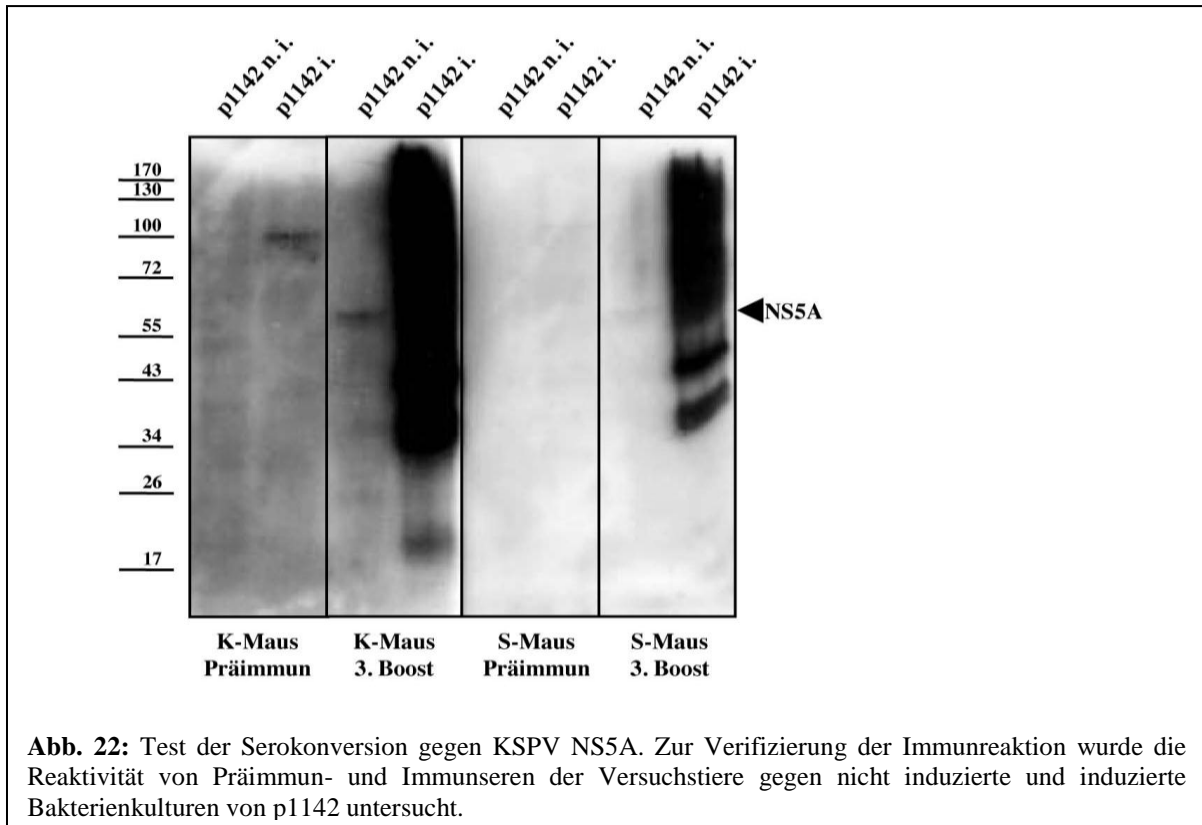
5.4.3 Präparation von monoklonalen Antikörpern gegen NS5A

Am 50. Tag des beschriebenen Immunisierungsschemas wurden die Reaktivitäten von Präimmun- und Immunseren gegen Lysate von induzierten und nicht induzierten p1142-Bakterienkulturen im Immunoblot verglichen (Abb. 22), wobei eine Serokonversion bei beiden Versuchstieren nachgewiesen wurde. Die Milzlymphozyten eines Versuchstieres wurden mit Sp2/0-Ag14 Zellen fusioniert. Dabei entstanden ungefähr 2.600 Hybridoma-Zelllinien.

An die Oberflächen der ELISA-Platten-Vertiefungen wurden ca. 60 ng des dialysierten gereinigten NS5A gebunden. Zu diesem Zweck erfolgte eine 1:2.000 Verdünnung der konzentrierten Protein-Stammlösung (1200 μ g/ml). 100 μ l dieses Coating-Ansatzes wurden unverzüglich in die ELISA-Vertiefungen gegeben und 12 h bei 4 °C inkubiert. Ein Test-ELISA mit anti-His mAk und dem Immunserum des Versuchstieres erreichten OD-Werte von über 2,8. Die OD-Werte des ELISA mit einem anti-E2 mAk und dem Präimmunserum des Versuchstieres blieben dagegen unter 0,5. Der Screening-ELISA identifizierte gemäß dem

5. Ergebnisse

angegebenen Grenzwert 26 reaktive Zellkulturüberstände. Die Spezifität der Reaktionen dieser Zellkulturüberstände wurde im ELISA-System ohne Antigen überprüft, wobei die ELISA-Oberflächen nur mit der Blockierungslösung beschichtet wurden.



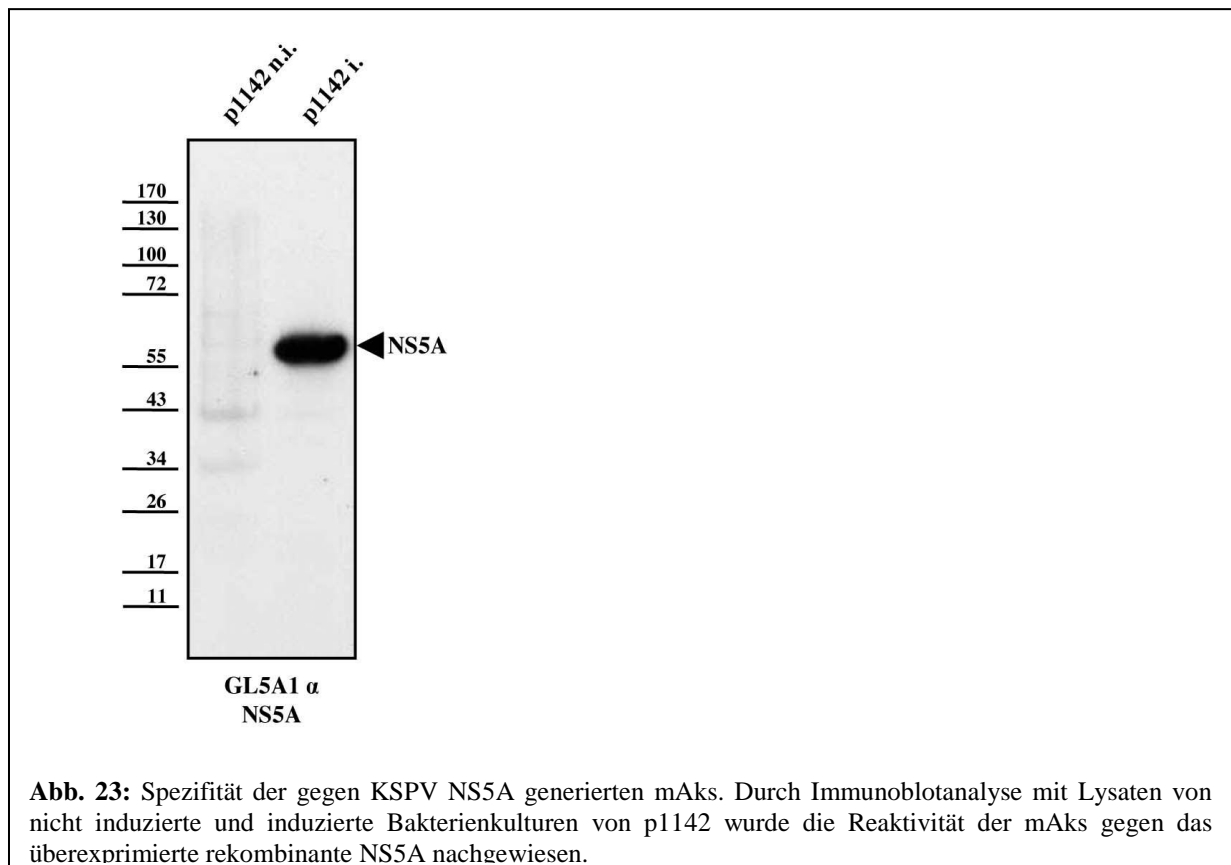
Die Reaktion von sieben Überständen erwies sich in diesem Test als unspezifisch. Einzelne Zellen aus den 19 verbliebenen positiven Zellkulturvertiefungen wurden umgesetzt und durch Endpunktverdünnung kloniert. Insgesamt wurden 7 Zelllinien kloniert, die mAKs gegen NS5A sezernierten und deren Überstände im Screening-ELISA hoch reaktiv waren. Die Zellkulturüberstände aller 7 Hybridome reagierten auch im Immunoblot mit KSPV NS5A (Abb. 23) Die Nomenklatur der in dieser Arbeit verwendeten „NS5A-Hybridome“, sowie die Reaktivität und der Subtyp der sezernierten mAKs sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5:

Hybridom	Well	Spezifität NS5A	Subtyp	Reaktivität IB = Immunoblot, IF = Immunfluoreszenz, IP = Immunpräzipitation
GL5A1	3B10	NS5A	IgG1	IB, IF, IP
GL5A2	8F12	NS5A	IgG1	IB, IF, IP

5. Ergebnisse

GL5A3	12G1	NS5A	IgG1	IB
GL5A4	9A8	NS5A	IgG2b	IB
GL5A5	13G3	NS5A	IgG2b	IB
GL5A6	15F8	NS5A	IgG2a	IB
GL5A7	1B12	NS5A	IgG1	IB

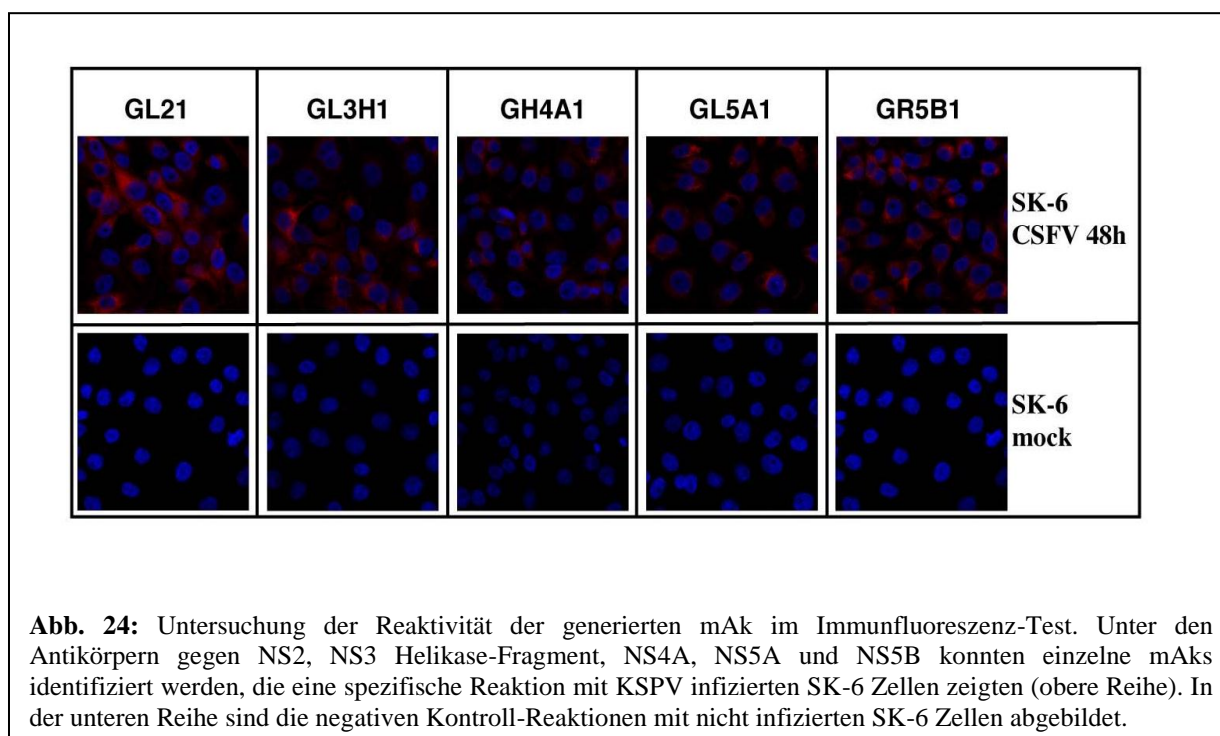


5.5 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen die Nichtstrukturproteine des KSPV in der Immunfluoreszenz

Neben den selbst generierten mAk gegen die Nichtstrukturproteine von KSPV wurden auch bereits vorhandene mAbs gegen KSPV NS4A (GH4A1) und gegen KSPV NS5B (GR5B1) in dieser Arbeit verwendet. Der monoklonale Antikörper gegen KSPV NS5B wurde bereits vorläufig charakterisiert (Roman-Sosa, 2007). Die Reaktivität der vorhandenen mAbs und aller hier beschriebenen neu generierten mAbs wurde in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden nicht infizierte SK-6 Zellen und SK-6 Zellen 24 h nach Infektion mit KSPV mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und mit 1%iger Oktylglykosid-Lösung permeabilisiert. Nach Inkubation mit den Überständen der beschriebenen Hybridoma-Zelllinien wurde der Nachweis einer positiven Antikörperreaktion mittels eines Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpers erbracht.

5. Ergebnisse

Anschließend wurden zur Gegenfärbung der Zellen noch die DNS der Zellkerne mit DAPI blau angefärbt. Dabei wurden Antikörper gegen NS2, die NS3 Helikase, NS4A, NS5A und NS5B identifiziert, die eine spezifische Reaktion mit KSPV infizierten Zellen zeigten. Keiner der Antikörper gegen die Protease Domäne von NS3 und gegen NS4B reagierte mit den betreffenden pestiviralen Proteinen in diesem Test. Die Detektion der Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS5A und NS5B in KSPV infizierten Zellen führte zu einer perinukleären, zytoplasmatischen Fluoreszenz im beschriebenen indirekten Immunfluoreszenz-Test (Abb. 24).



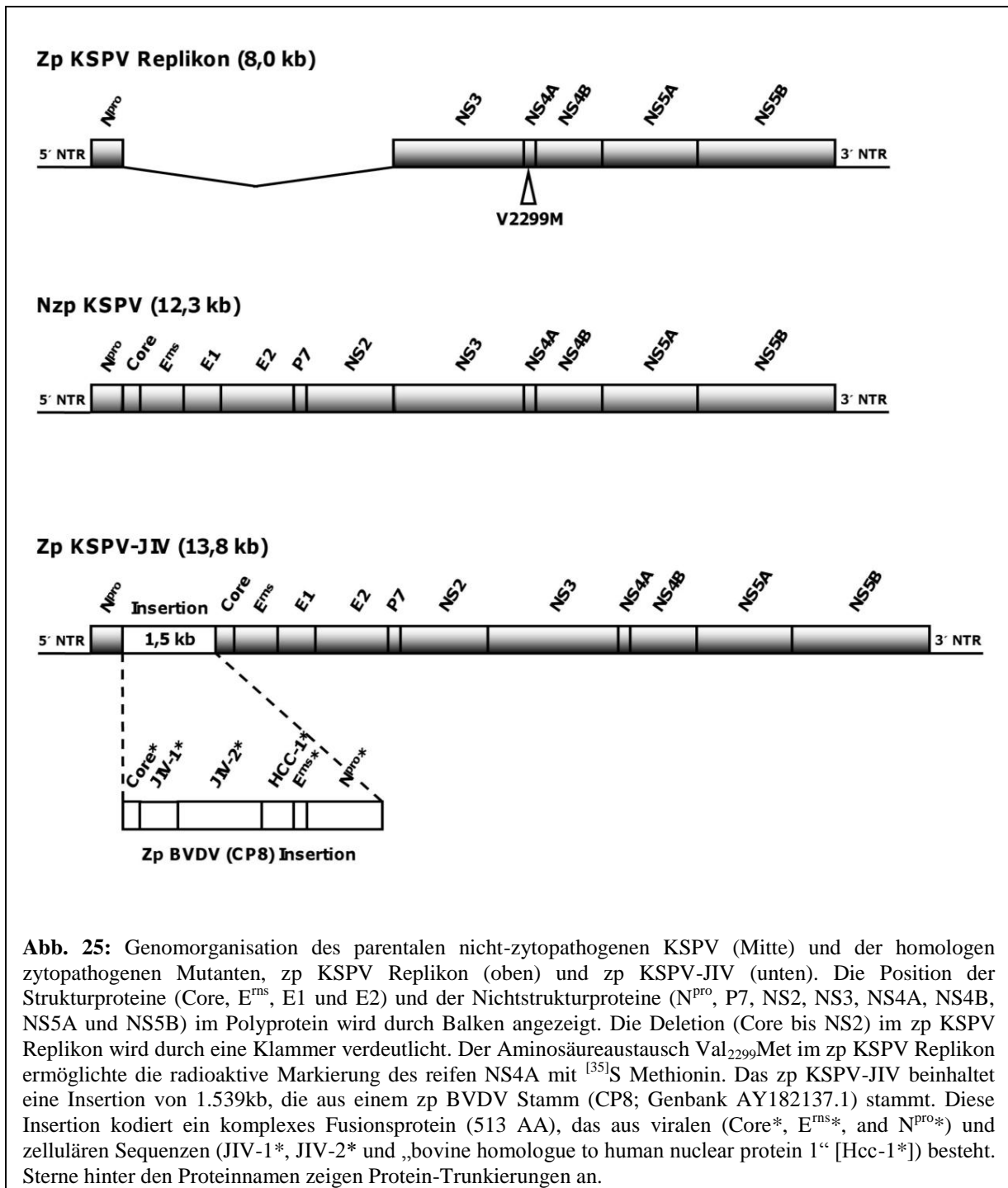
Die Färbung deutet auf eine enge Assoziation der betreffenden Proteine mit den Membranen des endoplasmatischen Retikulums hin. Um genauere Aussagen über die subzelluläre Lokalisation der pestiviralen Nichtstrukturproteine zu erhalten, wären weitergehende Kollokalisations-Studien und Analysen mittels subzellulärer Fraktionierung erforderlich. Der indirekte Immunfluoreszenz-Test wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Spezifität der verwendeten Antikörper genutzt. Zu den im Folgenden beschriebenen Analysen wurden vornehmlich diejenigen Antikörper verwendet, die im Immunfluoreszenz-Test keine Kreuzreaktivität gegen zelluläre Proteine aufwiesen.

5.6 Identifizierung der Nichtstrukturproteine des KSPV in Immunoblot-Analysen

Zur Identifizierung der Nichtstrukturproteine von KSPV wurden Immunoblot-Analysen

5. Ergebnisse

herangezogen. Das zelluläre Gesamtprotein von KSPV infizierten oder mit einem KSPV Replikon transfizierten SK-6 Zellen wurde nach Zellyse in der SDS-PAGE aufgetrennt. Durch die elektrophoretische Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Proteine auf einer Reaktionsoberfläche präsentiert, die eine Bildung der monoklonalen Antikörper ermöglichte. Dabei konnten Kreuzreaktivitäten mit zellulären Proteinen und unspezifische Antikörperbindungen durch den Vergleich zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen erkannt werden.



