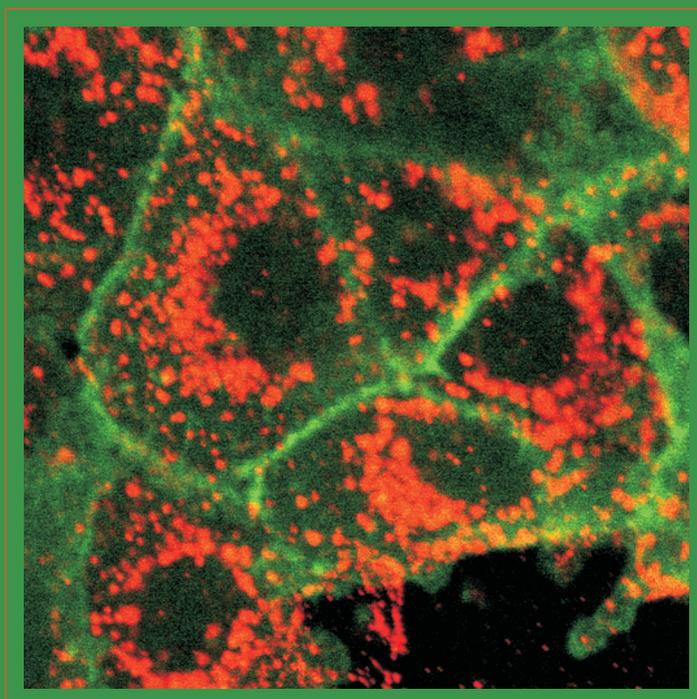


# Charakterisierung des Invasions- mechanismus des Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV)

---



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

THOMAS KREY

---

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
*édition scientifique*

ISBN 3-89687-667-8

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

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

1. Auflage 2004

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

1<sup>st</sup> Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wetttenberg  
Printed in Germany

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE  
[www.vvb-ips.de](http://www.vvb-ips.de)

**Charakterisierung des Invasionsmechanismus  
des Virus der bovinen viralen Diarrhöe  
(BVDV)**

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

Thomas Krey

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

Betreuer: Prof. Dr. Till Rümenapf

**Charakterisierung des Invasionsmechanismus des Virus  
der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV)**

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

Eingereicht von Thomas Krey  
Tierarzt aus Bergisch-Gladbach

Gießen 2004

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

Gutachter:

Prof. Dr. T. Rümenapf

PD Dr. G. Schultheiß

Tag der Disputation: 24. März 2004

# **Danksagung:**

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

## **Herzlich bedanken möchte ich mich bei:**

- Prof. Dr. Till Rügenapf für das interessante Dissertationsthema, stete Diskussionsbereitschaft, Unterstützung, Rat und eine sehr nette Arbeitsatmosphäre.
- Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für seine Unterstützung und die Gelegenheit, an seinem Institut diese Arbeit anfertigen zu können.
- Dr. Anke Himmelreich, Manuela Heimann, Gleyder Roman-Sosa, Dr. Yvonne Hausmann und Karin Müller für stete Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima im Labor.
- den anderen Mitarbeitern des Instituts für Virologie, insbesondere Dr. Norbert Tautz und Dr. Matthias König, für ein offenes Ohr, viele Anregungen und ihre Hilfsbereitschaft.
- meiner Familie für ihre ständige und rückhaltlose Unterstützung
- und Biene.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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 in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.)</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
1.1.)	BVDV	1
1.2.)	Invasion von BVDV	5
1.3.)	Penetration von Viren	8
1.4.)	Fusion der viralen Membran mit zellulären Membranen	10
1.5.)	Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1.1	eukaryotische Zelllinien	14
2.1.2	prokaryotische Zellen	14
2.1.3	Virusstämme	14
2.1.4	Antikörper	14
2.1.5	Enzyme	15
2.1.6	Chemikalien	15
2.1.7	radioaktiv markierte Substanz	16
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.9	Geräte (Aufzählung nicht explizit im Kapitel 2.2 erwähnter Geräte)	16
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>17</b>
2.2.1	Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten	17
2.2.1.1	Medien und Puffer	17
2.2.1.2	Allgemeine Zellkulturarbeiten	19
2.2.1.3	Transfektion von Plasmid DNA	19
2.2.1.4	Elektroporation linearisierter DNA oder RNA in CRIB- und MDBK-Zellen	19
2.2.1.5	Etablierung induzierbarer Tet on Zelllinien	20
2.2.1.6	Indirekter immunhistochemischer Nachweis	21
2.2.1.7	Infektionsversuche	22
2.2.1.7.1	Plaque-Test zur Bestimmung der Empfänglichkeit	22
2.2.1.7.2	Titration zur Bestimmung des Virustiters und der Empfänglichkeit	22
2.2.1.7.3	Inhibition der BVDV Infektion durch Hemmstoffe der endosomalen Ansäuerung	23
2.2.1.7.4	Inhibition der BVDV Infektion durch Hemmstoffe der Endozytose	23
2.2.1.7.5	Inhibition der BVDV Infektion in hyperosmolarem Medium	24
2.2.1.7.6	Inhibition der BVDV Infektion durch intrazelluläre K <sup>+</sup> -Depletion	24

2.2.1.7.7	Invasionskinetik von BVDV und Sindbis-Virus	25
2.2.1.7.8	Polyethylenglykol-vermittelte Infektion von CRIB-Zellen	26
2.2.1.8	Bestimmung der pH-Stabilität von BVDV und Sindbis-Virus	26
2.2.1.9	„fusion from without“	27
2.2.1.10	Zelloberflächen-ELISA zur Quantifizierung der Oberflächenexpression des bovinen CD46	27
2.2.1.11	LDL-Internalisierungstest	28
2.2.2	Bindungsassay mit BVDV NADL	28
2.2.2.1	Bindungsassay mit [ <sup>3</sup> H]-markiertem BVDV NADL	28
2.2.2.1.1	Radioaktive Markierung von BVDV NADL mit [ <sup>3</sup> H]-Uridin	28
2.2.2.1.2	Bindungsassay	29
2.2.2.1.3	Statistische Auswertung der Bindungsdaten	30
2.2.2.2	Internalisierungsassay mit BVDV NADL mittels Real-Time-PCR	30
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.3.1	Zellyse	31
2.2.3.2	SDS-PAGE	31
2.2.3.3	Immunoblot-Analyse von Proteinen (Western Blot)	32
2.2.3.4	Isolierung von Membranfraktionen	33
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.4.1	Anzucht von Bakterien	34
2.2.4.2	Plasmidisolierung	34
2.2.4.3	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	35
2.2.4.4	Isolierung von Gesamt-RNA mittels RNeasy	36
2.2.4.5	Isolierung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen	37
2.2.4.6	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	37
2.2.4.7	Ethanolpräzipitation von DNA/RNA und Isopropanolpräzipitation von DNA	37
2.2.4.8	Quantifizierung von DNA-/RNA-Proben	38
2.2.4.9	DNA- bzw. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.4.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	39
2.2.4.11	Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.2.4.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.4.13	RT-PCR	41
2.2.4.14	TaqMan-PCR zur quantitativen Erfassung von BVDV RNA	42
2.2.4.15	Klonierung von PCR-Produkten	44
2.2.4.16	Ortsgerichtete Mutagenese mittels „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“	44
2.2.4.17	<i>in vitro</i> Transkription	45
2.2.4.18	Sequenzierung von DNA durch „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer	46
2.2.4.19	Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	47
2.2.5	Klonierungen	48
2.2.5.1	Synthetische Oligonukleotide	48
2.2.5.2	Klonierung der Dynamin-Konstrukte	49

2.2.5.3	Klonierung des bovinen CD46 aus CRIB- und MDBK-Zellen	50
<b>3.)</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>3.1.)</b>	<b>Charakterisierung des Invasionsweges von BVDV</b>	<b>51</b>
3.1.1.)	Bedeutung der Endozytose für den Invasionsweg von BVDV	51
3.1.1.1.)	Abhängigkeit der BVDV Infektion von der GTPase Dynamin-1	51
3.1.1.2.)	Hemmung der Endozytose durch chemische und biophysikalische Methoden	54
3.1.2.)	Säureabhängigkeit der BVDV Infektion	57
3.1.3.)	Invasionskinetik der BVDV und Sindbis-Virus Infektion auf MDBK-Zellen	59
3.1.4.)	Metastabilität von BVDV	61
3.1.4.1.)	„fusion from without“ von BVDV und Sindbis-Virus auf MDBK-Zellen	63
3.1.4.2.)	„fusion from without“ von BVDV in Anwesenheit reduzierender Substanzen	64
<b>3.2.)</b>	<b>Charakterisierung der CRIB-Zellen</b>	<b>67</b>
3.2.1.)	Bestätigung des Phänotyps der CRIB-Zellen	67
3.2.2.)	Bedeutung des bovinen CD46 für die Resistenz der CRIB-Zellen	69
3.2.2.1.)	Nachweis von bovinem CD46 in CRIB-Zellen	69
3.2.2.2.)	Nachweis der Bindung von [ <sup>3</sup> H]-BVDV an CRIB-Zellen	71
3.2.2.3.)	Quantifizierung des oberflächenständigen bovinen CD46 in CRIB-Zellen	73
3.2.2.4.)	Funktionelle Charakterisierung des bovinen CD46 <sub>CRIB</sub>	74
3.2.3.)	Bedeutung des LDL-Rezeptors für die Resistenz der CRIB-Zellen	81
3.2.3.1.)	Präsenz des LDL-Rezeptors auf CRIB-Zellen	82
3.2.3.2.)	Funktionelle Charakterisierung des LDL-Rezeptors <sub>CRIB</sub>	84
3.2.4.)	Internalisierung in CRIB-Zellen	85
3.2.4.1.)	Internalisierung von [ <sup>3</sup> H]-BVDV NADL	85
3.2.4.2.)	Internalisierung in Anwesenheit von β-Methyl-Cyclodextrin	87
3.2.4.3.)	Internalisierung in CRIB-Zellen mittels PEG	90
<b>4.)</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>92</b>
4.1.)	Charakterisierung des Invasionsweges von BVDV	92
4.2.)	Charakterisierung der CRIB-Zellen	101
<b>5.)</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
<b>6.)</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>108</b>
<b>7.)</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>109</b>

## Abkürzungsverzeichnis

aa	„amino acids“, Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AEC	Aminoethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
β-MCD	β-Methyl-Cyclodextrin
Baf A1	Bafilomycin A1
bCD46	bovines CD46
BDV	Border Disease Virus
BHV-1	Bovines Herpesvirus 1
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhöe
°C	Grad Celsius
CCP	„complement control protein“
CCV	„clathrin coated vesicle“, Clathrin-bedecktes Vesikel
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	„Calf intestine alkaline phosphatase“, Alkalische Phosphatase
cpE	zytopathischer Effekt
cpm	„counts per minute“
CRIB	„cells resistant to infection with BVDV“
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
defiz.	defizient
DiI	Octadecyl(C <sub>18</sub> ) indocarbocyanine
Dox	Doxyzyklin
Dulbecco's MEM	„Dulbecco's modified Eagle's medium“
DNA	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
Dyn	Dynamamin-1
E.coli	Escherichia coli
ECV	„endosomal carrier vesicle“, endosomales Transportvesikel
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FITC	„fluorescein isothiocyanate“
FKS	fetales Kälberserum
g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

H <sup>+</sup> -ATPase	ATP-abhängige Protonenpumpe
HA	Hämagglutinin
hCD46	humanes CD46
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPRI	„human plazenta ribonuclease inhibitor“, RNase-Inhibitor
I.E.	infektiöse Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IRES	„internal ribosomal entry site“, interne Ribosomenbindungsstelle
I.U.	„international units“
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KSPV	Virus der klassischen Schweinepest
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDL-R	LDL-Rezeptor
mCi	Millicurie
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MC	Methylcellulose
MCP	„membrane cofactor protein“, CD46
MD	„mucosal disease“
MDBK	„Madin Darby bovine kidney“
MEM	modifiziertes Eagle Medium
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOI	„multiplicity of infection“, Multiplizität der Infektion
mRNA	messenger RNA
NGS	N-Glykosilierungsstelle
Nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	nicht translatierte Region
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei „x“ nm
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PfU	„plaque forming units“, Plaque bildende Einheiten
p.i.	post infectionem
p.t.	post transfectionem
QC	„Quik Change“
RCA	„regulators of complement activation“, Regulatoren der Komplementaktivierung
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	„rotation per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rtTA	„reverse tetracycline-controlled transactivator“
s	Sekunde

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SinV	Sindbis-Virus
SFV	Semliki forest Virus
STP-Region	Serin-Threonin-Prolin-reiche Region
SuHV	Suid Herpesvirus 1, Pseudorabiesvirus
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBEV	Tick borne encephalitis Virus
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
T4 PNK	T4 Polynukleotidkinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
W	Watt
wt	Wildtyp

## 1.) Einleitung

### 1.1.) BVDV

Das Genus Pestivirus gehört zur Familie *Flaviviridae* und umfaßt das Virus der bovinen Virusdiarrhöe (BVDV), den Erreger der klassischen Schweinepest (KSPV) und der „Border Disease“ (BDV) sowie ein Isolat von der Giraffe (Giraffe-1; (Avalos-Ramirez et al., 2001; Heinz et al., 2000; Wengler et al., 1995). Zusätzlich wurden zwei weitere Pestivirusisolate („Reindeer-1“ und „Bison“) als neue Spezies vorgeschlagen (Becher et al., 1999). Neben den Pestiviren gehören auch die Genera Flavivirus und Hepacivirus zur Familie der *Flaviviridae*. Alle drei Genera besitzen eine ähnliche Genomorganisation.

Pestiviren sind behüllte RNA-Viren mit einer Größe von ca. 40-60nm (Enzmann et al., 1978; Horzinek et al., 1971; Moennig et al., 1992). Eine Doppellipidmembran umschließt das vermutlich ikosaedrische Nukleokapsid, welches die virale Nukleinsäure enthält (Horzinek et al., 1967). Diese Lipidhülle, in die die viralen Glykoproteine eingelagert sind, ist die Ursache für die Empfindlichkeit von Pestiviren gegen Substanzen wie Chloroform, Äther und Detergentien.

Das pestivirale Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA, die eine Länge von etwa 12,3kb aufweist. Ausnahmen bilden einige BVDV-Isolate, bei denen Genome mit einer Größe bis zu 16,5kb beschrieben werden, die auf Duplikationen oder Insertionen zellulärer Sequenzen zurückzuführen sind (Meyers et al., 1996). Die RNA liegt, wie bei allen Vertretern der *Flaviviridae*, in positiver („messenger sense“) Orientierung vor und enthält einen einzelnen großen Leserahmen. Dieser offene Leserahmen kodiert ein Polyprotein von ca. 4000 Aminosäuren und wird am 5'- und 3'-Ende von einer nicht translatierten Region (NTR) eingerahmt. Die NTR am 5'-Ende weist eine komplexe Sekundärstruktur auf und hat die Funktion einer internen Ribosomenbindungsstelle (IRES), die die Initiation der Translation

vermittelt (Poole et al., 1995; Rijnbrand et al., 1997). Ein solches IRES-Element initiiert auch bei Hepatitis C Virus die Translation (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Somit unterscheiden sich Pestiviren und Hepaciviren bezüglich der Translationsinitiation fundamental von den Flaviviren, deren Translation durch eine „Cap“-Struktur am 5'-Terminus vermittelt wird (Poole et al., 1995; Tsukiyama-Kohara et al., 1992).

Durch ko- und posttranslationale Prozessierung des pestiviralen Polyproteins entstehen 11-12 reife Virusproteine. Unmittelbar am N-Terminus des Polyproteins liegt das Nichtstrukturprotein N<sup>pro</sup>, das sich autokatalytisch vom Polyprotein abspaltet (Rümenapf et al., 1998; Stark et al., 1993). C-terminal von N<sup>pro</sup> schließen sich die viralen Strukturproteine an. Sie umfassen in dieser Reihenfolge das Kapsidprotein (C) und die Glykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2. Die sich anschließenden C-terminalen zwei Drittel des offenen Leserahmens kodieren ausschließlich für Nichtstrukturproteine, welche die strukturellen und enzymatischen Komponenten des viralen Replikationskomplexes enthalten.