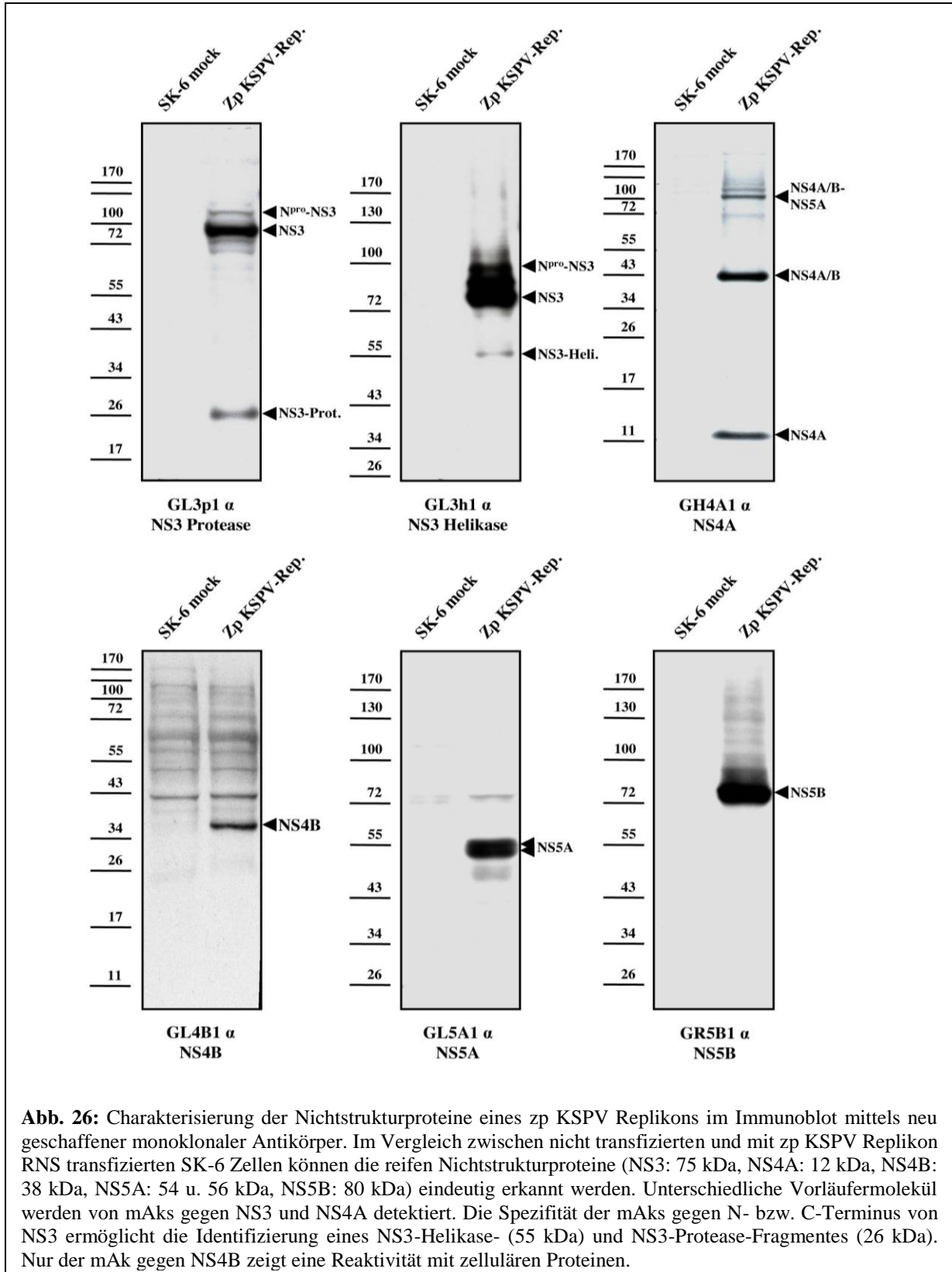
5.6.1 Identifizierung der Nichtstrukturproteine eines zp KSPV Replikons in Immunoblot-Analysen

Die Klassische Schweinepest (KSP) wird durch nicht-zytopathogene (nzp) KSPV ausgelöst. Zytopathogene (zp) Pestiviren und zytopathogene pestivirale Replikons zeigen eine weitaus stärkere Proteinexpression als die im Feld bedeutsameren nicht-zytopathogenen Viren. Um ein dem KSPV homologes pestivirale Replikon zu generieren, wurden im reversen genetischen System alle auf N^{Pro} folgenden Strukturproteine, p7 und das NS2-Protein deletiert, wobei der cDNS-Klon p1372 entstand (Rümenapf, unveröffentlicht). In dem Polyprotein dieses zp KSPV-Replikons folgt auf die sich selbst abspaltende Autoprotease N^{Pro} das pestivirale Nichtstrukturprotein NS3 (Abb. 25). Reifes NS3, das Markerprotein des zytopathogenen Biotyps der Pestiviren, wird daher in großen Mengen exprimiert. Das zytopathogene Replikon wurde nach dem Muster des für BVDV beschriebenen Replikon DI9 (Genbank U03912.1; Tautz et al., 1994) generiert. 15 h nach Transfektion (p. t.) dieses Replikons wurden erste zytopathogene Effekte beobachtet, wobei die virale Proteinexpression bis zum Absterben der Zellen kontinuierlich weiter anstieg. Die Zellen wurden daher 20 h nach der Transfektion der RNS des zp KSPV Replikons gewaschen und in SDS-PAGE Lysispuffer aufgenommen. Die Lysate nicht transfizierter und mit zp KSPV Replikon RNS transfizierter SK-6 Zellen wurden im SDS-Gel aufgetrennt, elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und im Immunoblot analysiert. Die Detektion der Nichtstrukturproteine des zp KSPV Replikons erfolgte mit Hilfe etablierter und neu generierter mAKs gegen die Protease- und Helikase-Domäne von NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (Abb. 26).

Anhand der Nukleotidsequenz des zp KSPV Replikons und der homologen Spaltstellen, die für zp BVDV bestimmt wurden (Tautz et al., 1997), konnten die Molekulargewichte der reifen Nichtstrukturproteine von KSPV (Stamm Alfort/Tübingen; Genbank J04358.2) mit Hilfe der Software „DNS-Strider“ berechnet werden (NS3: 682AS, 78 kDa; NS4A: 63AS, 7 kDa; NS4B: 347AS, 38 kDa; NS5A: 497AS, 56 kDa; NS5B: 717AS, 81 kDa). Die reifen Nichtstrukturproteine NS3 (aMW: 75 kDa), NS4A (aMW: 12k Da), NS4B (aMW: 38 kDa), NS5A (aMW: 54 u. 56 kDa) und NS5B (aMW: 80 kDa) sind im Immunoblot eindeutig zu erkennen. Antikörper gegen den N- bzw. C-Terminus von NS3 detektieren zusätzlich ein N^{Pro}-NS3 Vorläufermolekül (aMW: 95 kDa) und korrespondierende NS3-Protease (aMW: 26 kDa) bzw. NS3-Helikase Fragmente (aMW: 55 kDa). Antikörper gegen NS4A zeigen nach längerer Exposition des Röntgenfilms

5. Ergebnisse

zusätzlich zum reifen Protein eine NS4A/B-NS5A Vorläufermolekül (aMW: 105 kDa) und NS4A/B (aMW: 43 kDa). Beide NS4B spezifischen mAks zeigten eine deutliche Reaktivität gegen zelluläre Proteine in nicht infizierten SK-6 Zellen.



5. Ergebnisse

Die mit NS5A spezifischen mAks beobachtete Doppelbanden des reifen NS5A-Moleküls sind wahrscheinlich durch die beschriebene Hyperphosphorylierung des Moleküls bedingt (Reed et al., 1998). Die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen weisen auf eine hohe Konzentration reifer KSPV Nichtstrukturproteine in Zellen hin, die mit einem zp KSPV Replikon transfiziert wurden.

5.6.2 Identifizierung der Nichtstrukturproteine eines nzp KSPV in Immunoblot-Analysen infizierter SK-6 Zellen

Mit nzp KSPV infizierte SK-6 Zellen zeigten im Immunoblot eine im Vergleich zum Replikon schwächere Expression der Nichtstrukturproteine. Vorversuche ergaben, dass die Menge viraler Nichtstrukturproteine in SK-6 Zellen nach der Infektion mit nzp KSPV bis 48 h ansteigt. Die Zellen wurden daher 48 h nach Infektion (MOI: 1) gewaschen und für die SDS-PAGE lysiert. Die Lysate nicht infizierter und mit nzp KSPV infizierter SK-6 Zellen wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion der Nichtstrukturproteine des nzp KSPV mit den bereits erfolgreich am zp Replikon getesteten mAks (Abb. 27).

Beide Antikörper gegen NS4B zeigten keine eindeutige Reaktivität mit Proteinen von nzp KSPV im Immunoblot. Dagegen sind die reifen Nichtstrukturproteine NS3 (aMW: 75 kDa), NS4A (aMW: 12 kDa), NS5A (aMW: 54 u. 56 kDa) und NS5B (aMW: 80 kDa) in nzp KSPV infizierten Zellen eindeutig zu identifizieren. Alle Antikörper gegen NS2 und gegen den N- bzw. C-Terminus von NS3 detektieren außerdem das Vorläufermolekül NS2-3. Erst nach längerer Exposition des Röntgenfilms wurde die Proteinbande des reifen NS2 (aMW: 54 kDa) im Immunoblot detektiert (NS2: 456AS; bMW: 52 kDa).

Während ein NS3-Helikase Fragment (aMW: 55 kDa) in nzp KSPV infizierten SK-6 Zellen sichtbar ist, konnte das korrespondierende Fragment der NS3-Protease (aMW: 26 kDa) in nzp KSPV nicht nachgewiesen werden. Die Antikörper gegen NS4A, NS5A und NS5B detektierten das gemeinsame Vorläufermolekül mit einem aMW von 170 kDa, das anhand der Übereinstimmung mit der Summe der errechneten Molekulargewichte der Einzelproteine als NS4-5 Vorläufermolekül charakterisiert werden kann. NS4A spezifische mAks zeigen das bereits im zp KSPV Replikon beobachtete NS4A/B Molekül (aMW: 43 kDa). Außerdem kann ein NS5A/B Vorläufermolekül (aMW: 130 kDa) durch die Reaktivität von NS5A als auch von NS5B spezifischen mAks identifiziert werden.

5. Ergebnisse

Wie im zp KSPV Replikon erscheint das reife NS5A Molekül als Doppelbande. Die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen von nzp KSPV infizierten Zellen zeigen, dass Vorläufermoleküle und reife Nichtstrukturproteine in vergleichbaren Mengen auftreten.

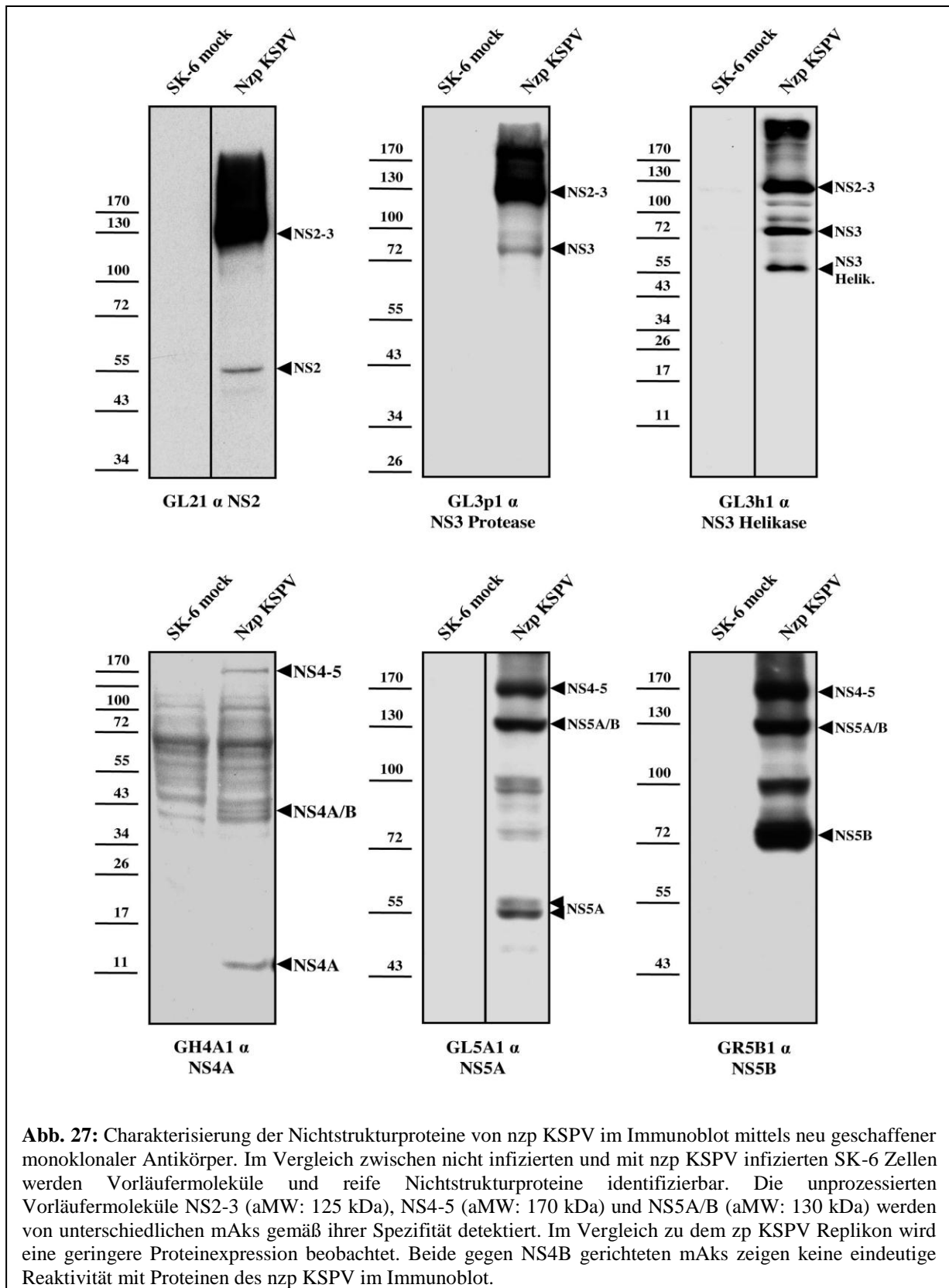


Abb. 27: Charakterisierung der Nichtstrukturproteine von nzp KSPV im Immunoblot mittels neu geschaffener monoklonaler Antikörper. Im Vergleich zwischen nicht infizierten und mit nzp KSPV infizierten SK-6 Zellen werden Vorläufermoleküle und reife Nichtstrukturproteine identifizierbar. Die unprozessierten Vorläufermoleküle NS2-3 (aMW: 125 kDa), NS4-5 (aMW: 170 kDa) und NS5A/B (aMW: 130 kDa) werden von unterschiedlichen mAbs gemäß ihrer Spezifität detektiert. Im Vergleich zu dem zp KSPV Replikon wird eine geringere Proteinexpression beobachtet. Beide gegen NS4B gerichteten mAbs zeigen keine eindeutige Reaktivität mit Proteinen des nzp KSPV im Immunoblot.

5.7 Charakterisierung der Nichtstrukturproteine eines KSPV im Radioimmunpräzipitations-Assay

Mit Hilfe der neu geschaffenen mAks konnten durch Immunoblot-Analysen die Nichtstrukturproteine des KSPV erstmals eindeutig identifiziert werden. Dabei zeigten sich grundlegende Unterschiede zwischen dem Expressionsmuster eines zp KSPV Replikons und des nzp KSPV. Allerdings weist man im Immunoblot virale Proteine nach, die während des gesamten Infektionszeitraum generiert worden sind, so dass keine direkten Aussagen über die Kinetiken der Proteinexpression, Proteinprozessierungen oder Proteininstabilitäten ermöglicht werden. Die während eines definierten Zeitraums synthetisierten Nichtstrukturproteine und deren Prozessierungen wurden daher mittels Radioimmunpräzipitation analysiert. Dazu wurden nicht infizierte SK6-Zellen, nzp KSPV infizierte SK-6 Zellen, zp KSPV infizierte SK-6 Zellen und SK-6 Zellen, die mit RNS eines zp KSPV Replikon transfiziert worden waren, mit radioaktivem [³⁵S] Methionin-Cystein metabolisch markiert. Der Nachweis der pestiviralen Nichtstrukturproteine erfolgte nach Immunpräzipitation durch Autoradiographie.

5.7.1 Charakterisierung der Nichtstrukturproteine eines zp KSPV Replikons im Radioimmunpräzipitations-Assay

Zur genaueren Analyse der Proteinexpression des zp KSPV Replikons wurden die Translationsprodukte von SK-6 Zellen nach Elektroporation der RNS radioaktiv markiert. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen 7 h nach der Transfektion (p. t.) gewaschen und in DMEM-Medium ohne Methionin und Cystein weiterkultiviert. Durch das „Hungern“ sollten die zellulären Speicher dieser essentiellen Aminosäuren aufgebraucht werden. Die eigentliche Markierung erfolgte 8 h p. t. für 1 h durch einen Mediumwechsel zu DMEM-Medium ohne Methionin-Cystein, dem 250 µCi [³⁵S] Methionin-Cystein zugesetzt worden waren. Die Zellen wurden in RIPA-G mit 2% SDS lysiert und die Lysate nach einer thermischen Denaturierung (5 min bei 95 °C) bis zur Verwendung auf – 20 °C gelagert. Zur Immunpräzipitation kamen mAks gegen NS3-Protease, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B zum Einsatz. Dabei zeigte sich, dass ein dem gesamten ORF entsprechendes Polyprotein nicht detektiert werden konnte. NS3 spezifische mAks präzipitierten Proteine mit einem sichtbaren Molekulargewicht von 95 kDa und 75 kDa (Abb. 28, Spur 1). Das Protein von 95 kDa repräsentiert wahrscheinlich ein für diesen Replikontyp spezifisches N^{pro}-NS3 Vorläufermolekül, während das reife NS3 der 75 kDa Bande zugeordnet werden kann. Da kein KSPV N^{pro} spezifischer mAk zur Verfügung

5. Ergebnisse

stand, konnte eine eindeutige Zuordnung des 95 kDa Vorläuferproteins nicht erfolgen. Die gegen NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gerichteten mAbs detektierten ein gemeinsames Vorläufermolekül mit einem aMW von 170 kDa (Abb. 28, Spuren 2, 3, 4, 5). Weil die Aminosäuresequenz von KSPV NS4A (Stamm Alfort/Tübingen) kein Methionin und kein Cystein enthält, ist eine radioaktive Markierung des reifen NS4A mit [³⁵S] Methionin-Cystein und damit die Darstellung im beschriebenen Versuchsaufbau nicht möglich.