An der Prozessierung des Polyproteins sind sowohl virale als auch zelluläre Proteasen beteiligt (Collett et al., 1988a; Collett et al., 1988b; Collett et al., 1991; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Die Translokation der Glykoproteine in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) wird durch eine sich an das Kapsidprotein anschließende interne Signalsequenz bewirkt (Rümenapf et al., 1993). Die im ER sofort nach der Translokation stattfindende Spaltung zwischen C und dem Vorläuferprotein, das aus E<sup>ms</sup>, E1 und E2 besteht, wird durch eine zelluläre Signalpeptidase bewirkt. Auch an den C-Termini von E1 und E2 wird durch die Signalpeptidase gespalten (Rümenapf et al., 1993). Alle drei Glykoproteine bilden Dimere, die über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden sind; dabei kommen E<sup>ms</sup>-Homodimere, E1-E2-Heterodimere und E2-Homodimere vor (Thiel, H. J. et al., 1991; Weiland et al., 1990). Ein dem E<sup>ms</sup> entsprechendes Genprodukt existiert bei den anderen Genera der Flaviviren nicht (Rice, 1996).

Die Bildung neutralisierender Antikörper im Verlauf einer Infektion mit Pestiviren erfolgt vorwiegend gegen E2 und in geringerem Umfang auch gegen E<sup>ms</sup>, nicht aber gegen E1 (Weiland et al., 1992). Im Tierexperiment wurde durch Gabe von aufgereinigtem E<sup>ms</sup>- bzw. E2-Antigen eine stabile Immunität erzeugt, während dies nach Gabe von E1-Antigen unter gleichen Bedingungen nicht beobachtet werden konnte (König et al., 1995). Außerdem konnte durch Zugabe von in Insektenzellen synthetisiertem, gereinigtem E2- und E<sup>ms</sup>-Glykoprotein von KSPV eine Pestivirusinfektion in Zellkultur inhibiert werden (Hulst et al., 1997). Für E1 wird angenommen, daß es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (Thiel, H. J. et al., 1991; Weiland et al., 1990).

BVDV Stämme werden aufgrund von Sequenzvergleichen und serologischer Kreuzreaktivität in zwei Genotypen unterteilt, nämlich BVDV I und BVDV II (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994). Der Genotyp BVDV I umfaßt die sogenannten „klassischen“ BVDV Stämme. Sie verursachen bei Rindern im Allgemeinen eine milde Diarrhöe und Fertilitätsstörungen. Einige der in den Genotyp BVDV II eingeordneten BVDV Stämme sind dagegen für schwere, durch hohes Fieber und Hämorrhagien gekennzeichnete Krankheitsausbrüche verantwortlich (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994).

Nach ihrem Verhalten bei der Infektion von Zellkulturzellen können BVDV Stämme in zytopathogene (zp) und nicht-zytopathogene (nzp) Stämme eingeteilt werden. Eine diaplazentare Infektion des Fetus mit einem nzp Virus im ersten Drittel der Trächtigkeit führt zur Geburt persistent infizierter, immunotoleranter Kälber, die größere Mengen an Virus ausscheiden. Bei diesen Kälbern kann die sporadisch als Folge der BVDV Infektion auftretende sogenannte „mucosal disease“ (MD) beobachtet werden. In der Regel tritt diese tödlich endende Erkrankung innerhalb der ersten 24 Lebensmonate auf. Aus den an MD erkrankten Tieren kann stets neben dem nzp Virus auch ein zp Virus isoliert werden. Genetische Untersuchungen zeigten, daß das zp Virus dabei häufig aus dem nzp Virus hervorgeht (Meyers et al., 1996).

Die klassische Schweinepest hat als Tierseuche in vielen Ländern mit intensiver Schweinehaltung eine große wirtschaftliche Bedeutung (Edwards et al., 2000; Saatkamp et al., 2000). Infektionen mit der klassischen Schweinepest zeigen ein sehr variables klinisches Bild. Eine akute Erkrankung, die mit hoher Letalität einhergeht, aber auch chronische und subklinische Krankheitsverläufe mit niedriger Letalität werden beobachtet. Als Folge staatlicher Bekämpfungsmaßnahmen hat sich das Krankheitsbild zu einem milderem, häufig unspezifischen Verlauf gewandelt, wobei meist chronische Formen der Erkrankung beobachtet werden (Dunne, 1973; Moennig et al., 1992; Thiel, HJ. et al., 1996). Die Sterblichkeit und die Ausprägung der klinischen Symptome variieren je nach Virulenz des entsprechenden Virusstamms (Thiel, HJ. et al., 1996).

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

Das Wirtsspektrum der Pestiviren umfasst ausschließlich Paarhufer. Auch in Zellkultur sind fast nur Zelllinien aus Paarhufern empfänglich für Pestiviren. Die Bezeichnung der Virusspezies geht jeweils auf die Tierart zurück, aus der sie ursprünglich isoliert wurde und in der die betreffende Krankheit auftritt. Unter natürlichen Bedingungen wurde die KSPV Infektion nur in Schweinen nachgewiesen, dagegen konnte BVDV auch aus Schafen und Ziegen isoliert werden (Becher et al., 1997; Becher et al., 1998). Das Wirtsspektrum von BVDV (und auch von BDV) ist demnach weniger eingeschränkt.

## 1.2.) Invasion von BVDV

Wie alle Viren hat BVDV keinen eigenen Stoffwechsel und ist für die Virusvermehrung auf den Stoffwechsel einer lebenden Zelle angewiesen. Insofern ist die Infektion der Wirtszellen ein erster essentieller Schritt des viralen Vermehrungszyklus. Dieser läßt sich allgemein in sechs Stadien einteilen: 1. Adsorption, 2. Penetration, 3. Freisetzung des viralen Genoms („uncoating“), 4. Replikation und Biosynthese der viralen Proteine, 5. Morphogenese („assembly“) und 6. Freisetzung der neu gebildeten Virionen (Roizman et al., 1996). Dabei stellen die Schritte 1. – 3. den Invasionsprozeß im engeren Sinne dar.

Während der Adsorption kommt es zu spezifischen Interaktionen zwischen viralen und zellulären Strukturen, die die Bindung des Virions an die Oberfläche der Wirtszelle zur Folge haben. Als Virusrezeptor wird das zelluläre Oberflächenmolekül bezeichnet, an das ein bestimmtes Virus bindet (Marsh et al., 1989; White, J. M. et al., 1989). Nach Tardieu et al. wird ein Virusrezeptor sowohl durch die Virusbindung an die Zelloberfläche als auch durch die erfolgreiche Vermittlung der Infektion definiert (Tardieu et al., 1982). Diese wird durch einen physiologisch stattfindenden Mechanismus der Zelle (Oberflächenfusion oder rezeptorvermittelte Endozytose) eingeleitet. Diese zellulären Mechanismen werden von den Viren zur Überwindung der zellulären Barriere Plasmamembran („Penetration“) genutzt. Während behüllte Viren mit der Plasmamembran oder der endosomalen Membran fusionieren können, ist für nicht behüllte Viren bisher nur rezeptorvermittelte Endozytose beschrieben worden (Kielian et al., 1990; Marsh et al., 1989). Wie anschließend die virale Nukleinsäure aus dem viralen Nukleokapsid freigesetzt wird („uncoating“), ist bislang nur für wenige Viren verstanden.

Als zellulärer Rezeptor für BVDV wurde kürzlich das bovine CD46 (bCD46) beschrieben (Maurer, 2002). Nach Expression von bCD46 in heterologen Zellen konnte spezifische Virusbindung beobachtet werden. Zwar wurde auf nicht infizierbaren Zellen keine gesteigerte

Empfänglichkeit vermittelt, in der porzinen Zelllinie PK15 jedoch, die auf einem niedrigen Niveau empfänglich für BVDV ist, wurde die Empfänglichkeit durch Expression des bCD46 um ca. den Faktor 100 gesteigert. Durch Vorinkubation mit mAk's anti-bCD46 wurde diese Steigerung der Empfänglichkeit verhindert.

Das auch als „membrane cofactor protein“ (MCP) bezeichnete humane Glykoprotein CD46 (hCD46) kommt in allen kernhaltigen Zellen vor. Als Angehöriger der Familie der Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) schützt es körpereigene Gewebe durch Bindung der aktivierten Komplementkomponenten C3b und C4b vor der unspezifischen Selbstzerstörung (Liszewski et al., 1992).

Der N-terminale, extrazelluläre Teil des hCD46 enthält vier für RCA-Proteine typische Module („complement control protein“, CCP). Es handelt sich hierbei um 60-70 Aminosäuren lange Domänen (Reid et al., 1986), die jeweils vier hoch konservierte Cysteine und ein konserviertes Tryptophan enthalten (Hourcade et al., 1989). An die CCP-Domänen schließt sich C-terminal eine Region, die überdurchschnittlich viele Serine, Threonine und Proline enthält (STP-Region) und eine 12 Aminosäuren lange Sequenz unbekannter Funktion an. CD46 ist ein Typ 1 Transmembranprotein, dessen Verankerung in der Plasmamembran durch eine hydrophobe Transmembranregion bewirkt wird. Auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich eine kurze C-terminale Domäne. Die durch alternatives Spleissen unterschiedlich großen Isoformen unterscheiden sich durch die variable Transkription verschiedener Exons in der STP Region und durch die Wahl zwischen drei verschiedenen zytoplasmatischen (Cyt1, Cyt2 und Cyt3) Domänen (Post et al., 1991; Purcell et al., 1991; Riley et al., 2002). Die gleichzeitige Expression dieser vier Spleissvarianten in den meisten Zelltypen führt zu einem heterogenen Erscheinungsbild nach elektrophoretischer Auftrennung, wobei drei Isoformen der größeren Bande (59-68kDa) und drei Isoformen der kleineren Bande (50-58kDa) zugeordnet wurden (Post et al., 1991). Der apparente

Größenunterschied beider Banden erklärt sich durch extensive O-Glykosylierung im Bereich der STP Region (Liszewski et al., 1992).

Neben dem bCD46 wurden andere Oberflächenmoleküle beschrieben, die im Invasionsprozeß von BVDV eine Rolle spielen sollen. Für den BVDV Stamm PE515 konnte *in vitro* sowohl eine Interaktion des Glykoproteins E<sup>rms</sup> mit verschiedenen Glukosaminoglykanen (Heparin, Fucoidan, Dermatansulfat) als auch eine Hemmung der Virusinfektion durch Präinkubation der Zellen mit diesen Substanzen festgestellt werden (Iqbal et al., 2000).

Mit Hilfe von anti-idiotypischen Antikörpern gegen einen anti-E2 Antikörper gelang die Identifizierung eines Zelloberflächenproteins von 50kDa, welches als zellulärer Rezeptor für BVDV postuliert wurde (Xue et al., 1993). Hierbei wurde vorausgesetzt, daß das virale Strukturprotein E2 den rezeptorbindenden Liganden darstellt. Durch diese anti-idiotypischen Antikörper konnte allerdings nur die Infektion boviner Zellen mit bestimmten BVDV Stämmen gehemmt werden, während bei anderen Stämmen keinerlei Hemmung festzustellen war.

Der „low density lipoprotein receptor“ (LDL-R) wurde ebenfalls als zellulärer Rezeptor für BVDV postuliert (Agnello et al., 1999). Hierfür sprach die hemmende Wirkung eines mAk gegen LDL-R auf die Infektion von BVDV. Weiterhin wurde mittels Immunhistochemie und funktioneller Charakterisierung die Abwesenheit des LDL-R auf der Oberfläche von sogenannten „cells resistant to BVDV infection“ (CRIB-Zellen) gezeigt.

CRIB-Zellen wurden 1995 als spezifisch resistent gegen die Infektion mit allen Pestiviren beschrieben (Flores et al., 1995; Flores et al., 1996). Sie entstanden aus der für BVDV voll empfänglichen Rinderzelllinie MDBK im Verlauf einer Infektion mit einer hohen Dosis des zytopathogenen BVDV-Stammes „Singer“ und einer nachfolgenden Kultivierung der überlebenden Zellen. Interessanterweise lassen sich CRIB-Zellen durch Behandlung mit Polyethylenglykol (PEG) mit BVDV infizieren, wenngleich die Empfänglichkeit auch mit PEG noch 50fach schlechter ist als in parentalen MDBK-Zellen. PEG wird verwendet, um

Zellen zu fusionieren (z.B. für die Verschmelzung von B-Lymphozyten und Myelomzellen im Verlauf der Herstellung monoklonaler Antikörper). Die Wirkungsweise des PEG bei der Infektion der CRIB-Zellen ist allerdings bislang nicht geklärt.

Verantwortlich für die Resistenz der CRIB-Zellen ist sehr wahrscheinlich die Mutation eines Faktors, der essentiell an der viralen Vermehrung von Pestiviren beteiligt ist. Die Lokalisation des Wirkungsorts dieses Faktors wurde bereits auf den Invasionsprozess eingengt, eine genotypische Charakterisierung des Phänotyps der CRIB-Zellen gelang bisher jedoch nicht.

Die molekulare Charakterisierung der Interaktion von BVDV mit bCD46 resultierte in der Identifizierung des viralen Glykoproteins E2 als Ligand des bCD46 (Himmelreich, 2003). Dies wurde bereits durch die Anwesenheit neutralisierender Antikörper gegen E2 angedeutet. Aus Insektenzellen stammendes, gereinigtes Glykoprotein E2 von KSPV inhibierte die Infektion von porzinen und bovinen Zellen mit den Pestiviren BVDV und KSPV erfolgreich (Hulst et al., 1997). Zusätzlich konnte für je einen BVDV bzw. KSPV Stamm gezeigt werden, daß auch E<sup>rns</sup> durch Bindung an Heparin an der Virusbindung beteiligt ist (Hulst et al., 2001; Iqbal et al., 2000).

### 1.3.) Penetration von Viren

Die Zellmembran stellt für die Zellen unter anderem einen wichtigen Schutz gegen das Eindringen pathogener Mikroorganismen dar. Die Überwindung dieser Barriere ist darum ein wichtiger Schritt des viralen Invasionsprozesses. Zwei unterschiedliche Mechanismen der Penetration sind beschrieben, die Oberflächenfusion und die rezeptorvermittelte Endozytose (Kielian et al., 1990; Marsh et al., 1989). Während unbehüllte Viren aufgrund des Fehlens der Lipidmembran nicht an der Oberfläche fusionieren können und deswegen ausschließlich mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle gelangen, sind für behüllte Viren beide Penetrationsmechanismen möglich. An der Zelloberfläche fusionieren beispielsweise

Herpesviren, Retroviren oder Paramyxoviren. Dagegen infizieren Influenzaviren, Flaviviren oder Alphaviren die Wirtszelle mittels rezeptorvermittelter Endozytose (Young, 2000).

In den letzten Jahren wurde deutlich, daß die Endozytose eine ganze Reihe unterschiedlicher zellbiologischer Prozesse umfaßt. Neben der Clathrin-abhängigen Endozytose wurde auch die Clathrin-unabhängige Endozytose, insbesondere die Endozytose via Caveolae, genauer charakterisiert. Die meisten Viren, die endosomal in die Wirtszelle aufgenommen werden, überwinden die Zellmembran via Clathrin-abhängiger Endozytose (Sieczkarski et al., 2002). Dazu gehören behüllte Viren wie z.B. Sindbis-Virus (DeTulleo et al., 1998), Dengue Virus (Hilgard et al., 2000), bovines Papillomavirus (Day et al., 2003), Vesikuläres Stomatitis Virus (Superti et al., 1987) oder Influenza-Virus (Matlin et al., 1981), aber auch unbehüllte Viren wie verschiedene Picornaviren (Snyers et al., 2003) und das humane Polyomavirus JC-Virus (Pho et al., 2000). Für das Polyomavirus Simian Virus 40 (SV40) und für ein murines Polyomavirus wurde dagegen die Internalisierung durch Caveolae gezeigt (Pelkmans et al., 2001; Richterova et al., 2001).

Während der Clathrin-abhängigen Endozytose kommt es zunächst in der Zellmembran zu einer Bildung der sogenannten „clathrin coated pits“, bestimmter Membranregionen, an die sich das zytosolische Protein Clathrin anlagert. Dieses Protein bewirkt durch einen selbstkatalysierten Multimerisierungsprozeß eine Einstülpung der Zellmembran, die schließlich in eine Käfigstruktur mit eingeschlossenem Vesikel mündet. Dieses Vesikel ist durch eine schmale Membranbrücke noch mit der Zellmembran verbunden. Erst durch die membranständige GTPase Dynamin wird das Vesikel vollständig von der Membran getrennt. Dieser Prozeß ist energieabhängig und erfordert deswegen die Spaltung von GTP in GDP + P<sub>i</sub> durch Dynamin. Das abgeschnürte Vesikel ist immer noch von Clathrinmolekülen bedeckt und wird dementsprechend als „clathrin coated vesicle“ (CCV) bezeichnet. Es fusioniert anschließend mit dem frühen Endosom und dort wird sein Inhalt den verschiedenen zellulären Transportwegen zugeordnet. Die klassische Clathrin-abhängige Endozytose schließt den

Transport vom frühen Endosom zum späten Endosom über „endosomal carrier vesicles“ (ECV) und den Transport vom späten Endosom zum Lysosom mit ein. Obwohl hier vom Transport der Vesikel gesprochen wird, ist bislang nicht ganz eindeutig, ob es sich tatsächlich um einen Vesikeltransport zwischen frühem Endosom, spätem Endosom und Lysosom handelt, oder aber ob es sich um eine Reifung der einzelnen Endosomen handelt. Während dieses Vesikeltransports bzw. dieser Vesikelreifung kommt es durch vesikuläre membranständige  $H^+$ -ATPasen zu einem Protonentransport in die Vesikel und dadurch zu einer Ansäuerung des endosomalen Lumens. Im frühen Endosom herrschen pH-Werte von 6,0-6,8, im späten Endosom 5,4-5,8 und im Lysosom pH-Werte  $<5,0$  (Mellman, 1996).