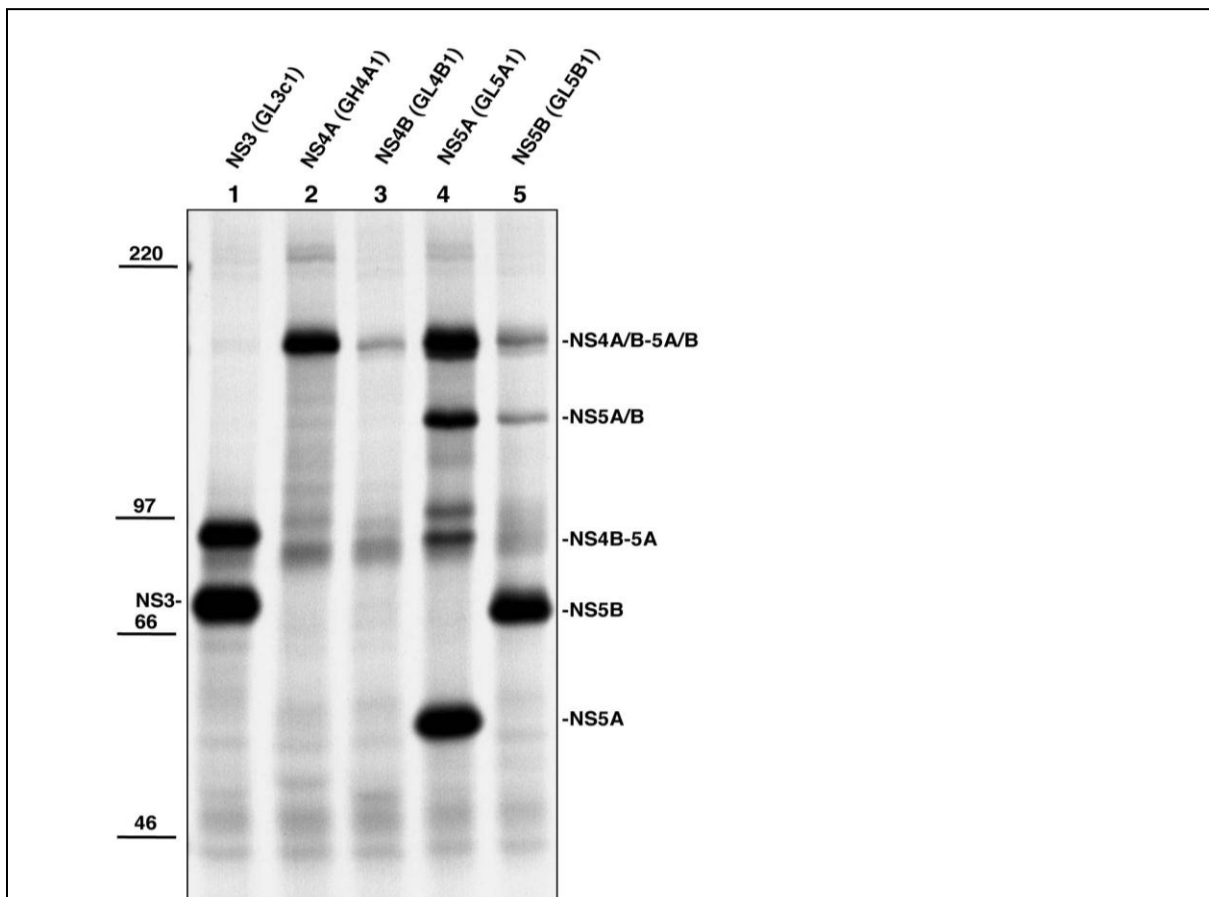


Abb. 28: Charakterisierung der Nichtstrukturproteine eines zp KSPV Replikons in der Immunpräzipitation mittels monoklonaler Antikörper. Acht Stunden nach Transfektion der RNS des zp KSPV Replikons wurde die radioaktive Markierung der Translationsprodukte für 1 h ermöglicht. Die Spezifität der Präzipitationen wurde mit nicht transfizierten SK-6 Zellen überprüft (hier nicht gezeigt). Neben reifen Nichtstrukturproteinen (NS3: 75 kDa, NS5A: 54 kDa und NS5B: 80 kDa) werden auch unprozessierte Vorläufermoleküle (NS4-5: 170 kDa, NS5A/B: 130 kDa und NS4B-5A: 94 kDa) nachgewiesen. Die Vorläufermoleküle NS4-5 und NS5A/B werden von den unterschiedlichen mAbs gemäß ihrer Spezifität detektiert. Die zusätzliche, mit dem NS3-Helikase spezifischen mAk präzipitierte Proteinbande (95 kDa) repräsentiert wahrscheinlich ein von diesem Replikon kodiertes N^{pro}-NS3 Vorläufermolekül.

Weder mit NS4A, noch mit NS4B spezifischen mAbs konnten intermediäre Prozessierungsprodukte (z. B. NS4A/B) nachgewiesen werden. Das im Immunoblot beobachtete reife NS4B wurde in der Radioimmunpräzipitation ebenfalls nicht dargestellt (Abb. 28, Spuren 2 und 3). Gegen NS5A und NS5B gerichtete mAbs präzipitierten neben

5. Ergebnisse

NS4-5 auch ein NS5A/B Vorläufermolekül (aMW: 130 kDa) und die reifen Nichtstrukturproteine (aMW NS5A: 54 kDa, aMW NS5B: 80 kDa; Abb. 28, Spuren 4 und 5). Die im Immunoblot beobachtete NS5A-Doppelbande erscheint in der Radioimmunpräzipitation nicht, aber ein NS4B-5A Vorläufermolekül (aMW: 94 kDa) wird sichtbar. Ein großer Teil der Translationsprodukte des np KSPV Replikons liegt im Verlauf der radioaktiven Markierung bereits als reifes Prozessierungsprodukt vor, wobei Prozessierungsintermediate beobachtet werden können. Da kein vollständiges Polyprotein des Replikons sichtbar ist, wird eine kotranslationale Spaltung zwischen den Vorläufermolekülen N^{pro}-NS3 und NS4-5 vermutet.

5.7.2 Charakterisierung der Nichtstrukturproteine des np KSPV im Radioimmunpräzipitations-Assay

Die Expression der Nichtstrukturproteine eines np KSPV (Wildtyp) wurde nach Infektion von SK-6 Zellen mit einer MOI von 10 untersucht. Zur radioaktiven Markierung der Translationsprodukte wurden jeweils 1×10^6 Zellen zuerst 23h p. i. gewaschen und in DMEM-Medium ohne Methionin und Cystein weiterkultiviert. Die Markierung erfolgte 24 h nach KSPV Infektion für 1 h durch Zusatz von 250 μ Ci [³⁵S] Methionin-Cystein. Die Immunpräzipitation erfolgte mit mAbs gegen NS2, NS3-Protease, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Wiederum wurde kein virales Polyprotein detektiert, das den gesamten C-terminalen Nichtstrukturproteinbereich von NS2 bis NS5B umfasst (Abb. 29, Spuren 1-6). Mit gegen NS2 gerichteten mAbs wurde nur das ungespaltene NS2-3 Molekül (125 kDa) dargestellt (Abb. 29, Spur 1). Antikörper gegen die NS3-Helikase präzipitierten NS2-3 und geringe Mengen des reifen NS3 (75 kDa; Abb. 29, Spur 2). Sowohl NS4A, als auch NS4B spezifische mAbs zeigen in der Immunpräzipitation nur das ungespaltene NS4-5 Molekül (125 kDa).

Dabei ist es wiederum nicht möglich, ein reifes NS4A Molekül, dem [³⁵S] markierte Aminosäuren fehlen, zu detektieren (Abb. 29, Spuren 3 und 4). Die mAbs gegen NS5A und NS5B zeigten die Vorläufermoleküle NS4-5 (170 kDa), NS5A/B (130 kDa) und NS4B-NS5A (94 kDa). Nur geringe Mengen von reifem NS5B (80 kDa) wurden in der Immunpräzipitation dargestellt (Abb. 29, Spur 5). Reifes NS5A war dagegen nicht sichtbar (Abb. 29, Spur 6). In np KSPV infizierten Zellen erschienen in der Immunpräzipitation hauptsächlich Vorläufermoleküle und Prozessierungsintermediate. Da NS2-3 bzw. NS4-5 die jeweils größten beobachteten Polyproteine sind, erscheint eine

5. Ergebnisse

kotranslationale NS3/NS4A-Spaltung wahrscheinlich. Im Vergleich zum zp KSPV Replikon wurden nur sehr geringe Mengen der reifen Nichtstrukturproteine (NS3 und NS5B) präzipitiert. Die Konzentrationen der Nichtstrukturproteine NS2, NS4B und NS5A erreichten auch nach längerer Exposition des Röntgenfilms nicht die Nachweisschwelle des Detektionssystems (Daten nicht gezeigt).

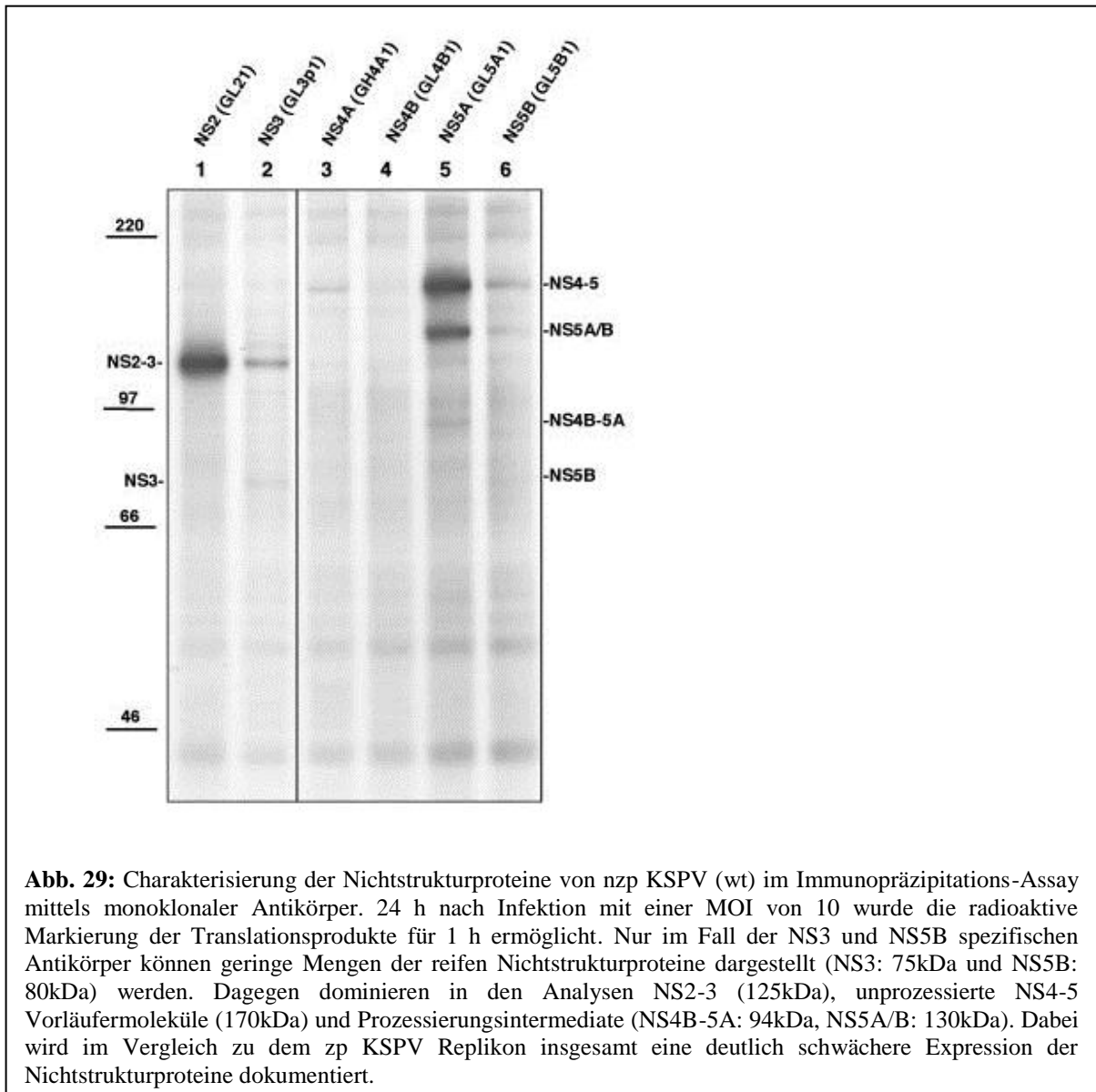


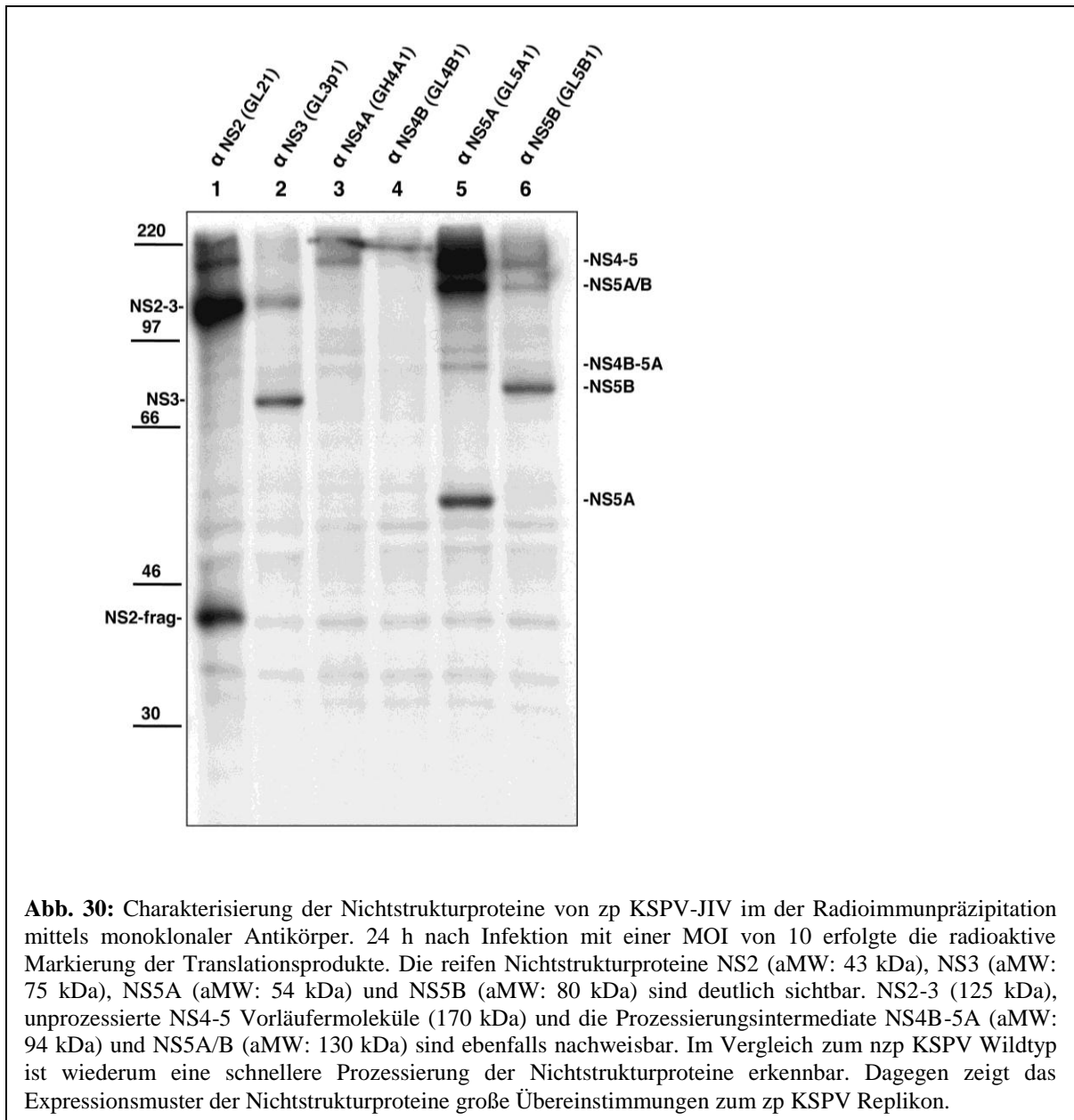
Abb. 29: Charakterisierung der Nichtstrukturproteine von nzp KSPV (wt) im Immunpräzipitations-Assay mittels monoklonaler Antikörper. 24 h nach Infektion mit einer MOI von 10 wurde die radioaktive Markierung der Translationsprodukte für 1 h ermöglicht. Nur im Fall der NS3 und NS5B spezifischen Antikörper können geringe Mengen der reifen Nichtstrukturproteine dargestellt (NS3: 75kDa und NS5B: 80kDa) werden. Dagegen dominieren in den Analysen NS2-3 (125kDa), unprozessierte NS4-5 Vorläufermoleküle (170kDa) und Prozessierungsintermediate (NS4B-5A: 94kDa, NS5A/B: 130kDa). Dabei wird im Vergleich zu dem zp KSPV Replikon insgesamt eine deutlich schwächere Expression der Nichtstrukturproteine dokumentiert.

5.7.3 Charakterisierung der Nichtstrukturproteine des zp KSPV-JIV im Radioimmunpräzipitations-Assay

In der Expression und Prozessierung der Nichtstrukturproteine wurden substantielle Unterschiede zwischen nzp KSPV und einem zp KSPV Replikon beobachtet. Es sollte darüber hinaus geklärt werden, ob ein infektiöses zytopathogenes KSPV ebenfalls eine beschleunigte Prozessierung der NS4-5 Vorläufermoleküle zeigt. Zu diesem Zweck wurde

5. Ergebnisse

die Proteinexpression des im reversen genetischen System erzeugten zp KSPV-JIV (Abb. 25; Gallei et al., 2008) nach *in vitro* Infektion untersucht.



Die Nichtstrukturproteine des zp KSPV-JIV wurden 24 h nach Infektion (MOI: 10) metabolisch mit 250 μCi [^{35}S] Methionin-Cystein markiert präzipitiert. Im zp KSPV-JIV konnten Präzipitationen mit mAks gegen NS2, NS3-Protease, NS5A und NS5B die reifen Nichtstrukturproteine nachweisen. Das ungespaltene NS2-3 Molekül (125 kDa) erschien in Präzipitationen mit NS2 und NS3-Helikase spezifischen mAks (Abb. 30, Spur 1 und 2). Gleichzeitig zeigen Antikörper gegen NS2 ein kleineres NS2-Fragment (aMW: 43 kDa; Abb. 30, Spur 1) und Antikörper gegen die NS3-Helikase das reife NS3 (aMW: 75 kDa; Abb. 30, Spur 2). Wie im zp KSPV Replikon und im nzp KSPV detektierten NS4A und

5. Ergebnisse

NS4B spezifische mAbs nur das unprozessierte NS4-5 Molekül (aMW: 170 kDa; Abb. 30, Spur 3 und 4). Antikörper gegen NS5A und NS5B präzipitierten sowohl die Vorläufermoleküle NS4-5 (aMW: 170 kDa), NS5A/B (aMW: 130 kDa), NS4B-5A (aMW: 94 kDa), als auch die reifen Nichtstrukturproteine NS5A (aMW: 54 kDa) und NS5B (aMW: 80 kDa; Abb. 30, Spur 5 und 6).