Caveolae sind Membranmikrodomänen, die durch eine spezifische Lipidzusammensetzung gekennzeichnet sind und nur in bestimmten Zelltypen gefunden werden. Als Markerprotein dieser wie „kleine Höhlen“ geformten Mikrodomänen dient das Caveolin. Die beiden wichtigsten Gegensätze der Caveolae im Vergleich mit CCV's sind 1.) die fehlende luminale Azidifizierung der Caveolae im Verlauf des intrazellulären Transports und 2.) das Ziel der Caveolae. Im Verlauf des Transports verschmelzen Caveolae nicht mit dem frühen Endosom, sondern führen direkt zum Endoplasmatischen Retikulum (Pelkmans et al., 2001). Eine spezifische Funktion dieser Kompartimente ist bislang nicht bekannt.

#### 1.4.) Fusion der viralen Membran mit zellulären Membranen

Bei behüllten Viren mündet die Penetration der Zellmembran stets in einer Fusion der Virushülle mit einer zellulären Membran, so daß das Nukleokapsid in das Zytoplasma gelangen kann. Diese Fusion der Virushülle findet entweder an der Zelloberfläche statt (Oberflächenfusion) oder erfolgt nach Endozytose der adsorbierten Viruspartikel an internen Membranen (z. B. Endosomen) der Wirtszelle.

Die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran wird durch virale Fusionsproteine eingeleitet. Im ersten Schritt muß dieses Fusionsprotein aktiviert werden (erste konformationelle Änderung der viralen Glykoproteine). Diese Aktivierung führt zur Exposition eines kurzen hydrophoben Peptids innerhalb des Fusionsproteins, des „Fusionspeptids“. Dieses wird in die zelluläre Membran inseriert und stellt dadurch eine stabile Verbindung zwischen ihr und der viralen Membran her. Die Aktivierung erfolgt bei Viren, die an der Zelloberfläche fusionieren (z.B. HIV) durch Rezeptor- bzw. Korezeptorbindung (Chan et al., 1998). Bei Viren, die endosomal in die Wirtszelle aufgenommen werden, bewirkt die endosomale Ansäuerung die Aktivierung des Fusionsproteins. Dabei führt jede Unterschreitung eines Schwellenwertes (z.B. pH 6,0) im extrazellulären Raum zu der angesprochenen Aktivierung. Der Zustand vor der Aktivierung, in dem ein spezifischer externer Stimulus eine konformationelle Reaktion der viralen Glykoproteine bewirkt, wird als Metastabilität bezeichnet. Auf dieser Metastabilität bzw. auf der Aktivierung durch den sauren pH-Wert basiert die pH-Abhängigkeit der Invasion behüllter, endosomal aufgenommener Viren. Mit einer zweiten konformationellen Änderung des Fusionsproteins wird anschließend eine Annäherung der viralen und der zellulären Doppellipidmembran bewirkt, die dann in die eigentliche Membranfusion mündet.

Für fast alle behüllten Viren gilt, daß die Aktivierung (unabhängig davon, ob sie durch Rezeptorbindung oder durch endosomale Azidifizierung hervorgerufen wurde) irreversibel ist. Eine Ausnahme hiervon stellen die Rhabdoviren dar (Gaudin, 2000), bei denen die pH-abhängige Aktivierung zwar essentiell für den Invasionsprozeß, aber nicht irreversibel ist. Für die meisten behüllten Viren geht mit dieser Aktivierung gleichzeitig auch die Fähigkeit zur Rezeptorbindung verloren. Aus diesem Grund werden die meisten behüllten Viren, die mittels pH-abhängiger Endozytose in die Wirtszelle gelangen, durch niedrige pH-Werte vollständig inaktiviert. Für Pestiviren wurde dagegen bereits berichtet, daß saure pH-Werte nicht zu einer Inaktivierung führen (Depner et al., 1992). Eine Ausnahme von dieser pH-Sensitivität ist auch

für das Virus der Transmissiblen Gastroenteritis bei Schweinen beschrieben (Hansen, G. H. et al., 1998).

Behüllte Viren treten als freie Virionen in der Regel nur im metastabilen Zustand auf. Um zu verhindern, daß die Virionen schon bei der Ausschleusung aus der infizierten Zelle wieder aktiviert werden (auch in exozytotischen Vesikeln herrscht ein saures Milieu), wird der metastabile Zustand erst zu einem späten Zeitpunkt während der Ausschleusung hergestellt. Meistens geschieht das mittels einer proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins (Influenzaviren, Retroviren) oder eines zweiten akzessorischen Proteins (Alphaviren, Flaviviren). Vor dieser Spaltung kann auch durch Rezeptorbindung oder einen niedrigen pH-Wert kein fusionsaktiver Zustand erreicht werden.

### 1.5.) Zielsetzung der Arbeit

Kürzlich ist es gelungen, mit bCD46 einen zellulären Rezeptor von BVDV zu identifizieren (Maurer, 2002), was jedoch Fragen nach den weiteren Schritten der pestiviralen Invasion aufwarf. Die Tatsache, daß die Expression von bCD46 zwar die Empfänglichkeit porziner Zellen gegenüber BVDV steigerte, humane oder murine Zellen aber trotz Expression von bCD46 resistent gegen BVDV blieben, ließ eine Beteiligung weiterer spezifischer zellulärer Faktoren an der Invasion von BVDV erwarten. Daher sollten die auf die Rezeptorbindung folgenden Schritte der Invasion, insbesondere der Penetrationsmechanismus (Oberflächenfusion oder rezeptorvermittelte Endozytose) von BVDV, charakterisiert werden. Ein für diese Eingrenzung der zellulären Kofaktoren sehr interessantes Untersuchungsobjekt waren die CRIB-Zellen, die als Mutation aus für BVDV voll empfänglichen Zellen hervorgingen. CRIB-Zellen zeigten eine vollständige Resistenz gegen BVDV, wobei die ursächliche Mutation vermutlich den Invasionsprozeß blockierte. Vor dem Hintergrund neuer Erkenntnisse bezüglich des zellulären Rezeptors und des Penetrationsmechanismus sollte darum die für den Phänotyp der CRIB-Zellen verantwortliche Mutation näher charakterisiert werden.

Im Einzelnen handelte es sich um folgende Ziele:

- Charakterisierung des Penetrationsmechanismus von BVDV mit Hilfe biomechanischer, chemischer und biophysikalischer Methoden
- Untersuchung der Metastabilität von BVDV
- Charakterisierung der für den Phänotyp der CRIB-Zellen verantwortlichen Mutation durch molekularbiologische Methoden sowie die Untersuchung der Internalisierung von BVDV in CRIB-Zellen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 eukaryotische Zelllinien

MDBK-Zellen („marbin darby bovine kidney“):	ATCC Nummer: CCL-22
CRIB-Zellen („cells resistant to infection with BVDV“)	(Flores et al., 1995)
SK6-Zellen („swine kidney“-Zelllinie):	Institut für Virologie, Gießen
SK6 Tet on: („swine kidney“-Zelllinie mit Tet-On System)	Institut für Virologie, Gießen
BHK 21-Zellen („baby hamster kidney“-Zelllinie):	ATCC Nummer: CCL-33
HeLa Tet off Dynamin <sup>wt</sup> bzw. Dynamin <sup>K44A</sup>	(Damke et al., 1994)

#### 2.1.2 prokaryotische Zellen

*E.coli* K12-Stamm HB 101

#### 2.1.3 Virusstämme

BVDV NADL (BVDV Typ I):	beschrieben in: (Collett et al., 1988c)
BVDV NCP-7 (BVDV Typ I):	beschrieben in: (Tautz et al., 1996)
BVDV 519 (BVDV Typ I):	beschrieben in: (Becher et al., 1999)
„Giraffe“:	beschrieben in: (Plowright, 1969)
BDV X-818:	beschrieben in: (Becher et al., 1994)
PHV-1 „Begonia“	Intervet, Boxmeer
BHV-1 „M“	W. Eichhorn, München
Sindbis-Virus	G. Wengler, Giessen
VSV „Indiana“	G. Herrler, Hannover

#### 2.1.4 Antikörper

##### Primärantikörper:

mAk D5:	gegen das virale Strukturprotein E2 von BVDV gerichteter monoklonaler Antikörper (Weiland et al., 1990)
mAk BVD/CA 17, 26, 27:	gegen bovines CD46 gerichtete monoklonale Antikörper (Schelp et al., 1995)
mAk Code 4:	gegen das pestivirale Nichtstrukturprotein NS3 gerichteter monoklonaler Antikörper (Corapi et al., 1990)

anti-bCD46-Serum:	gegen bovines CD46 gerichtetes polyklonales Kaninchenserum Institut für Virologie, Gießen
mAk-12CA5:	gegen Influenza-Hämagglutinin (HA)-Tag gerichteter monoklonaler Antikörper (Fa. Boehringer)
anti-Sindbis-Serum:	gegen Sindbis-Virus-Protein gerichtetes polyklonales Kaninchenserum (G. Wengler, Gießen)
mAk-Ab1:	gegen humanen LDL-Rezeptor gerichteter monoklonaler Antikörper (Fa. Calbiochem)

### Sekundärantikörper:

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

### 2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fa. Boehringer Mannheim
<i>Dpn I</i>	Fa. Stratagene
human placenta ribonuclease inhibitor (HPRI)	Fa. Takara
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fa. Stratagene
RNase A	Fa. Alexis
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England BioLabs / Takara
Sp6 RNA-Polymerase	Fa. Takara
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fa. New England BioLabs
T4 DNA-Ligase	Fa. MBI-Fermentas
T4 DNA-Polymerase	Fa. Takara
T4 Polynukleotidkinase	Fa. New England BioLabs
Trypsin	Fa. Sigma

### 2.1.6 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Aceton	Fa. Roth
Acrylamid (reinst, 2x krist.)	Fa. Serva
Agar-Agar	Fa. DIFCO
Agarose	Fa. GIBCO (Invitrogen Corporation)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fa. Aldrich
Ampicillin	Fa. Fluka
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fa. Fluka
Bromphenolblau	Fa. Sigma
BSA	Fa. Serva
Calciumchlorid	Fa. Merck
Chloroform	Fa. Fluka
(Desoxy)ribonukleotide	Fa. Boehringer Mannheim
Doxyzyklin	Fa. ICN

Ethanol	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer Mannheim
G418 Sulfat	Fa. Calbiochem
Harnstoff	Fa. United States Biochemical
Isopropanol	Fa. Fluka
Kristallviolett	Fa. Fluka
Methanol	Fa. Fluka
Methocel <sup>®</sup> MC	Fa. Fluka
Natriumacetat	Fa. Merck
Natriumhydroxid	Fa. Fluka
Octylglucosid	Fa. Calbiochem
Optiprep Density Gradient Medium	Fa. Sigma-Aldrich
Penicillin	Fa. Sigma
Phenol	Fa. Appligene
Puromycindihydrochlorid	Fa. Alexis Biochemicals
Roti-block	Fa. Roth
Rotiszint eco plus	Fa. Roth
Rubidiumchlorid	Fa. Fluka
Schwefelsäure	Fa. Fluka
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. ICN
Streptomycin	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Fluka
Triton X-100	Fa. Fluka
TWEEN 20	Fa. Fluka
Wasser, RNase frei	Fa. Roth

Weitere, hier nicht einzeln aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen GIBCO, Fluka, Serva, Sigma und Roth mit dem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

#### 2.1.7 radioaktiv markierte Substanz

[5,6- <sup>3</sup> H]-Uridin	(37MBq/ml) 1,22 TBq/ mmol	Fa. Amersham-Pharmacia
------------------------------	------------------------------	------------------------

#### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Fa. Braun
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Nitrozellulosemembran	Fa. Pall
Nukleobond AX 100-Säulen	Fa. Macherey & Nagel
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Röntgenfilm Biomax	Fa. Kodak
Ultrafiltrator	Fa. Amicon

#### 2.1.9 Geräte (Aufzählung nicht explizit im Kapitel 2.2 erwähnter Geräte)

Glaswaren	Fa. Schott
-----------	------------

Kühlwasserbad RM6	Fa. LAUDA
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA
Mikroskop Eclipse TS 100	Fa. Nikon
Konfokales Lasermikroskop DM IRBE	Fa. Leika
Pipetten	Fa. Eppendorf; Fa. Gilson
Reinstwasseranlage	Fa. Purolab
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Fa. AGFA
Spannungsgeräte	Fa. Biorad; Fa. Stratagene
Vortex	Fa. IKA
Waagen	Fa. Mettler
Wasserbad	Fa. Braun

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten

#### 2.2.1.1 Medien und Puffer

Dulbecco's MEM:	Dulbecco's MEM Pulvermedium, (GIBCO Invitrogen Corp.)	
	0,0178g/l	L-Alanin
	0,07g/l	Glycin
	0,075g/l	L-Glutaminsäure
	0,025g/l	L-Prolin
	0,1mg/l	Biotin
	0,025g/l	Hypoxantin
	3,7g/l	NaHCO <sub>3</sub>

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

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

PBS defiz.:	0,25g/l	KCl
	1,8g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	0,25g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10g/l	NaCl

PBS:	PBS defiz.	
	0,1g/l	CaCl <sub>2</sub>
	0,1g/l	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O

Kalium-Depletionspuffer:	140 mM	NaCl
	20 mM	Hepes pH 6,8



### 2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Zellen:	MDBK, CRIB, SK6, SK6 Tet on (SK6 (T)), BHK 21
Geräte:	Brutschränke mit CO <sub>2</sub> Begasung (Fa. Forma Scientific; Fa. Memmert)
Sterilbänke:	LaminAir (Fa. Heraeus)
Medien:	Dulbecco's MEM, Trypsinlösung

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

Alle Zellen wurden passagiert, wenn sich konfluente Zellrasen gebildet hatten. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen anschließend mit 4ml Trypsin-Lösung je nach Zelltyp inkubiert. Bevor sich die Zellen von der Platte ablösten, wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen ca. 2min in den Brutschrank gestellt. Hiernach erfolgte die Aufnahme der Zellen in Medium und die Verteilung auf frische Gewebekulturschalen in geeigneten Verdünnungen.

### 2.2.1.3 Transfektion von Plasmid DNA

Zellen:	SK6 (T)
Substanzen:	Metafectene <sup>TM</sup> (Fa. Biontex)
Medien:	Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotika; Dulbecco's MEM

Für das Einbringen von DNA in SK6 (T)-Zellen wurde die kationische Trägersubstanz Metafectene<sup>TM</sup> verwendet. Für die Transfektion wurden 2µg DNA mit 100µl Dulbecco's MEM ohne Antibiotika- und FKS-Zusatz gemischt, parallel wurden 10µl der Trägersubstanz in 100µl Kulturmedium ohne Antibiotika- und FKS-Zusatz gegeben. Beide Ansätze wurden anschließend miteinander vermischt und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300µl Dulbecco's MEM ohne Antibiotika- und FKS-Zusatz wurde, nachdem der Zellkulturüberstand abgesaugt worden war, der Ansatz auf ca.  $1 \times 10^5$  SK6 (T)-Zellen in ein „well“ einer 6-well-Gewebekulturschale gegeben. Nach 4h wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch Dulbecco's MEM ersetzt.

### 2.2.1.4 Elektroporation linearisierter DNA oder RNA in CRIB- und MDBK-Zellen

Zellen:	MDBK, CRIB
Geräte:	BioRad Gene Pulser <sup>®</sup> II Elektroporationsküvette 0,2µm (Molecular BioProducts) Kühlzentrifuge Laborfuge 400R (Fa. Heraeus)
Medien und Puffer:	Trypsin-Lösung, Dulbecco's MEM, PBS defiz.