Reifes NS3 wurde als Markerprotein des zytopathogenen Biotyps identifiziert und katalysiert die Spaltung der NS4-5 Vorläufermoleküle. Die Radioimmunpräzitationen aus zp KSPV-JIV infizierten Zellen belegen, dass eine schnellere Prozessierung der NS4-5 Vorläufermoleküle ein weiteres Charakteristikum des zp Biotyps darstellt.

5.8 Analyse der Kinetik der Nichtstrukturprotein-Prozessierung in nzp KSPV, zp KSPV-JIV und zp KSPV Replikon

Um die beobachteten Unterschiede in der Nichtstrukturprotein-Prozessierung zwischen nzp und zp Biotyp des KSPV zu quantifizieren, wurde die Stabilität der Vorläufermoleküle und ihrer Prozessierungsprodukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion und Transfektion untersucht. Dazu wurden SK-6 Zellkulturen mit nzp KSPV und zp KSPV-JIV infiziert (MOI 10), oder mit dem zp KSPV-Replikon transfiziert. 12, 24 und 72 h nach Infektion mit dem nzp KSPV, 24 h nach Infektion mit dem zp KSPV-JIV und 8 h nach Transfektion der zp KSPV-Replikon RNA wurden die viralen Translationsprodukte für 1 h durch Zusatz von 250 μCi [^{35}S] Methionin-Cystein radioaktiv markiert.

Zur Erstellung der Kinetik wurde jeweils eine Kultur direkt nach der Markierung geerntet und lieferte damit den Ausgangswert („pulse“; 0 h). In den weiteren Kulturen wurde das Markierungs-Medium entfernt, die Zellen mit DMEM-Medium gewaschen und in frischem DMEM-Medium weiterkultiviert, das zusätzlich 1 mM Methionin und Cystein enthielt. Nach Inkubationszeiten von 0,5 h, 1,5 h, 4,5 h und 24 h wurden auch diese anderen Kulturen gewaschen und lysiert („chase“). Nach der Zelllyse in 2% SDS/RIPA-Puffer wurden die Proteine thermisch denaturiert (5 min bei 95 °C) und bis zur Verwendung auf -20 °C gelagert. Die Immunpräzitation erfolgte mit mAbs gegen NS2, NS3-Helikase, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Durch die zeitlich gestaffelten Autoradiographien ist es möglich, die Prozessierung und den Abbau radioaktiv markierter Moleküle visuell darzustellen (Abb. 31). Zur Ermittlung der Stabilität von reifem NS4A

5. Ergebnisse

wurde ein modifiziertes zp KSPV-Replikon mit dem Aminosäureaustausch V₂₂₉₉M verwendet (zp KSPV-ReplikonV₂₂₉₉M), das eine ³⁵S-Markierung des reifen Proteins ermöglicht. Das hier verwendete zp KSPV-ReplikonV₂₂₉₉M (p1372V₂₂₉₉M) zeigte die gleiche Proteinexpression wie das parentale zp KSPV-Replikon ohne Mutation (p1372). Die Mutation V₂₂₉₉M wurde zusätzlich im Kontext des genomischen nzp KSPV getestet (p447V₂₂₉₉M) und verursachte keine Änderung des Phänotyps oder der Virusausbreitung.

Die 24 h nach Infektion mit nzp KSPV markierte NS2-3 Moleküle wurden mit Hilfe von NS2 spezifischen Antikörpern über einen Zeitraum von 24 h beobachtet. Dabei wurde ein Signal von NS2-3 (aMW: 125 kDa) mit langsam abnehmender Intensität dargestellt. Reifes NS2 (aMW: 54 bzw. 43 kDa) konnte nicht detektiert werden (Abb. 31, A).

Mittels eines NS3-Protease spezifischen Antikörpers wurde die Prozessierung von NS3 im zp KSPV-Replikon, im nzp KSPV und im zp KSPV-JIV untersucht. Im zp KSPV-Replikon erscheint ein N^{pro}-NS3 Vorläufermolekül (aMW: 95 kDa), das innerhalb von 4,5 h vollständig verschwindet. Das Signal des reifen NS3 (aMW: 75 kDa) ist unmittelbar nach der Markierung deutlich erkennbar und verliert im Beobachtungszeitraum nur langsam an Intensität (Abb. 31, B, linke Autoradiographie). In nzp KSPV infizierten Zellen sind dominante NS2-3 Banden nach unterschiedlichen Infektionszeiten (12 h, 24 h, 72 h) nachweisbar. Die Expression von NS2-3 weist zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion deutliche Unterschiede auf. Nach der Infektion steigt die NS2-3 Expression kontinuierlich an, erreicht etwa 24 h p. i. ein Maximum und fällt danach wieder ab. Die Signale der NS2-3 Vorläufermoleküle zeigen aber im gesamten Infektionsverlauf eine gleichbleibend langsame Abschwächung nach der Markierung. In den Präzipitationen können außerdem unmittelbar nach der Markierung geringe Mengen von freiem NS3 nachgewiesen werden. Die Signalintensität des reifen NS3 steigt leicht innerhalb der ersten 0,5 h nach der Markierung (Abb. 31, B, rechte Autoradiographien). Trotz der Expressionsunterschiede von NS2-3 bleibt die Menge an daraus hervorgegangenem NS3 nahezu konstant im Verlauf der Infektion. Im zp KSPV-JIV wird eine gesteigerte Effizienz der NS2-3 Spaltung beobachtet. Bereits kotranslational wird der überwiegende Teil der NS2-3 Moleküle zu reifem NS3 umgesetzt. Die kinetische Analyse belegt aber, dass verbliebene NS2-3 Moleküle eine vergleichsweise hohe Stabilität aufweisen. Dennoch wird wiederum ein posttranslationaler Anstieg der NS3 Konzentration dokumentiert (Abb. 31, G).

Präzipitationen mit einem NS4B spezifischen Antikörper zeigen ebenfalls im gesamten

5. Ergebnisse

Beobachtungszeitraum nur Signale der NS4-5 Vorläufermoleküle. Weder die Generierung von NS4A/B Prozessierungsintermediaten, noch die des reifen NS4B kann nachgewiesen werden (Abb. 31, D). Die durch NS4A und NS4B spezifische Antikörper dokumentierte Kinetik der NS4-5 Prozessierung ist deckungsgleich (Abb. 31, C und D).

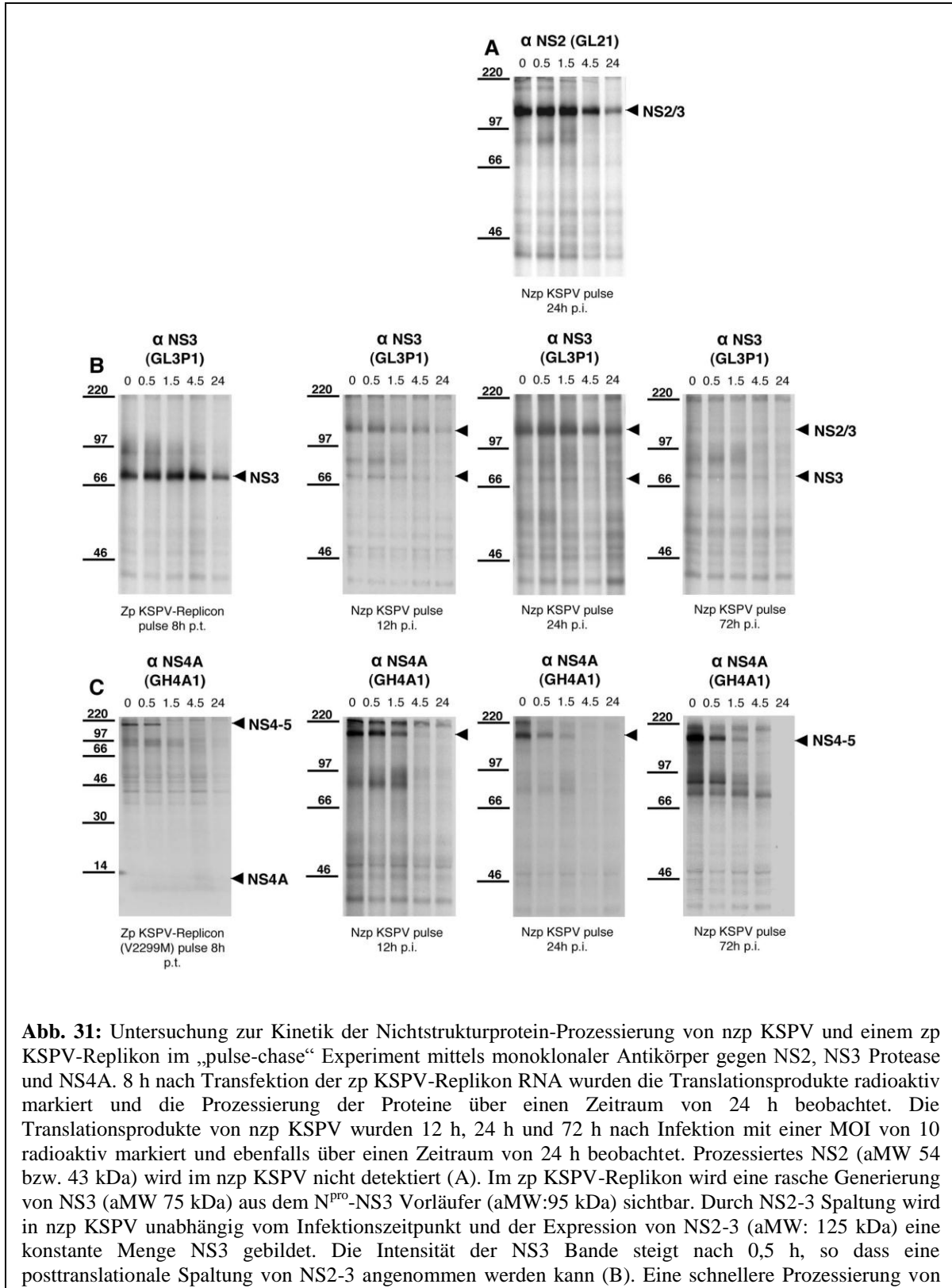
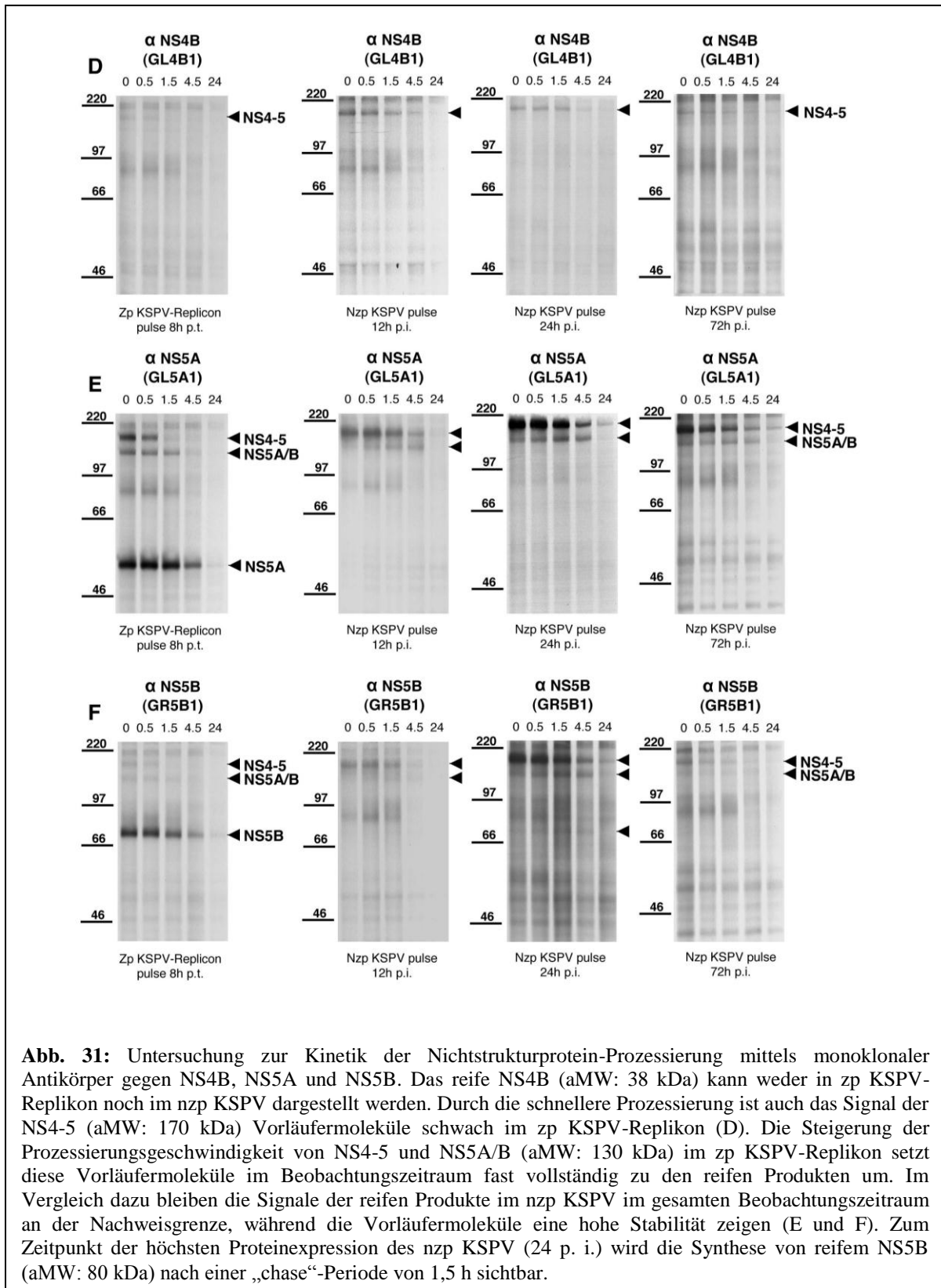


Abb. 31: Untersuchung zur Kinetik der Nichtstrukturprotein-Prozessierung von nzp KSPV und einem zp KSPV-Replikon im „pulse-chase“ Experiment mittels monoklonaler Antikörper gegen NS2, NS3 Protease und NS4A. 8 h nach Transfektion der zp KSPV-Replikon RNA wurden die Translationsprodukte radioaktiv markiert und die Prozessierung der Proteine über einen Zeitraum von 24 h beobachtet. Die Translationsprodukte von nzp KSPV wurden 12 h, 24 h und 72 h nach Infektion mit einer MOI von 10 radioaktiv markiert und ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h beobachtet. Prozessiertes NS2 (aMW 54 bzw. 43 kDa) wird im nzp KSPV nicht detektiert (A). Im zp KSPV-Replikon wird eine rasche Generierung von NS3 (aMW 75 kDa) aus dem N^{pro}-NS3 Vorläufer (aMW:95 kDa) sichtbar. Durch NS2-3 Spaltung wird in nzp KSPV unabhängig vom Infektionszeitpunkt und der Expression von NS2-3 (aMW: 125 kDa) eine konstante Menge NS3 gebildet. Die Intensität der NS3 Bande steigt nach 0,5 h, so dass eine posttranslationale Spaltung von NS2-3 angenommen werden kann (B). Eine schnellere Prozessierung von

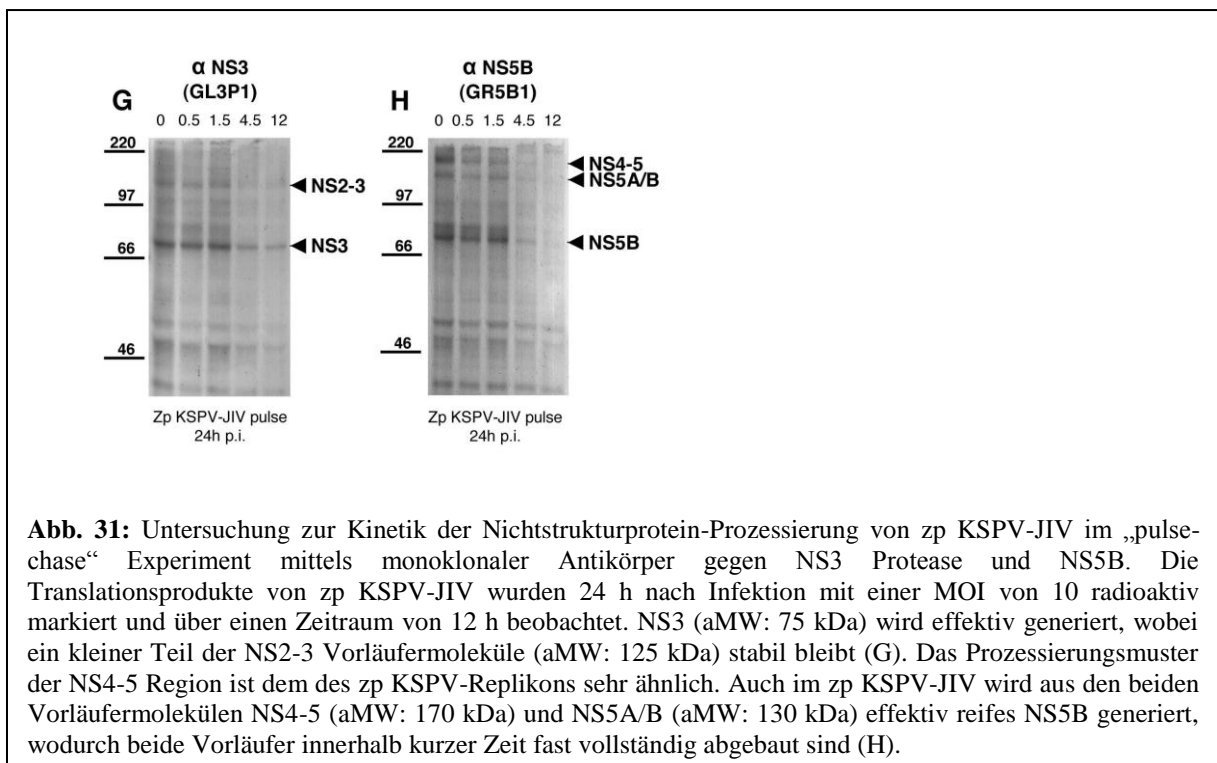
5. Ergebnisse



Präzipitationen mit Antikörpern gegen NS4A zeigen einen vollständigen Umsatz der NS4-5 Vorläufermoleküle (aMW: 170 kDa) im zp KSPV-Replikon innerhalb von 4,5 h. Prozessierungsintermediate, wie z. B. NS4A/B Vorläufermoleküle, können nicht

5. Ergebnisse

nachgewiesen werden. Der Aminosäureaustausch V₂₂₉₉M ermöglicht eine Beobachtung des reifen NS4A (aMW: 12 kDa) im zp KSPV-ReplikonV₂₂₉₉M direkt nach der Markierung. Durch die Markierung einer einzelnen Aminosäure und das geringe Molekulargewicht von NS4A ist das Signal der Autoradiographie des reifen NS4A im Röntgenfilm nur schwach (Abb. 31, C, linke Autoradiographie). Im nzp KSPV werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion nur Signale der NS4-5 Vorläufermoleküle beobachtet, die noch 4,5 h nach der radioaktiven Markierung detektiert werden können (Abb. 31, C, linke Autoradiographien).