Die Transfektion von linearisierter DNA und RNA in MDBK- und CRIB-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierbei wird mittels eines kurzen elektrischen Impulses die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert und die RNA kann auf diese Weise in das Zellinnere gelangen. Für die Elektroporation linearisierter DNA in CRIB- und MDBK-Zellen wurden  $10^7$  Zellen abtrypsiniert und in 10ml Dulbecco's MEM aufgenommen. Die Zellen wurden 4min bei 235g abzentrifugiert und dann in 10ml PBS defiz. aufgenommen und resuspendiert. Erneut wurden die Zellen 4min bei 235g abzentrifugiert und dann in 400 $\mu$ l PBS defiz. resuspendiert. 10 $\mu$ g linearisierte DNA in H<sub>2</sub>O wurden mit den Zellen vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit 0,2 $\mu$ m Elektrodenabstand gegeben. Die Elektroporation wurde bei unendlichem Widerstand, 950 $\mu$ F und 0,22kV mit einem Puls durchgeführt. Die Zellen wurden dann auf eine 10cm-Platte mit Dulbecco's MEM ausgesät. Die RNA-Elektroporation erfolgte unter denselben Bedingungen, die Zellen wurden danach jedoch pro Ansatz in 2ml Dulbecco's MEM auf 6-well-Gewebekulturschalen ausgesät und für 24h im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.1.5 Etablierung induzierbarer Tet on Zelllinien

Zellen: CRIB, SK6 (T), MDBK (T)

Grundlage der verwendeten Zelllinien waren SK6 (T)- oder MDBK (T)-Zellen, die stabil mit dem sogenannten pTet on Regulatorplasmid transfiziert bzw. elektroporiert worden waren und dadurch eine G418 Resistenz trugen. CRIB (T)-Zellen wurden im Verlauf der Arbeit hergestellt.

Das pTet on Regulatorplasmid enthält das Gen des Regulatorproteins „reverse tetracycline-controlled transactivator“ (rtTA), das eine durch Zugabe von Tetrazyklin oder Doxyzyklin induzierbare Transkription erlaubt, und kodiert für ein Neomycin (G418)-Resistenz-Gen. Um mit Tet on-Zellen ein bestimmtes Protein exprimieren zu können, muß die jeweilige Nukleotidsequenz in das „Tetrazykline Response Element“-Plasmid (pTRE) kloniert werden.

CRIB (T)-Zellen wurden aufgrund schlechter Transfektionseffizienzen in CRIB-Zellen durch Elektroporation linearisierter DNA (siehe 2.2.1.4.) des pTet on Regulatorplasmids in CRIB-Zellen hergestellt. Linearisiert wurde dazu mit der Restriktionsendonuklease *Acc 65 I*. 24h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und in FKS-haltigem Kulturmedium mit 100 $\mu$ g/ml G418 aufgenommen. Von den Zellen einer transfizierten 6-well-Gewebekulturschale wurden Verdünnungsstufen von 1:2, 1:5, 1:10 und 1:100 in 10cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Nach einer Woche bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für eine weitere Woche kultiviert. Nach ca. 2 Wochen waren resistente Einzelzellklone gewachsen, die mit Hilfe von in Trypsinlösung getränkten Filterpapierstückchen isoliert und auf 24-well-Gewebekulturschalen separat kultiviert werden konnten. Nach 24h wurden die

Filterpapierstückchen entfernt und die Zellklone wurden solange kultiviert, bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte.

Das pTRE-Plasmid mit dem jeweiligen Gen wurde in die SK6 (T)-Zellen über eine stabile Transfektion eingebaut. Hierzu wurde das pTRE-Plasmid durch *Fsp* I linearisiert. Zur Selektion wurde ein sogenanntes „Selektionsplasmid“, das pEF-PAC Plasmid, in einem Verhältnis von 1:20 kotransfiziert (Rinck et al., 2001), da pTRE keine Resistenz kodiert. Hierfür wurde das pEF-PAC Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Hind* III linearisiert. Das pEF-PAC Plasmid kodiert die Puromycin-Acetyltransferase und ermöglicht somit eine Selektion von Zellklonen, die dieses Plasmid enthalten. Selektiert wurde mit 2,5µg/ml Puromycin.

SK6 (T)-Zellen wurden 24h vor Transfektion in 6-well-Gewebekulturschalen ausgesät, so daß sich ein subkonfluenter Zellrasen bildete und mit Metafectene<sup>TM</sup> (Fa. Biontix) mit den linearisierten Plasmiden pTRE (inklusive dem zu exprimierenden Gen) und pEF-PAC kotransfiziert (siehe 2.2.1.3), CRIB (T)- und MDBK (T)-Zellen wurden mit den linearisierten Plasmiden koelektroporiert (siehe 2.2.1.4). 24h nach erfolgter Transfektion/ Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert und in FKS-haltigem Kulturmedium mit 100µg/ml G418 und 2,5µg/ml Puromycin aufgenommen. Nach der oben beschriebenen Prozedur wurden Einzelzellklone isoliert und zu konfluenten Zellrasen kultiviert. Der Nachweis der Expression wurde mittels Immunistochemie (siehe 2.2.1.6) bzw. mittels Western Blot-Analyse (siehe 2.2.3.3) mit und ohne Induktion mit 10mg/ml Doxozyklin für 24h bei 37°C durchgeführt.

#### 2.2.1.6 Indirekter immunhistochemischer Nachweis

Zellen:	MDBK, CRIB, MDBK (T) Dyn <sup>wt</sup> , MDBK (T) Dyn <sup>K44A</sup> , CRIB (T) CD46 <sub>MDBK</sub> , SK6 (T), SK6 (T) CD46 <sub>CRIB</sub> , SK6 (T) CD46 <sub>MDBK</sub>
Antikörper:	Primärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween): mAk D5 (1:5), mAk Code 4 (1:10) anti-Sindbis-Serum (1:500) Sekundärantikörper (Verdünnung in PBS + 0,01% Tween): Ziege anti-Maus IgG (1:1000) Ziege anti-Kaninchen IgG (1:1000)
Lösungen:	Substrat: 9,25ml Aminoethylcarbazol (AEC) in Dimethylformamid (4mg/ml) 0,75ml 50mM Na-Acetat pH 5,2 5µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %) Methanol/Aceton (1:1), PBS, PBS + 0,01% Tween

Die infizierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS für 20min bei -20°C mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert, anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und mit PBS rehydriert. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 2h bei RT mit dem Primärantikörper in

angegebener Konzentration. Die Zellen wurden vor Zugabe des Sekundärantikörpers zweimal für 5min mit PBS + 0,01% Tween gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei RT und zweifachem Waschen für jeweils 5min mit PBS + 0,01% Tween erfolgte die Detektion der Antikörperbindung durch Inkubation mit dem Substrat, das durch die Peroxidase in einen wasserunlöslichen roten Niederschlag umgesetzt wurde.

### 2.2.1.7 Infektionsversuche

#### 2.2.1.7.1 Plaque-Test zur Bestimmung der Empfänglichkeit

Zellen:	MDBK, CRIB
Virusstämme:	BHV-1 „M“, SuHV-1 „Begonia“, VSV „Indiana“
Medium:	Dulbecco´s MEM mit FKS und Antibiotika, Dulbecco´s MEM mit FKS und Antibiotika + 1,25% Methocel <sup>®</sup> MC (Methylcellulose)
Lösungen:	1 % Kristallviolett-Lsg. in 50 % Ethanol 5 % Formalin in PBS

Der Plaque-Test erfolgte auf konfluenten CRIB- und MDBK-Zellen in 24-well-Gewebekulturschalen. Von dem Testvirus wurden sechs Verdünnungsstufen (1:10) in 1ml Volumen des FKS-haltigen Zellkulturmediums angelegt. Das Infektionsvolumen betrug 200µl. Nach 2h Virusadsorption bei 4°C wurden die Zellen mit einem Tropfen Dulbecco´s MEM mit FKS und Antibiotika + 1,25% Methocel<sup>®</sup> MC überschichtet und für ca. 72h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 5% Formalin in PBS für 20min bei RT fixiert und dann der Überstand abgenommen. Anschließend wurde bei RT mit 1% Kristallviolett-Lsg. in 50% Ethanol 10min gefärbt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> abgespült. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem die Plaque-Anzahl auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen) als 100% angenommen und die Empfänglichkeit der jeweiligen Zelllinie in % der Kontrolle angegeben wurde.