Mit Hilfe von Antikörpern gegen NS5A und NS5B kann die Prozessierung von NS4-5 (aMW: 175 kDa) über NS5A/B (aMW: 130 kDa) zu den reifen Produkten NS5A (aMW: 54 kDa) und NS5B (aMW: 80 kDa) dargestellt werden. Während die NS4-5 Moleküle im zp KSPV-Replikon und im zp KSPV-JIV innerhalb von 1,5 h fast vollständig umgesetzt werden, werden im nzp KSPV nach 4,5 h noch größere Mengen des Vorläufermoleküls beobachtet (Abb. 31, E, F und H). Das Prozessierungsintermediat NS5A/B ist ebenfalls nach 4,5 h im KSPV-JIV und zp KSPV-Replikon kaum mehr zu detektieren. Im Gegensatz dazu erreicht die Konzentration von NS5A/B erst 1,5 h nach der Markierung ihr Maximum im nzp KSPV (Abb. 31, E und F). Die Autoradiographie-Signale der reifen Proteine NS5A und NS5B überwiegen in den Präzipitationen des zp KSPV-JIV und des zp KSPV-Replikons. Dabei kann der im Immunoblot dokumentierte Massenzuwachs von

5. Ergebnisse

NS5A auf 56 kDa nach radioaktiver Markierung nicht beobachtet werden. Im nzp KSPV wird nur zum Zeitpunkt der maximalen Proteinexpression (24 h p. i.) eine Freisetzung des reifen NS5B sichtbar (Abb. 31, F, zweite Autoradiographie von rechts). Im Verlauf der nzp KSPV Infektion werden keine Unterschiede in der Kinetik der NS4-5 und NS5A/B Prozessierung beobachtet, obwohl die Expression des NS4-5 Vorläufermoleküls einem zyklischen Verlauf unterliegt. Wie schon für NS2-3 beschrieben, steigt auch die Expression von NS4-5 nach der Infektion kontinuierlich an, erreicht um 24 h p. i. ein Maximum und fällt dann wieder ab.

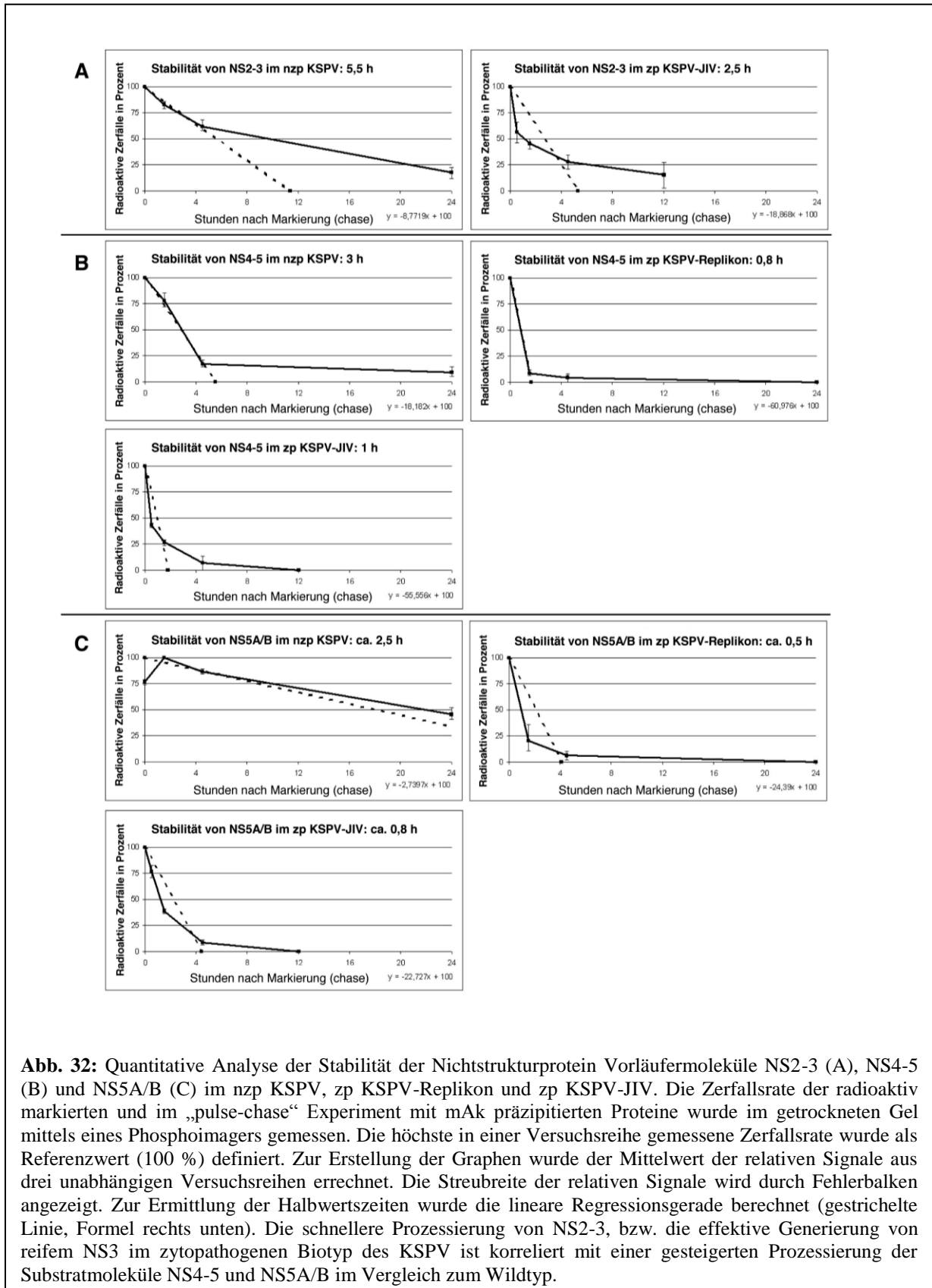
5.9. Quantitative Bestimmung der Halbwertszeiten der Nichtstrukturproteine und Vorläufermoleküle im nzp KSPV, zp KSPV-JIV und zp KSPV Replikon

Um quantitative Aussagen zur Proteinprozessierung und –stabilität zu ermöglichen, wurden die radioaktiven Zerfälle pro Zeiteinheit für die SDS-PAGE-Banden der Nichtstrukturproteine mit einem Phosphoimager bestimmt. Drei voneinander unabhängige Reihenversuche wurden zur Erstellung der Kinetiken gemessen. Dabei wurden große Unterschiede in der absoluten Signalintensität zwischen den einzelnen Versuchsreihen beobachtet. Die relativen Signalunterschiede innerhalb der Versuchsreihen zeigten dagegen große Übereinstimmungen. Deshalb wurden die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen zusammengeführt, indem ein Mittelwert der relativen Signalintensität (in %) gebildet wurde. Das absolut stärkste Signal in der Kinetik eines Proteins innerhalb einer Versuchsreihe wurde als Referenzwert definiert (100 %). Zur Auswertung wurden dann die Daten in Graphen analysiert (Abb. 32).

Die einzelnen Graphen zeigen die arithmetischen Mittelwerte der relativen Signalintensität von Vorläuferproteinen, Prozessierungsintermediaten und –produkten im Zeitverlauf nach der radioaktiven Markierung. Die Streubreite der Einzelwerte wird durch Fehlerbalken angezeigt. Der gleichförmige Abfall der Signalintensität innerhalb der ersten Stunden nach der radioaktiven Markierung legt einen linearen Zusammenhang der Werte nahe. Die Präzipitationen zu späten Zeitpunkten nach der Markierung (12 h und 24 h) zeigen dagegen keine lineare Korrelation zu den restlichen Werten. Zu diesen Zeitpunkten sind viele primär markierte Proteine bereits proteolytisch degradiert. Eine sekundäre Markierung von Translationsprodukten durch Einbau primär markierter und wieder freigesetzter Aminosäuren kann nicht ausgeschlossen werden. Unter Ausschluss der Werte für 12 h und 24 h nach Markierung wurden für die Proteinbanden der Versuchsreihen

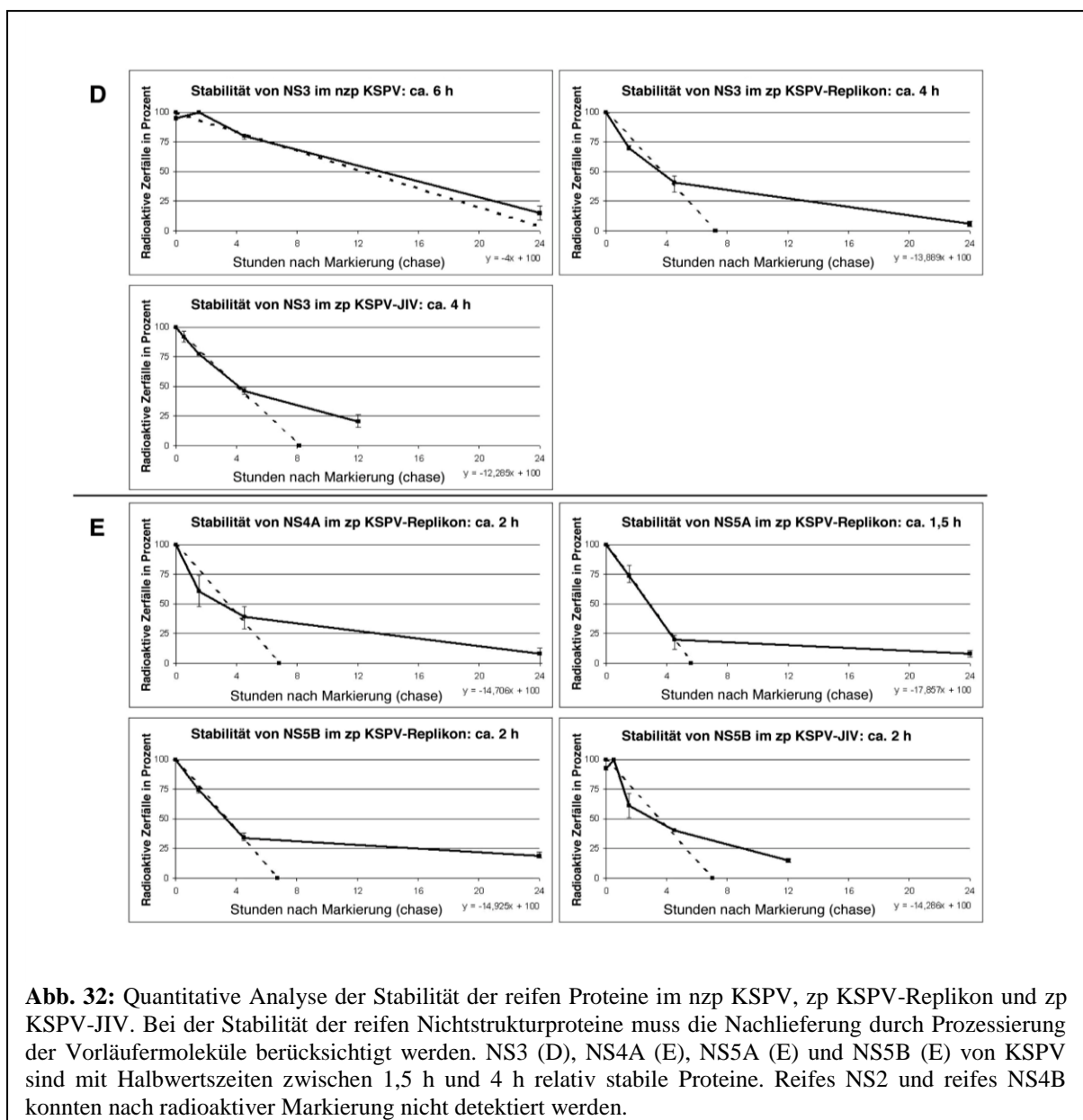
5. Ergebnisse

lineare Regressionen berechnet. Anhand der Regressionsgeraden konnten die Halbwertszeiten der primär generierten Proteine (NS2-3 und NS4-5) abgeleitet werden.



5. Ergebnisse

Die Halbwertszeiten der davon abgeleiteten Prozessierungsintermediate (NS5A/B) und -produkte (z. B. NS3, NS5B) mussten unter Einbeziehung der weiteren Nachlieferung geschätzt werden. Die quantitativen Auswertungen ergaben eine Halbwertszeit von 5,5 h für NS2-3 im nzp KSPV Wildtyp. Im Vergleich dazu ist die Halbwertszeit von NS2-3 im zp KSPV-JIV mit 2,5 h deutlich vermindert. Während im nzp KSPV nur ungefähr 15 % der NS2-3 Moleküle im Verlauf der Markierung gespalten worden waren, lag der Prozentsatz des reifen NS3 im zp KSPV-JIV bereits nach der Markierung bei mehr als 60 % (Abb. 32, A). Der schnelle Umsatz des N^{pro}-NS3 Vorläufermoleküls im zp KSPV-Replikon ermöglicht eine Bestimmung der Halbwertszeit des reifen NS3 von ungefähr 4 h. Unter Berücksichtigung der fortlaufenden Nachlieferung ergeben sich für nzp KSPV (NS3 T_{1/2}: ca. 6 h) und zp KSPV-JIV (NS3 T_{1/2}: ca. 4 h) ähnliche Halbwertszeiten (Abb. 32, D).



5. Ergebnisse

Die Halbwertszeit des NS4-5 Vorläufermoleküls beträgt für das nzp KSPV 3 h und direkt nach der Markierung werden keine Prozessierungsprodukte detektiert. Ein großer Teil der NS4-5 Moleküle ist im zp KSPV-Replikon (70 %) und im zp KSPV-JIV (50 %) bereits nach der radioaktiven Markierung prozessiert. Gleichzeitig ist auch die nach der Markierung gemessene Halbwertszeit dieses Vorläufermoleküls wesentlich kürzer. NS4-5 wird mit einer Halbwertszeit von 1 h im zp KSPV-JIV und mit einer Halbwertszeit von 0,8 h im zp KSPV-Replikon abgebaut. Daraus kann geschlossen werden, dass NS4-5 in beiden zytopathogenen KSPV-Formen mehr als dreimal so schnell umgesetzt wird wie im nzp KSPV Wildtyp (Abb. 32, B). Das NS5A/B Prozessierungsintermediat zeigt eine Halbwertszeit von 2,5 h im nzp KSPV unter Berücksichtigung der weiteren Spaltung von NS4-5. Die Halbwertszeit des Prozessierungsintermediates NS5A/B ist wiederum ungefähr dreimal kürzer im zp KSPV-Replikon (NS5A/B $T_{1/2}$: 0,5 h) und im zp KSPV-JIV (NS5A/B $T_{1/2}$: 0,8 h) im Vergleich zum nzp KSPV Wildtyp (Abb. 32, C). Die gleichförmig kürzeren Halbwertszeiten beider Substratmoleküle in den zytopathogenen Biotypen von KSPV im Vergleich zum parentalen nicht-zytopathogenen KSPV belegen eine gesteigerte spezifische Prozessierung durch die NS3-Protease.

Zur Berechnung der Halbwertszeiten der reifen Proteine wurde das zp KSPV-Replikon herangezogen, da in diesem die Vorläufermoleküle innerhalb der ersten 1,5 h fast vollständig umgesetzt werden. Die Halbwertszeiten von NS3 ($T_{1/2}$: 4 h), NS4A ($T_{1/2}$: 1,5 h), NS5A ($T_{1/2}$: 2 h) und NS5B ($T_{1/2}$: 2 h) belegen, dass die reifen Nichtstrukturproteine relativ stabil sind (Abb. 30, D und E).

6. Diskussion

Zum Nachweis der pestiviralen Nichtstrukturproteine nutzte man in früheren Studien über zytopathogene (zp) BVDVs polyvalente Seren (Collett et al., 1991). Weil diese Seren in ihrer Spezifität und Sensitivität limitiert waren, konnten die Nichtstrukturproteine von nicht-zytopathogenen (nzp) Pestiviren meist nicht eindeutig detektiert werden. Die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen NS3 war Voraussetzung für die Untersuchung der Biosynthese von NS3 in nzp Pestiviren (Lackner et al., 2004). Mit Ausnahme des NS3 wurden die Nichtstrukturproteine von KSPV bislang nicht in infizierten Zellen dargestellt. Weil sich niemand die Mühe machte, geeignete Reagenzien gegen die anderen Nichtstrukturproteine zu entwickeln, unterblieb eine Charakterisierung der Nichtstrukturprotein-Prozessierung bei nzp Pestiviren. Um eine eindeutige und reproduzierbare Detektion der Nichtstrukturproteine zu gewährleisten, war es daher nötig, monoklonale Antikörper gegen alle Nichtstrukturproteine herzustellen. Die rekombinante Expression der Proteine, die Herstellung und die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper erwiesen sich als sehr zeit- und arbeitsintensiv (2-3 Jahre). Um einen Bezugspunkt für vergleichende Analysen der Proteinprozessierung zu setzen, wurden außerdem an BVDV angelehnte nzp und zp Varianten eines KSPV-Virusstamms hergestellt.

6.1 Expression der KSPV Nichtstrukturproteine und Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde ungefähr 1 mg des gereinigten Antigens für die Immunisierung der Versuchstiere sowie zur Durchführung der Screening-ELISA benötigt. Weil eine Expression in *E. coli* die benötigte Quantität der Antigene liefert und mit geringen Kosten verbunden ist, wurde die Expression der KSPV Nichtstrukturproteine in unterschiedliche *E. coli* Expressionsvektoren untersucht. Zur Reinigung wurden Polyhistidin-Markierung und Ni²⁺-Affinitätschromatographie wegen der hohen Effizienz und der Toleranz gegenüber denaturierenden Agenzien eingesetzt. Für jedes Protein mussten Expressionskonstrukt, Expressionsbedingungen, Reinigung und Test-ELISA einzeln optimiert werden. Nach Immunisierung erbrachten Zellfusionen murine monoklonale Antikörper (mAbs) gegen alle KSPV Nichtstrukturproteine. Die in dieser Arbeit verwendeten mAbs gegen KSPV NS4A und NS5B wurden in gleicher Weise in der Arbeitsgruppe hergestellt (Roman-Sosa 2008).

6.2 Identifizierung der reifen Nichtstrukturproteine und ihrer Vorläufermoleküle in KSPV infizierten Zellen

Zur Verifizierung der Spezifität wurden alle gegen pestivirale Nichtstrukturproteine gerichteten mAks im indirekten Immunfluoreszenz-Test untersucht. Im Vergleich zwischen KSPV infizierten und nicht infizierten SK-6 Zellen zeigten mAks gegen NS2, die NS3 Helikase, NS4A, NS5A und NS5B ausschließlich eine Reaktion mit den KSPV infizierten Zellen (Abb. 24). Antikörper gegen die Protease Domäne von NS3 erzeugten keine Signale im Immunfluoreszenz-Test. Dagegen zeigten beide gegen NS4B gerichteten mAks auch mit nicht infizierten SK-6 Zellen deutliche Hintergrundsignale. Die Immunfluoreszenzen der mAks gegen NS2, NS3, NS4A, NS5A und NS5B zeigen übereinstimmend ein perinukleäres, zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster in KSPV infizierten Zellen. Dies spricht für eine enge Assoziation der pestiviralen Nichtstrukturproteine mit Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Weiterführende Zellfraktionierungen und Kolokalisations-Studien mit den KSPV Nichtstrukturproteinen und zellulären Markerproteinen werden erforderlich sein, um diese Erkenntnisse zur subzellulären Lokalisation der Nichtstrukturproteine zu untermauern. Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen diente die Immunfluoreszenz aber vor allem der Charakterisierung der mAks.

Durch Immunoblot-Experimente wurden mit Hilfe der mAks im zp KSPV Replikon alle reifen Nichtstrukturproteine identifiziert, wobei apparente (aMW) und berechnete Molekulargewichte (bMW) große Übereinstimmungen zeigten (Abb. 26). Während NS3 (aMW: 75 kDa; bMW: 78 kDa), NS4A (aMW: 12 kDa; bMW: 7 kDa), NS4B (aMW: 38 kDa; bMW: 38 kDa), NS5A (aMW: 54 u. 56 kDa; bMW: 56 kDa) und NS5B (aMW: 80 kDa; bMW: 81 kDa) deutlich erkennbar waren, konnten Vorläufermoleküle nicht eindeutig dargestellt werden. Die mAks gegen NS4B zeigten dabei ein schwaches Signal des reifen NS4B (aMW: 38 kDa) gegenüber vielen unspezifischen Reaktionen mit zellulären Proteinen. Die Doppelbande des reifen NS5A wird vermutlich durch Hyperphosphorylierung des Moleküls bedingt, wie sie für BVDV und HCV beschrieben wurde (Reed et al., 1998). Neben dem reifen NS3 erschien zusätzlich ein N^{pro}-NS3 Vorläufermolekül (aMW: 116 kDa) und zwei korrespondierende N- und C-terminale Spaltprodukte einer internen NS3 Prozessierung (aMW: 26 kDa bzw. 55 kDa). Signale eines NS4A/B-NS5A Vorläufermoleküls (aMW: 105 kDa) und eines NS4A/B Vorläufermoleküls (aMW: 43 kDa) wurden nach längerer Exposition des Röntgenfilms sichtbar.

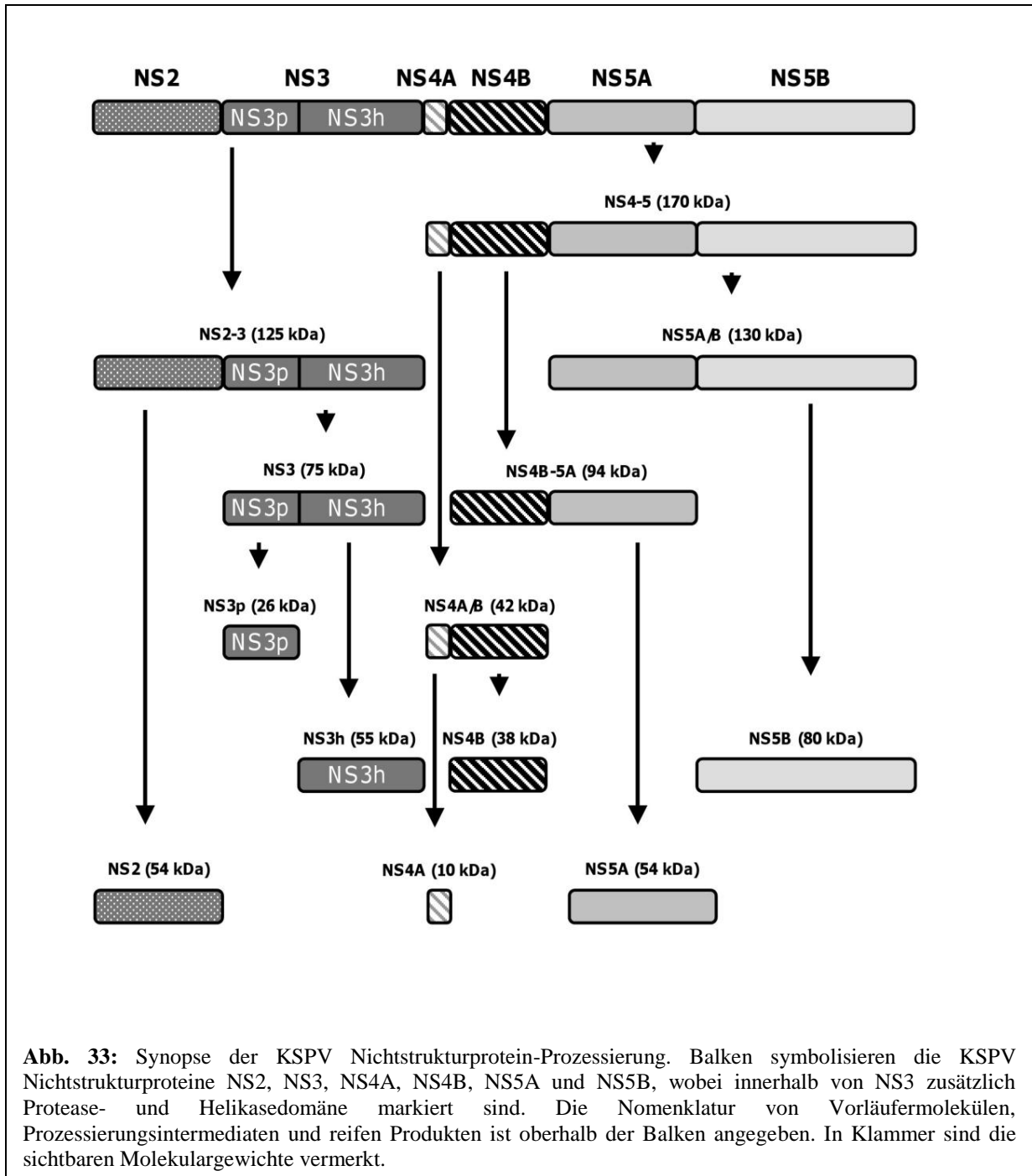
6. Diskussion

Das untersuchte zp KSPV Replikon entstand aus nzp KSPV durch Deletion der Strukturproteine (Core, E^{ms}, E1, E2), von p7 und NS2 (Abb. 25). Durch diese Deletion kodiert das Replikon ein N^{pro}-NS3 Fusionsprotein, das durch autokatalytische Abspaltung des N^{pro} große Mengen an reifem NS3 generiert. Dieses subgenomische Replikon zeigt eine sehr effiziente Replikation und eine gesteigerte Expression der Nichtstrukturproteine. Wegen der schwächeren Proteinexpression des nzp KSPV im Vergleich zum zp KSPV Replikon mussten für die Western Blot Analysen größere Mengen der Zelllysate aufgetrennt werden, um die Nichtstrukturproteine des nzp KSPV darzustellen. Beide Antikörper gegen NS4B erbrachten dennoch keine spezifischen Signale in nzp KSPV infizierten Zellen. Wie im zp KSPV Replikon erschienen die reifen Nichtstrukturproteine NS3, NS4A, NS5A und NS5B in nzp KSPV infizierten Zellen, jedoch mit deutlich reduzierter Signalintensität (Abb. 27). Zusätzlich konnte ein sehr schwaches Signal des reifen NS2 nachgewiesen werden, das mit dem berechneten Molekulargewicht übereinstimmt (aMW: 54 kDa; bMW: 52 kDa). Von den im zp KSPV Replikon detektierten Spaltprodukten des NS3 ließ sich nur das Helikase-Fragment (aMW: 55 kDa) in Immunoblot-Analysen von nzp KSPV infizierten Zellen darstellen. Neben den reifen Nichtstrukturproteinen erschienen aber NS2-3 (aMW: 125 kDa) und auch die Vorläufermoleküle NS4-5 (aMW: 170 kDa), NS5A/B (aMW: 130 kDa) und NS4A/B (aMW: 43 kDa) in Immunoblots mit nzp KSPV infizierten Zellen.

6.3 Kinetik der Nichtstrukturprotein-Prozessierung in KSPV infizierten Zellen

Immunoblot-Analysen eigneten sich gut zur Identifizierung der Nichtstrukturproteine und ihrer Vorläufermoleküle, weil sie die Gesamtheit der in den Zellen vorhandenen viralen Proteine abbildeten. Die in einem definierten Zeitraum translatierten Proteine und die während dieses Zeitraumes vollzogenen Prozessierungsereignisse können nach radioaktiver Markierung durch Autoradiographie dargestellt werden. Um die Beziehungen der einzelnen reifen Proteine und ihrer Vorläufermoleküle zu verdeutlichen, waren daher zusätzliche Präzipitationsexperimente mit metabolisch markierten Proteinen erforderlich.

In den Autoradiographien des zp KSPV Replikons erkennt man die reifen Nichtstrukturproteine NS3 (aMW: 75 kDa), NS5A (aMW: 54 kDa) und NS5B (aMW: 80 kDa) sowie die Vorläufermoleküle N^{pro}-NS3 (aMW: 95 kDa), NS4-5 (aMW: 170 kDa), NS5A/B (aMW: 130 kDa) und NS4B-5A (aMW: 94 kDa) in vergleichbarer Signalintensität (Abb. 28).



Als Referenz für ein infektiöses zp Pestivirus wurde das im reversen genetischen System erzeugte zp KSPV-JIV (Gallei et al., 2008) ausgewählt, da es ebenfalls von dem hier verwendeten nzp KSPV-Stamm abgeleitet wurde (Abb. 25). Wie beim zp KSPV Replikon dokumentierten auch die Autoradiographien des zp KSPV-JIV die reifen Nichtstrukturproteine (NS3, NS5A und NS5B) zusammen mit Vorläufermolekülen (NS2-3, NS4-5, NS5A/B und NS4B-5A). Reifes NS2 (aMW: 54 kDa) wurde im zp KSPV-JIV nicht nachgewiesen, doch ein kleineres NS2-Fragment (aMW: 43 kDa) wurde sichtbar, so dass eine interne Prozessierung innerhalb von NS2 vermutet wird (Abb. 30). Im nzp

6. Diskussion

KSPV (Wildtyp) ergaben die Radioimmunpräzipitationen ein völlig anderes Bild. Es zeigten sich dominante Signale des ungespaltenen NS2-3 und der Vorläufermoleküle NS4-5, NS5A/B sowie NS4B-5A. Reifes NS3 und NS5B waren nur undeutlich zu erkennen. Die Nichtstrukturproteine NS2, NS4B und NS5A konnten auch nach längerer Exposition des Röntgenfilms nicht detektiert werden (Abb. 29).

Diese Analysen ermöglichen die Erstellung eines hierarchischen Modells der Proteinprozessierung des KSPV. Durch eine kotranslationale autokatalytische Spaltung des Polyproteins zwischen NS3 und NS4A entstehen NS2-3 und NS4-5 Vorläufermoleküle. Nur ein geringer Prozentsatz der NS2-3 Moleküle wird durch die NS2 Protease und den zellulären Kofaktor JIV im nzp KSPV zu reifem NS2 und NS3 umgesetzt. Eine interne Prozessierung generiert freie Protease- und Helikase-Fragmente aus reifen NS3-Molekülen. Die NS3 Protease spaltet das NS4-5 Vorläufermolekül zuerst zwischen NS4B und NS5A, so dass NS4A/B und NS5A/B Prozessierungsintermediate entstehen.

Das NS4A/B Prozessierungsintermediat wird dann umgehend von der NS3 Protease zu reifem NS4A und NS4B umgesetzt. Die Generierung von reifem NS5A und NS5B aus dem NS5A/B Prozessierungsintermediat erfolgt dagegen nur langsam. Die Existenz von NS4B-NS5A Prozessierungsintermediaten belegt, dass auch andere Abfolgen der Prozessierung möglich sind. Eine unterschiedliche Aktivität der NS3 Protease an den verschiedenen Spaltstellen kann als Ursache für das beschriebene Prozessierungsmuster vermutet werden. In Abbildung 33 werden die Beziehungen der Vorläufermoleküle, Prozessierungsintermediate und reifen Produkte zusammenfassend dargestellt.

Nach metabolischer Markierung wurde der Umsatz der Vorläufermoleküle und reifen Proteine in „pulse chase“ Experimenten analysiert. Die Berechnung der Halbwertszeiten diente der Erstellung eines kinetischen Modells der Prozessierung in den unterschiedlichen Biotypen. Im zp KSPV Replikon und im zp KSPV-JIV erkennt man einen schnellen Umsatz der Vorläufermoleküle und Prozessierungsintermediate. Ein bedeutender Anteil der NS2-3 Moleküle wird im zp KSPV-JIV bereits kotranslational gespalten und die posttranslationale Halbwertszeit von NS2-3 beträgt nur 2,5 h. Die NS4-5 Vorläufermoleküle haben im zp KSPV-JIV eine Halbwertszeit der 0,8 h und im zp KSPV Replikon eine Halbwertszeit von 1 h. Auch die NS5A/B

6. Diskussion

Prozessierungsintermediate werden im zp Biotyp des KSPV schnell zu den reifen Proteinen umgesetzt ($T_{1/2}$: 0,5 h bzw. 0,8 h). Im Gegensatz dazu ergeben sich für die Vorläufermoleküle der Nichtstrukturproteine wesentlich längere Halbwertszeiten in nzp KSPV infizierten Zellen. So haben die NS2-3 Moleküle eine um das Doppelte verlängerte Halbwertszeit ($T_{1/2}$: 5,5 h). Das NS4-5 Vorläufermolekül und das NS5A/B Prozessierungsintermediat sind sogar dreimal stabiler im nzp KSPV ($T_{1/2}$: 3 h bzw. 2,5 h). Die gleichförmig verlängerten Halbwertszeiten der beiden Substratmoleküle (NS4-5 und NS5A/B) im nzp KSPV sind direkt mit der langsameren Spaltung von NS2-3 korreliert. Die Halbwertszeiten der reifen Nichtstrukturproteine NS3 ($T_{1/2}$: 4 h), NS4A ($T_{1/2}$: 1,5 h), NS5A ($T_{1/2}$: 2 h) und NS5B ($T_{1/2}$: 2 h) konnten wegen des schnellen Umsatzes der Vorläufermoleküle nur im zp Biotyp des KSPV gemessen werden. Die reifen Nichtstrukturproteine sind im nzp KSPV nur schwer zu detektieren, so dass keine Messung der Protein-Halbwertszeiten möglich war. Es ist aber anzunehmen, dass die reifen Proteine im nzp Biotyp des KSPV eine vergleichbare Stabilität besitzen. Die Halbwertszeiten von Vorläufermolekülen und reifen Produkten in den unterschiedlichen Biotypen werden in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6:

	Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) Der Vorläufermoleküle:			Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) der reifen Nichtstrukturproteine:			
	NS2-3	NS4-5	NS5A/B	NS3	NS4A	NS5A	NS5B
Nzp KSPV (Wildtyp)	5,5 h	3 h	2,5 h				
Zp KSPV Replikon	/	0,8 h	0,5 h	4 h	2 h	1,5 h	2 h
ZP KSPV-JIV	2,5 h	1 h	0,8 h				

Das Vorläufermolekül NS4A/B, die reifen Nichtstrukturproteine NS2 und NS4B sowie die Spaltprodukte des NS3 konnten nur schwer nachgewiesen werden. Weil gleiche Mengen aller Proteine durch die Prozessierung des Polyproteins gebildet werden, ist es

6. Diskussion

wahrscheinlich, dass diese Moleküle instabil sind und/oder sehr ineffizient generiert werden. NS4B und das N-terminale Spaltprodukt von NS3 waren nur im zp Biotyp des KSPV zu detektieren, so dass eine Beteiligung dieser Proteine an der Auslösung der zytopathogenen Effekte des möglich erscheint.

6.4 Vergleich der Nichtstrukturprotein-Prozessierung zwischen KSPV und BVDV

Eine umfassende Identifikation der pestiviralen Nichtstrukturproteine erfolgte bislang ausschließlich in zp BVDV infizierten Zellen. In Radioimmunpräzipitationen wurden NS2, NS3 und NS2-3 als p54, p80 und p125 dargestellt. Reifes NS4A und zwei Vorläufermoleküle, die NS4A Sequenzen beinhalten, wurden als p10, p42 und p175 beschrieben (Collett et al., 1991). NS4B wurde als p30 in den zp BVDV Stämmen Pe515cp und Cp7 nachgewiesen (Meyers et al., 1992; Tautz et al., 2000). Im zp BVDV Stamm NADL wurde NS4B, dem berechneten Molekulargewicht entsprechend, als p38 detektiert (Van Olphen et al., 1997). Neben dem reifen NS5A, das als p58 beschrieben wurde, erschienen die NS5A Vorläufermoleküle p96, p133, p165 und p175 (Collett et al., 1991; Akkina et al., 1991). Mit einem Serum gegen NS5B fand man das reife p75 (NS5B) und drei Vorläufermoleküle, die mit den NS5A Vorläufermolekülen übereinstimmten (p133, p165 und p175; Collett et al., 1991).

Dieses Prozessierungsmuster diene als Referenz für die Genomorganisation aller Pestiviruspezies, weil die Spaltstellen der NS3 Protease (L/S, L/A und L/N) konserviert sind (Tautz et al., 1997). Die homologen Vorläufermoleküle und reifen Produkte des KSPV konnten, abgesehen von p165 (NS4B-NS5A/B), durch eigene Versuche dargestellt werden.

Bei dem zp BVDV Stamm NADL wurden die Kinetik der Nichtstrukturprotein-Prozessierung in „pulse chase“ Experimenten untersucht. Es zeigte sich, dass p175 (NS4-5) schnell zu den Produkten p10 (NS4A), p42 (NS4A/B), p133 (NS5A/B) und p165 (NS4B-5A/B) umgesetzt wird ($T_{1/2}$: < 1 h). Das Prozessierungsintermediat p42 (NS4A/B) war äußerst kurzlebig und erschien nur direkt nach der Markierung. Die Prozessierungsintermediate p133 (NS5A/B) und p165 (NS4B-5A/B) wurden ebenfalls schnell gespalten ($T_{1/2}$: < 1 h) und ergaben die reifen Produkte p58 (NS5A) und p75 (NS5B). Während sich p58 (NS5A) als sehr stabil erwies ($T_{1/2}$: > 6 h), war p75 (NS5B) innerhalb von 2 h fast vollständig abgebaut. Reifes NS4B wurde nicht vorgefunden (Collett et al., 1991). Die kinetischen Analysen der Prozessierung bei zp BVDV decken

6. Diskussion

sich im Wesentlichen mit den im zp Biotyp des KSPV beobachteten Prozessen. Die Halbwertszeiten der reifen Nichtstrukturproteine zeigen aber große Abweichungen. So kann eine besonders kurze Halbwertszeit der viralen RNS-Polymerase (p75; NS5B) für KSPV nicht bestätigt werden. Im nzp Biotyp des BVDV wurde bislang ausschließlich die Kinetiken der NS2-3 Spaltung analysiert und mit den Vorgängen im zp Biotyp verglichen. Während sich bei zp BVDV eine gleichbleibend effiziente NS2-3 Spaltung vollzog, war die NS2-3 Spaltung im nzp BVDV auf die ersten Stunden nach der Infektion beschränkt (Lackner et al., 2004). Ferner wurde beschrieben, dass die Abhängigkeit der NS2-Autoprotease von einem zellulären Kofaktor (JIV) bestimmend ist für die zeitliche Regulation der NS2-3 Prozessierung (Lackner et al., 2006). Nach diesem Modell bleibt der essentielle Kofaktor JIV auch nach der autokatalytischen Spaltung an NS2 gebunden und steht deshalb für keine weiteren Reaktionen mehr zur Verfügung. Nzp und zp Biotyp des KSPV unterscheiden sich zwar erheblich in der NS2-3 Spaltungseffizienz, aber es erfolgt auch im nzp Biotyp eine kontinuierliche NS2-3 Prozessierung.

6.5 Vergleich der Nichtstrukturprotein-Prozessierung zwischen KSPV und HCV

Die Genomorganisation von HCV, KSPV und den anderen Pestivirus-Spezies weist große Ähnlichkeit in der Nichtstrukturprotein-Region auf. Bei HCV werden die Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5B wie bei Pestiviren von der NS2 Autoprotease und der NS3 Serinprotease aus einem gleichartig aufgebauten Polyprotein freigesetzt. Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Aktivität der NS2-Protease. Die NS2-3 Spaltung ist bei HCV sehr effizient, so dass ungespaltene NS2-3 Vorläufermoleküle bei HCV nicht in Erscheinung treten (Schregel et al., 2009). Die NS3 vermittelten Spaltungen an den Positionen NS3-NS4A und NS5A-NS5B erfolgen bei HCV sehr schnell, während die Prozessierung an den Spaltstellen NS4A-NS4B und NS4B-NS5A verlangsamt ist. Aus diesem Grund werden nach Expression der HCV Nichtstrukturproteine stabile NS4A/B-NS5A Prozessierungsintermediate beobachtet (Bartenschlager et al., 1994 [A und B]). Vor einigen Jahren wurde ein HCV Zellkultursystem etabliert (Wakita et al., 2005), das Replikation und Partikelbildung eines HCV Isolates zulässt. Untersuchungen zur Nichtstrukturprotein-Expression dieses HCV Isolates im Zellkultursystem wurden aber bislang nicht publiziert. Kinetische Untersuchungen zur Nichtstrukturprotein-Prozessierung bei einem HCV Replikon ergaben eine bemerkenswert hohe Stabilität der reifen Nichtstrukturproteine ($T_{1/2}$: 10 bis 16 h; Pietschmann et al., 2001).

6.6 Modell der Replikation nicht-zytopathogener KSPV

Die Aktivität der NS3 Protease ist essentiell für die Replikationsfähigkeit von Pestiviren und die ungespaltenen NS4-5 Vorläufermoleküle sind vermutlich enzymatisch inaktiv (Xu et al., 1997). Die Effizienz der NS2-3 Spaltung bestimmt maßgeblich den Biotyp eines Pestivirus. Obwohl bekannt ist, dass die Beschleunigung der NS2-3 Spaltung eine Steigerung der Replikation bewirkt (Lackner et al., 2004), konnte die molekulare Funktion der Spaltung bislang nicht aufgeklärt werden. *In vitro* Experimente belegen, dass ein freier N-Terminus nicht essentiell ist für die Aktivität der NS3 Serinprotease. Reifes BVDV NS3 und ein N-terminal mit Glutathion-S-Transferase fusioniertes BVDV NS3 Molekül spalten ein Substratmolekül nach rekombinanter Expression mit vergleichbarer enzymatischer Aktivität. Daher wurde davon ausgegangen, dass die NS3 Serinprotease in den Molekülen NS2-3 und NS3 eine vergleichbare Aktivität besitzt (Tautz et al., 2000).

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden dagegen deutliche Unterschiede in der Prozessierungsgeschwindigkeit der Substratmoleküle der NS3 Serinprotease zwischen nzp und zp Biotyp des KSPV beobachtet. Abgesehen von der effizienten *cis*-Spaltung zwischen NS2-3 und NS4A könnte NS2-3 im nzp Biotyp ein weniger aktives „Proenzym“ darstellen, das erst durch Spaltung in die aktive Form des reifen NS3 überführt wird. Spezifische intramolekulare Interaktionen zwischen NS2 und NS3 oder sterische Effekte könnten inhibitorisch auf die Serinproteaseaktivität im NS2-3 Molekül wirken. Die Membranassoziation von NS2 beschränkt außerdem den Wirkungsbereich der Protease, die dann als reifes NS3 Molekül frei im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegt.

Die Bedeutung der hier erstmals beschriebenen internen Prozessierung zwischen Protease- und Helikasedomäne des NS3 ist bislang unklar. Das 55 kDa Fragment der NS3 Helikase wurde bereits früher bei Untersuchungen zur Prozessierung von NS2-3 in nzp BVDV beobachtet, ohne dass es besondere Erwähnung fand und als Artefakt gedeutet wurde (Lackner et al., 2004). Die interne Prozessierung des reifen NS3 Moleküls könnte aber eine zusätzliche Ebene der Regulation der Enzymaktivität bilden. Interne Spaltungen innerhalb der Helikasedomäne von NS3, d. h. an einer anderen Position als hier beschrieben, wurden in verschiedenen Flaviviren (Arias et al., 1992; Teo et al., 1997) und in HCV (Kou et al., 2007; Shoji et al., 1999) aufgedeckt. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Spaltungen innerhalb der Helikasedomäne das betreffende Enzym inaktivieren.

6. Diskussion

Wahrscheinlich beschränkt eine langsame Prozessierung der NS4-5 Vorläufermoleküle die Replikationsrate von nzp KSPV auf ein niedriges Niveau. Im Gegensatz dazu führt die schnellere Prozessierung in zp KSPV zu einer Akkumulation der reifen Nichtstrukturproteine und einer deregulierten Replikation, die den Untergang der Wirtszelle bewirkt. Ein Vergleich der Halbwertszeiten der reifen Nichtstrukturproteine mit dem Umsatz ihrer Vorläufermoleküle im nzp Biotyp von KSPV macht die regulative Funktion der Prozessierung deutlich. Weil die reifen Nichtstrukturproteine in nzp KSPV langsamer nachgeliefert als abgebaut werden, reichern sie sich nicht in den infizierten Zellen an. Im zp Biotyp des KSPV werden die reifen Nichtstrukturproteine dagegen schneller aus den Vorläufermolekülen generiert als abgebaut (Tabelle 6). Es ist davon auszugehen, dass der enzymatisch aktive Replikationskomplex nur aus den reifen, bzw. aus einzelnen der reifen Nichtstrukturproteine besteht. Im Replikationskomplex wird virale RNS vermehrt, die als genomische positiv Strang RNS wiederum eine Matrize für die Translation von Nichtstrukturproteinen bildet, entsteht ein sich selbst verstärkendes System. Durch die Regulation der NS2-3 Spaltung wird demzufolge die enzymatische Aktivität aller an der Replikation beteiligter Nichtstrukturproteine gesteuert und ein Gleichgewichtszustand zwischen RNS-Synthese und Abbau erreicht.

Wie in nzp BVDV steigt auch in nzp KSPV die Proteinexpression bis 24 h p. i. an und fällt danach wieder ab. In nzp KSPV entsteht aber im Verlauf der Infektion fortwährend eine geringe Menge an reifem NS3. Der Einfluss von JIV auf die NS2-3 Spaltung und Replikation von KSPV ist belegt durch die Änderung des Biotyps im KSPV-JIV (Gallei et al., 2008), so dass eine gleichartige JIV-abhängige Regulation der NS2-3 Spaltung angenommen werden muss. In Analogie zu BVDV kann geschlossen werden, dass JIV nach der NS2-3 Spaltung an NS2 gebunden vorliegt. Eigene Daten belegen einen Abbau des reifen NS2 nach vollzogener Spaltung, wobei gebundene JIV-Moleküle wahrscheinlich ebenfalls degradiert werden. Unterschiede in der Regulation der NS2-3 Spaltung zwischen BVDV und KSPV könnten aus einer unterschiedlichen Affinität der entsprechenden NS2-Moleküle zum zellulären JIV resultieren.

Die Effizienz NS2-3 Spaltung wurde innerhalb der BVDVs und BDVs als Marker des Biotyps genutzt (Donis et al., 1987; Becher et al., 1996). Die hier vorgestellten Untersuchungen weisen erstmals darauf hin, dass sich die verminderte Freisetzung von NS3 in nzp Pestiviren negativ auf die Reifung der Nichtstrukturproteine NS4A, NS4B,

6. Diskussion

NS5A und NS5B auswirkt. Die Regulation der Replikation erfolgt daher wahrscheinlich mittels NS2-3 Spaltung durch eine Steuerung der NS3 Proteaseaktivität. Gleichzeitig wird aber ungespaltenes NS2-3 für die Bildung infektiöser Partikel benötigt (Agapov et al., 2004). Die Fähigkeit eines BVD-Virus persistente Infektionen zu etablieren, hängt demnach vermutlich nicht nur von der Steuerung der NS2-3 Spaltung, sondern auch von der Aktivität der NS3 Protease und der damit verbundenen Regulation der Replikation ab. Dementsprechend könnte die Effizienz der NS2-3 Spaltung in Verbindung mit der Aktivität der NS3 Protease auch als Modell zur Erklärung der unterschiedlichen Virulenz innerhalb der KSP-Viren herangezogen werden.

7. Zusammenfassung

Die Biosynthese der Nichtstrukturproteine des Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) wurde hinsichtlich der Hierarchie und Dynamik der proteolytischen Reifung charakterisiert. Dabei wurden ein wildtypisches nicht-zytopathogenes Feldvirus sowie zwei zytopathogene Konstrukte untersucht, um einen Bezug zu beschriebenen Daten vom nahe verwandten BVDV zu ermöglichen. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

1. Ein GST-NS2-3 Fusionsprotein, ein C-terminales Fragment der NS3-Helikase, ein C-terminales Fragment von NS4B und das vollständige NS5A des KSPV wurden in *E. coli* exprimiert und mittels Ni^{2+} -Ionen Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Immunisierung von Versuchstieren erfolgte die Herstellung und Charakterisierung monoklonale Antikörper (mAbs) gegen diese Proteine.
2. Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen zeigten eine enge Assoziation aller KSPV Nichtstrukturproteine mit den Membranen des endoplasmatischen Retikulums. In Immunoblotanalysen eines zp KSPV Replikons und des nzp KSPV konnten die Vorläufermoleküle NS4-5 und NS2-3, die Prozessierungsintermediate NS5A/B, NS4B-5A und NS4A/B zusammen mit den reifen Nichtstrukturproteinen identifiziert werden. Außerdem zeigte sich eine zusätzliche interne Prozessierung des reifen NS3 zwischen der Protease- und Helikasedomäne des Moleküls.
3. In nzp KSPV, zp KSPV-JIV und dem zp KSPV Replikon wurde die Prozessierung der Nichtstrukturproteine mittel Immunpräzipitation und „pulse chase“ Analysen dargestellt. Während der zp Biotyp des KSPV eine effiziente Generierung aller Nichtstrukturproteine zeigt, erfolgt die Reifung dieser Proteine im nzp Biotyp nur sehr langsam. Zum Vergleich der Biotypen wurden die Halbwertszeiten der Vorläufermoleküle und reifen Produkte bestimmt. In diesen Analysen erwiesen sich die reifen Proteine des KSPV als stabil ($T_{1/2}$: 1,5-4 h). Im zp Biotyp werden die Vorläufermoleküle schneller umgesetzt ($T_{1/2}$: 0,5-2,5 h) als die reifen Nichtstrukturproteine abgebaut werden, so dass die reifen Proteine in den Zellen akkumulieren. Dagegen erzeugt die langsame Reifung der Vorläufermoleküle im nzp Biotyp ($T_{1/2}$: 2,5-5,5 h) eine konstante Menge an reifen Nichtstrukturproteinen in den infizierten Zellen. Diese Daten deuten erstmals darauf hin, dass die gesteigerte Expression von NS3 im zp Biotyp eines Pestivirus die Prozessierung der anderen Nichtstrukturproteine beschleunigt. Umgekehrt beschränkt die verminderte NS2-3 Spaltung in nzp Pestiviren die Aktivität der NS3 Protease und reguliert so die Konzentration der reifen Nichtstrukturproteine.

8. Summary

The biosynthesis of Classical swine fever virus (CSFV) nonstructural proteins was characterized with regard to hierarchy and dynamics of proteolytic maturation. A wildtypic non-cytopathogenic isolate and two cytopathogenic CSFV constructs were analysed to allow the comparison with data about the closely related BVDV. The following results were achieved:

- 1 A GST-NS2-3 fusion protein, a C-terminal fragment of the NS3 helicase, a C-terminal fragment of NS4B, and the entire NS5A of CSFV were expressed in *E. coli* and purified by Ni²⁺ ion affinity chromatography. Following the immunization of laboratory animals, monoclonal antibodies (mAbs) against these proteins were produced and characterized.
- 2 Indirect immunofluorescence experiments showed a tight association of all CSFV nonstructural proteins with membranes of the endoplasmic reticulum. Immunoblot analyses of a cp CSFV replicon and ncp CSFV led to the identification of NS4-5 and NS2-3 precursors, NS5A/B and NS4A/B processing intermediates, and of all mature nonstructural proteins. In addition, a novel internal processing of NS3 was detected separating the protease and helicase domains of this molecule.
- 3 The nonstructural protein processing of ncp CSFV, cp CSFV-JIV, and a cp CSFV replicon was characterized by immunoprecipitation together with pulse chase analyses. The nonstructural protein maturation of the ncp biotype of CSFV occurs very slowly, while an efficient generation of all nonstructural proteins takes place in the cp biotype. Half-lives of precursors and mature proteins were determined to directly compare the different biotypes. These analyses showed that the mature nonstructural proteins of CSFV are stable ($T_{1/2}$: 1,5-4 h). The maturation of precursor molecules was faster ($T_{1/2}$: 0,5-2,5 h) than the turnover of mature products in the cp biotype. In contrast, a constant amount of mature proteins results from a slow maturation of precursor molecules in the ncp biotype ($T_{1/2}$: 2,5-5,5 h). These data indicate that enhanced expression of NS3 in cp pestiviruses is responsible for an accelerated processing of the other nonstructural proteins. In contrast, inefficient NS2-3 cleavage in ncp pestiviruses restricts NS3 protease activity and thereby regulates the concentration of all mature nonstructural proteins.

9. Literaturverzeichnis

Agapov, E. V., C. L. Murray, I. Frolov, L. Qu, T. M. Myers und C. M. Rice (2004). Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 78, 2414-2425

Akkina, R. K. (1991). Pestivirus bovine viral diarrhoea virus polypeptides: identification of new precursor proteins and alternative cleavage pathways. *Virus Res.* 19, 67-81

Anonym (2001). Richtlinie 2001/89/EG des Rates vom 23. Oktober 2001 über Maßnahmen der Gemeinschaft zur Bekämpfung der klassischen Schweinepest. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft.* EU, L316/5-L316/35

Anonym (2003). Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest (Schweinepest-Verordnung), Bekanntmachung der Neufassung vom 24. Juli 2003, *BGBI. I*, 37, 1496-1511

Anonym (2010). Verordnung zum Schutz der Rinder gegen eine Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV-Verordnung), Bekanntmachung der Neufassung vom 04. Oktober 2010, *BGBI. I*, 49, 1320-1325

Anonym (2010). Amtliche Methodensammlung für anzeigepflichtige Tierseuchen. Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Neufassung vom März 2009, 175-193

Aoki, H., K. Ishikawa, Y. Sakoda, H. Sekiguchi, M. Kodama, S. Suzuki und A. Fukusho (2001). Characterization of classical swine fever virus associated with defective interfering particles containing a cytopathogenic subgenomic RNA isolated from wild boar. *J. Vet. Sci.* 63, 751-758

Arias, C. F., F. Preugschat und J. H. Strauss (1992). Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* 193, 888-899

9. Literaturverzeichnis

Asai, D. J. und J. K. Wilder (1993). Making monoclonal antibodies. In: D. J. Asai (Hrsg). Antibodies in cell biology, Methods in cell biology 37, Acad. Press, San Diego, USA, 57-75

Avalos-Ramirez, R., M. Orlich, H.-J. Thiel und P. Becher (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456-465

Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous und H. Jacobsen (1994 [A]). Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* 68, 5045-5055

Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, K. Yasargil, J. Mous und H. Jacobsen (1994 [B]). Substrate determinants for cleavage in cis and in trans by hepatitis C virus NS3 proteinase. *J. Virol.* 69, 198-205

Bauhofer, O., A. Summerfield, Y. Sakoda, J. D. Tratschin, M. A. Hoffmann und N. Ruggli (2007). Classical swine fever virus N^{pro} interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J. Virol.* 81, 3087-3096

Bazan, J. F. und R. J. Fletterick (1989). Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171, 637-639

Becher, P., G. Meyers, A. D. Shannon und H.-J. Thiel (1996). Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.* 70, 2992-2998

Becher, P., M. Orlich und H.-J. Thiel (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.* 72, 5165-5173

Becher, P., M. Orlich, A. Kosmidou, M. König, M. Baroth und H.-J. Thiel (1999). Genetic diversity of pestiviruses: Identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262, 64-71

Beer, M., I. Reimann, B. Hoffmann und K. Depner (2007). Novel marker vaccines

9. Literaturverzeichnis

against classical swine fever. *Vaccine* 25, 5665-5670

Behrens, S. E., C. W. Grassmann, H.-J. Thiel, G. Meyers und N. Tautz (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* 72, 2364-2372

Bielefeldt-Ohmann, H., L. Ronsholt und B. Bloch (1987). Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J. Gen. Virol.* 68, 1971-1982

Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523

Bolin, S. R., A. W. McClurkin, R. C. Cutlip und M. F. Coria (1985). Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46, 573-576

Brownlie, J., M. C. Clarke und C. J. Howard (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 114, 535-536

Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159

Choi, K. H., J. M. Groarke, D. C. Young, R. J. Kuhn, J. L. Smith, D. C. Pevear und M. G. Rossmann (2004). The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhoea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4425-4430

Collen, T. und W. I. Morrison (2000). CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res.* 67, 67-80

Collett, M. S., R. Larson, S. K. Belzer und E. Retzel (1988). Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of pestivirus. *Virology* 165, 200-208

9. Literaturverzeichnis

Collett, M.S., M. Wiskerchen, E. Welniak und S. K. Belzer (1991). Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 19-27

Corapi, W. V., R. O. Donis und E. J. Dubovi (1990). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenetic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1388-1394

Donis, R. O. und E. J. Dubovi (1987). Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology* 158, 168-173

Elbers, K., N. Tautz, P. Becher, T. Rumenapf und H.-J. Thiel (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* 70, 4131-4135

Engvall, E. und P. Perlmann (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874

Fletcher, S. P. und R. J. Jackson (2002). Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function. *J. Virol.* 76, 5024–5033

Frey, C. F., O. Bauhofer, N. Ruggli, A. Summerfield, M. A. Hoffmann, J. D. Tratschin (2006). Classical swine fever virus replicon particles lacking the E^{rns} gene: a potential marker vaccine for intradermal application. *Vet. Res.* 37, 655-670

Gallei A., S. Blome, S. Gilgenbach, N. Tautz, V. Moennig und P. Becher (2008). Cytopathogenicity of classical Swine Fever virus correlates with attenuation in the natural host. *J. Virol.* 82, 9717-9729

Gillespie, J. H., J. A. Baker und K. McEntee (1960). A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 50, 73-79

Grassmann, C. W., O. Isken und S. E. Behrens (1999). Assignment of the

9. Literaturverzeichnis

multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J. Virol.* 73, 9196-9205

Grassmann, C. W., O. Isken, N. Tautz und S. E. Behrens (2001). Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J. Virol.* 75, 7791-7802

Greiser-Wilke, I., K. E. Dittmar, B. Lies und V. Moennig (1992). Heterogenous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 73, 47-52

Gu, B., C. Liu, J. Lin-Goerke, D. R. Maley, L. L. Gutshall, C. A. Feltenberger und A. M. Del Vecchio (2000). The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J. Virol.* 74, 1794-1800

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580

Harada, T., N. Tautz und H.-J. Thiel (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* 74, 9498-9506

Hay, A. J., A. J. Wolstenholme, J. J. Skehel und M. H. Smith (1985). The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *Embo J.* 4, 3021-3024

Hoff, H. S., und R. O. Donis (1997). Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. *Virus Res.* 49, 101-113

Hügler, T., F. Fehrmann, E. Bieck, M. Kohara, H. G. Kräusslich, C. M. Rice, H. E. Blum und D. Moradour (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284, 70-81

Issur, M., B. J. Geiss, I. Bougie, F. Picard-Jean, S. Despins, J. Mayette, S. E.

9. Literaturverzeichnis

Hobdey, M. Bisailon (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. RNA 15, 2340-2350

Jones, D. M., A. H. Patel, P. Targett-Adams und J. McLauchlan (2009). The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNS replication and modulates production of infectious virus. J. Virol., 83, 2163-2177

Iqbal, M., E. Poole, S. Goodbourn, J. W. McCauley (2004). Role for bovine viral diarrhea virus E^{ns} glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. J. Virol. 78, 136-145

Kasza, L., J. Shadduck und G. Christofinis (1972). Establishment, viral susceptibility, and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. Res. Vet. Sci. 13, 46-51

Kirkland, P. D., M. J. Frost, D. S. Finlaison, K. R. King, J. F. Ridpath, X. Gu (2007). Identification of a novel virus in pigs – Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. Virus Res. 129, 26-34

König, M., T. Lengsfeld, T. Pauly, R. Stark und H.-J. Thiel (1995). Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. J. Virol. 69, 6479-6486

Köhler, G. und C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497

Köhler, G., S. C. Howe und C. Milstein (1976). Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Eur. J. Immunol. 6, 292-295

Kosmidou, A., M. Büttner und G. Meyers (1998). Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV). Arch. Virol. 143, 1295-1309

Kou, Y., M. Chang, Y. Wang, T. Hung und S. Chang (2007). Differential

9. Literaturverzeichnis

requirements of NS4A for internal NS3 cleavage and polyprotein processing of hepatitis C virus. *J. Virol.* 81, 7999-8008

Kräusslich, H. G. und E. Wimmer (1988). Viral proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 701-754

Krey, T., A. Himmelreich, M. Heimann, C. Menge, H.-J. Thiel, K. Maurer und T. Rümenapf (2006). Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. *J. Virol.* 80, 3912-3922

Kümmerer, B. M., D. Stoll und G. Meyers (1998). Bovine viral diarrhea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J. Virol.* 72, 4127-4138

Kümmerer, B. M., N. Tautz, P. Becher, H.-J. Thiel und G. Meyers (2000). The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 77, 117-128

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

Lackner, T., H.-J. Thiel, N. Tautz (2006). Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1510-1515

Lazar, C., N. Zitzmann, R. A. Dwek, N. Branza-Nichita (2003). The pestivirus E^{ms} glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology* 314, 696-705

Lecot, S., S. Belouzard, J. Dubuisson und Y. Rouillé (2005). Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 79, 10826-10829

Liang, D., I. F. Sainz, I. H. Ansari, L. H. Gil, V. Vassilev und R. O. Donis (2003). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant

9. Literaturverzeichnis

pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 84, 1269-1274

Lindenbach B. D., H.-J. Thiel, C. M. Rice (2007). *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: D. M. Knipe und P. M. Howley (Hrsg.). *Fields Virology*. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott-Raven, Williams & Wilkins, USA, 1101-1152

Lukavsky, P. J. (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* 139, 166-171

Lundin, M., H. Lindstrom, C. Gronwall und M. A. Persson (2006). Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J. Gen. Virol.* 87, 3263-3272

Maurer, K., T. Krey, V. Moennig, H.-J. Thiel und T. Rümenapf (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 78, 1792-1799

Mendez, E., N. Ruggli, M. S. Collett und C. M. Rice (1998). Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNS from stable cDNS clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.*, 72 (6), 4737-4745

Meyer, C., M. von Freyburg, K. Elbers und G. Meyers (2002). Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea virus from infectious cDNA clones. *J. Virol.* 76, 8494-8503

Meyers, G., T. Rümenapf und H.-J. Thiel (1989 [A]). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171, 555-567

Meyers, G., T. Rümenapf und H.-J. Thiel (1989 [B]). Ubiquitin in a togavirus. *Nature* 341, 491

Meyers, G., N. Tautz, R. Stark, J. Brownlie, E. Dubovi, M. Collett und H.-J. Thiel (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191, 368-386

9. Literaturverzeichnis

Meyers, G. und H.-J. Thiel (1995). Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J. Virol.* 69, 3683-3689

Meyers, G. und H.-J. Thiel (1996 [A]). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 47, 53-118

Meyers, G., H.-J. Thiel und T. Rügenapf (1996 [B]). Classical swine fever virus: recovery of infectious virus from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. *J. Virol.* 70, 1588-1595.

Meyers G., N. Tautz, P. Becher, H.-J. Thiel und B. M. Kümmerer (1996 [C]). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus from cDNA constructs. *J. Virol.* 70, 8606-8613

Meyers, G., A. Saalmüller und M. Büttner (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

Moennig, V. und P. G. W. Plagemann (1992). The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 41, 53-98

Moennig, V., G. Flögel-Niesmann, I. Greiser-Wilke (2003). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet. J.* 165, 11-20

Moser, C., P. Stettler, J. D. Tratschin und M. A. Hofmann (1999). Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J. Virol.* 73, 7787-7794

Moulin, H. R., T. Seuberlich, O. Bauhofer, L. C. Bennett, J. D. Tratschin, M. A. Hofmann und N. Ruggli (2007). Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology* 365, 376-389

Müller, A., G. Rinck, H.-J. Thiel und N. Tautz (2003). Cell-derived sequences in

9. Literaturverzeichnis

the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J. Virol.* 77, 10663-9

Petric, M., R. H. Yolken, E. J. Dubovi, M. Wiskerchen und M. S. Collett (1992). Baculovirus expression of pestivirus non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* 73, 1867-1871

Pietschmann, T., V. Lohmann, G. Rutter, K. Kurpanek und R. Bartenschlager (2001). Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J. Virol.* 75, 1252-1264

Pinto, L. H., L. J. Holsinger und R. A. Lamb (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528

Pocock, D. H., C. J. Howard, M. C. Clarke und J. Brownlie (1987). Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine viral diarrhea virus. *Arch. Virol.* 94, 43-53

Potgieter, L. N. D., M. D. McCracken, F. M. Hopkins und J. S. Guy (1985). Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46, 151-153

Qu, L., L. K. McMullan und C. M. Rice (2001). Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 75, 10651-10662

Rebhuhn, W. C., T. W. French, J. A. Perdrizet, E. J. Dubovi, S. G. Dill und L. F. Karcher (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine viral diarrhea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 3, 42-46

Reed, K. E., A. E. Gorbalenya und C. M. Rice (1998). The NS5A/NS5 protein of viruses from three genera of the family *Flaviviridae* are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* 72, 6199-6206

Renart, J., J. Reiser und G. R. Stark (1979). Transfer of proteins from gels to

9. Literaturverzeichnis

diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 3116-3120

Ridpath, J. F. und S. R. Bolin (1995). Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotyp 1 and genotype 2 BVDV. *Virology* 212, 259-262

Riedel, C., B. Lamp, M. Heimann und T. Rümenapf (2010). Characterization of essential domains and plasticity of the classical swine fever virus core protein. *J. Virol.* 84, 11523-11531

Roman-Sosa, G. (2007). Charakterisierung des Core-Proteins von Pestiviren. *Diss. med. vet., Universität Gießen, VVB Laufersweiler Gießen*, 97-100

Roman-Sosa, J. (2008). Identifizierung der für die Bindung an den zellulären, bovinen Rezeptor CD46 verantwortlichen Sequenzbereiche innerhalb des Glykoproteins E2 von BVDV (NADL). *Diss. med. vet., Universität Gießen, VVB Laufersweiler Gießen*

Rümenapf, T., R. Stark, G. Meyers und H.-J. Thiel (1991). Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J. Virol.* 65, 589-597

Rümenapf, T., G. Unge, J. H. Strauss und H.-J. Thiel (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* 67, 328-3294

Rümenapf, T. und H.-J. Thiel (2008). Molecular biology of pestiviruses. In: T. C. Mettenleiter und F. Sobrino (Hrsg.). *Animal Viruses: Molecular biology*. Caister Academic Press, UK, 39-96

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-

9. Literaturverzeichnis

terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467

Schägger, H. und G. von Jagow (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379

Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer und H.-J. Thiel (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261, 1169-1171

Schregel, V., S. Jacobi, F. Penin und N. Tautz (2009). Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *PNAS* 106, 5342-5347

Shimomura, O., F. H. Johnson und Y. Saiga (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequora*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223-239

Shoji, I., T. Suzuki, M. Sato, H. Aizaki, T. Chiba, Y. Matsuura und T. Miyamura (1999). Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein. *Virology* 254, 315-323

Stapleton, J. T., S. Fong, A. S. Muerhoff, J. Bukh und P. Simmonds (2011). The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 92, 233-246

Stark, R., G. Meyers, T. Rümenapf und H.-J. Thiel (1993). Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* 67, 7088-7095

Taggart, R. T. und I. M. Samloff (1983). Stable antibody-producing murine hybridomas. *Science* 219, 1228-1230

Tamura, J. K., P. Warrener und M. S. Collett (1993). RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 193, 1-10

9. Literaturverzeichnis

Tautz, N., H.-J. Thiel, E. J. Dubovi und G. Meyers (1994). Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.*, 68 (5), 3289-3297

Tautz, N., K. Elbers, D. Stoll, G. Meyers und H.-J. Thiel (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* 71, 5415-5422

Tautz, N., T. Harada, A. Kaiser, G. Rinck, S. Behrens und H.-J. Thiel (1999). Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J. Virol.* 73, 9422-9432

Tautz, N., A. Kaiser und H.-J. Thiel (2000). NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273, 351-363

Tellinghuisen, T. L., M. S. Paulson und C. M. Rice (2006). The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus contains an essential zinc-binding site similar to that of the hepatitis C virus NS5A protein. *J. Virol.* 80, 7450-7458

Teo, K. F. und P. Wright (1997). Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *J. General Virol.* 78, 337-341

Tews, B. A. und G. Meyers (2007). The pestivirus glycoprotein E^{tns} is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* 282, 32730-32741

Thiel, H.-J., R. Stark, E. Weiland, T. Rumenapf und G. Meyers (1991). Hog cholera virus: Molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* 65, 4705-4712

Thiel, H.-J., M. S. Collett, E. A. Gould, F. X. Heinz, M. Moughton, G. Meyers, R. H. Purcell und C. M. Rice (2005). Family *Flaviviridae*. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger und L. A. Ball (Hrsg.). *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Acad. Press, San Diego, USA, 979-996

Thyrell, L., S. Erickson, B. Zhivotovsky, K. Pokrovskaja, o. Sangfelt, J. Castro, S.

9. Literaturverzeichnis

Einhorn und D. Grandér (2002). Mechanisms of interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21, 1251-1262

Tratschin, J. D., C. Moser, N. Ruggli und M. A. Hoffmann (1998). Classical swine fever virus leader proteinase N^{Pro} is not required for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 72, 7681-7684

Van Olphen, A. L. und R. O. Donis (1997). Identification of bovine viral diarrhea virus nonstructural polypeptide NS4B/P38. *Virus Res.* 51, 197-201

Vassilev, V. B. und R. O. Donis (2000). Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res.* 69, 95-107

Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.-G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager und T. Liang (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791-796

Warrener, P. und M. S. Collett (1995). Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.* 69, 1720-1726

Weiland, E., R. Stark, B. Haas, T. Rüménapf, G. Meyers, und H.-J. Thiel (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* 64, 3563-3569

Weiskircher, E., J. Aligo, G. Ning, K. V. Konan (2009). Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol. J.* 6, 185

Wiskerchen, M. und M. S. Collett (1991). Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 184, 341-350

9. Literaturverzeichnis

Xu, J., E. Mendez, P. R. Caron, C. Lin, M. A. Murcko, M. S. Collett und C. M. Rice (1997). Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* 71, 5312-5322

Yamane, D., K. Kato, Y. Tohya und H. Akashi (2006). The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *J. Gen. Virol.* 87, 2961-2970

Zahoor, M.A., D. Yamane, Y. M. Mohamed, K. Kobayashi, K. Kato, Y. Tohya und H. Akashi (2009). Characterization and application of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 5A. *Arch. Virol.* 154, 1745-1754

Zhong, W., L. L. Gutshall und A. M. Del Vecchio (1998). Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 72, 9365-9369

Danksagung

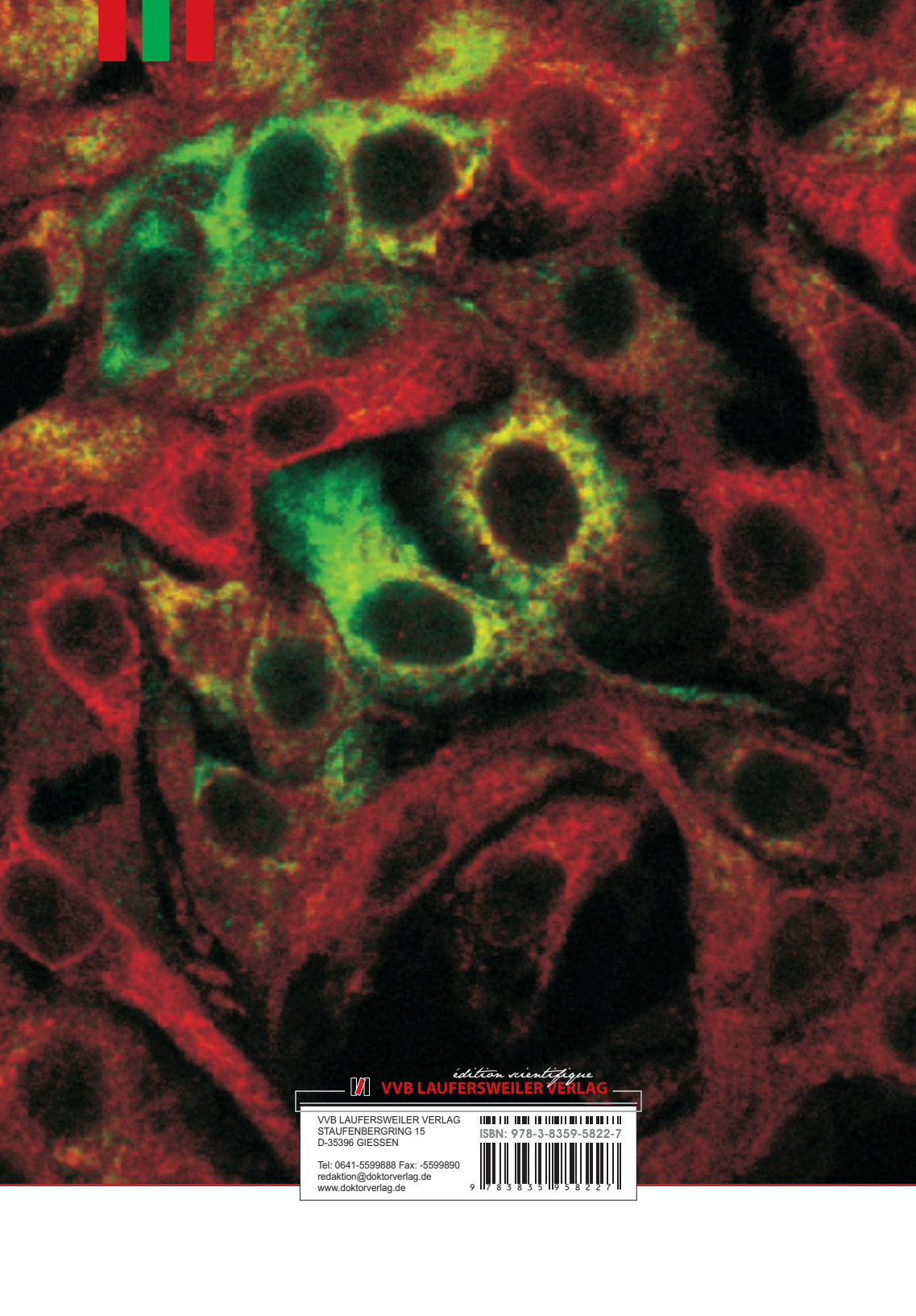
Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Tillmann Rümenapf für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit. Durch praktische Hilfe im Labor und bei der Anfertigung dieser Schrift trug er maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel möchte ich für die gute Zusammenarbeit und stete Unterstützung danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Virologie Manuela Heimann und Sylvaine Jacobi gebührt mein Dank für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Weiterhin dürfen meine Kollegen Dr. Gleyder Roman-Sosa und Dr. Christiane Riedel nicht unerwähnt bleiben, die mir bei Problemen immer hilfsbereit zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Tanja Lamp und meinen Eltern Rosa und Johannes Lamp herzlich für ihre Unterstützung bedanken.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5822-7



9 783835 958227