#### 2.2.1.7.2 Titration zur Bestimmung des Virustiters und der Empfänglichkeit

Zellen:	MDBK, CRIB, MDBK (T) Dyn <sup>wt</sup> , MDBK (T) Dyn <sup>K44A</sup> , CRIB (T) CD46 <sub>MDBK</sub> , SK6 (T), SK6 (T) CD46 <sub>CRIB</sub> , SK6 (T) CD46 <sub>MDBK</sub>
Virusstämme:	BVDV NADL, BVDV 519, BDV X-818, „Giraffe“, Sindbis-Virus
Medium:	Dulbecco´s MEM mit FKS und Antibiotika

Die Virustitration erfolgte auf subkonfluenten Zellen (ca. 80%) in 24-well-Gewebekulturschalen. Von dem zu testenden Überstand wurden sechs Verdünnungsstufen (1:10) in 1ml Volumen des FKS-haltigen Zellkulturmediums angelegt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden pro „well“ 0,5ml FKS-haltiges Medium zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für etwa 18h. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen

Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Zur Ermittlung des Virustiters pro ml wurde die Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale der beiden letzten virushaltigen Verdünnungsstufen mit dem betreffenden Verdünnungsfaktor multipliziert und daraus der Mittelwert gebildet. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem der errechnete Titer auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen) als 100% angenommen und der Titer der jeweiligen Zelllinie in % der Kontrolle angegeben wurde.

#### 2.2.1.7.3 Inhibition der BVDV Infektion durch Hemmstoffe der endosomalen Ansäuerung

Zellen: MDBK  
 Virusstämme: BVDV NADL  
 Medium: Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika  
 Chemikalien: Chloroquin (Fa. Fluka), Bafilomycin A1 (Fa. Alexis), Ammoniumchlorid (Fa. Fluka)

Die Infektion erfolgte auf subkonfluenten Zellen (ca. 80%) in 24-well-Gewebekulturschalen.  $2 \times 10^2$  infektiöse Einheiten BVDV NADL in 200µl wurden für 1h bei 4°C an MDBK-Zellen gebunden. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 500µl Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika mit unterschiedlichen Konzentrationen des betreffenden Inhibitors bzw. ohne Inhibitor ersetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für etwa 16h. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem der Mittelwert der Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale der beiden letzten virushaltigen Verdünnungsstufen auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen ohne Inhibitor) mit dem betreffenden Verdünnungsfaktor multipliziert, als 100% angenommen und die Anzahl der jeweiligen Probe in % der Kontrolle angegeben wurde.

#### 2.2.1.7.4 Inhibition der BVDV Infektion durch Hemmstoffe der Endozytose

Zellen: MDBK  
 Virusstämme: BVDV NADL  
 Medium: Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika  
 Chemikalien: Nystatin (Fa. Calbiochem), Chlorpromazin (Fa. Sigma), β-Methyl-Cyclodextrin (Fa. Sigma)

Die Infektion erfolgte auf subkonfluenten Zellen (ca. 80%) in 96-well-Gewebekulturschalen. Von dem Testvirus BVDV NADL wurden sechs Verdünnungsstufen (1:10) in 1ml Volumen des FKS-haltigen Zellkulturmediums angelegt. 200µl dieser Verdünnungsstufen wurden zum Zweck der Virusadsorption für 1h bei 4°C auf MDBK-Zellen inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 500µl Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika mit unterschiedlichen Konzentrationen des betreffenden Inhibitors bzw. ohne Inhibitor ersetzt. Während die anderen

Inhibitoren löslich sind, ist Nystatin unlöslich, aber in Suspension wirksam. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für etwa 12h. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem der Mittelwert der Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale der beiden letzten virushaltigen Verdünnungsstufen auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen ohne Inhibitor) mit dem betreffenden Verdünnungsfaktor multipliziert, als 100% angenommen und die Anzahl der jeweiligen Probe in % der Kontrolle angegeben wurde.

#### 2.2.1.7.5 Inhibition der BVDV Infektion in hyperosmolarem Medium

Zellen:	MDBK
Virusstämme:	BVDV NADL
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika, Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika + 0,45 M D(+)-Saccharose
Chemikalien:	D(+)-Saccharose (Fa. Roth), Bafilomycin A1 (Fa. Alexis)

Die Infektion erfolgte auf subkonfluenten Zellen (ca. 80%) in 24-well-Gewebekulturschalen. Von dem Testvirus BVDV NADL wurden sechs Verdünnungsstufen (1:10) in 1ml Volumen des FKS-haltigen Zellkulturmediums bzw. in Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika + 0,45M D(+)-Saccharose angelegt. 200µl dieser Verdünnungsstufen wurden für 1h bei 4°C an MDBK-Zellen gebunden. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 500µl Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika + 0,5µM Bafilomycin A1 ersetzt. Dadurch wurde noch gebundenes, aber nicht internalisiertes Virus an der normalen Endozytose gehindert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für etwa 14h. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem der Mittelwert der Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale der beiden letzten virushaltigen Verdünnungsstufen auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen ohne D(+)-Saccharose) mit dem betreffenden Verdünnungsfaktor multipliziert, als 100% angenommen und die Anzahl der jeweiligen Probe in % der Kontrolle angegeben wurde.

#### 2.2.1.7.6 Inhibition der BVDV Infektion durch intrazelluläre K<sup>+</sup>-Depletion

Zellen:	MDBK
Virusstämme:	BVDV NADL
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika, Hypotones Medium (Dulbecco's MEM und H <sub>2</sub> O im Verhältnis 1:1)
Lösungen:	Kalium-Depletionspuffer, Kalium-Kontrollpuffer
Chemikalien:	Bafilomycin A1 (Fa. Alexis)

Die Infektion erfolgte auf subkonfluenten Zellen (ca. 80%) in 24-well-Gewebekulturschalen. Die Zellen wurden 5min in hypotonem Medium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das hypotone Medium durch Kalium-Depletionspuffer bzw. Kalium-Kontrollpuffer ersetzt. Von dem Testvirus BVDV NADL wurden sechs Verdünnungsstufen (1:10) in 1ml Volumen des Kalium-Depletionspuffers bzw. des Kalium-Kontrollpuffers angelegt. 100µl dieser Verdünnungsstufen wurden für 1h bei 37°C zu den MDBK-Zellen gegeben. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 500µl Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika + 0,1µM Bafilomycin A1 ersetzt. Dadurch wurde noch gebundenes, aber nicht internalisiertes Virus an der normalen Endozytose gehindert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für etwa 14h. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem der Mittelwert der Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale der beiden letzten virushaltigen Verdünnungsstufen auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen mit Kalium-Kontrollpuffer) mit dem betreffenden Verdünnungsfaktor multipliziert, als 100% angenommen und die Anzahl der jeweiligen Probe in % der Kontrolle angegeben wurde.

#### 2.2.1.7.7 Invasionskinetik von BVDV und Sindbis-Virus

Zellen:	MDBK
Virusstämme:	BVDV NADL, Sindbis-Virus
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Chemikalien:	Bafilomycin A1 (Fa. Alexis)

$2 \times 10^2$  infektiöse Einheiten des Testvirus wurden für 1h bei 4°C an MDBK-Zellen gebunden. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 500µl Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika ersetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für unterschiedliche Zeitspannen. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde Bafilomycin A1 bis zu einer Endkonzentration von 0,5µM zugegeben und die Zellen für etwa 16h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem der Mittelwert der Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale der beiden letzten virushaltigen Verdünnungsstufen auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen ohne Bafilomycin A1) mit dem betreffenden Verdünnungsfaktor multipliziert, als 100% angenommen und die Anzahl der jeweiligen Probe in % der Kontrolle angegeben wurde.

Für die Temperaturabhängigkeit der BVDV Invasion wurde die Inkubation für unterschiedliche Zeitspannen nicht nur bei 37°C, sondern auch bei 23°C und 4°C durchgeführt. Als Kontrolle dienten dabei immer MDBK-Zellen ohne Bafilomycin A1 bei 37°C.

## 2.2.1.7.8 Polyethylenglykol-vermittelte Infektion von CRIB-Zellen

Zellen:	CRIB
Virusstämme:	BVDV NADL
Antikörper:	anti-bCD46-Serum
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Chemikalien:	Polyethylenglycol (MG 6000, Fa. Fluka), Polyethylenglycol (MG 1500, Fa. Boehringer)

Eine 10 cm-Gewebekulturschale mit CRIB-Zellen (ca.  $10^7$  Zellen) wurde 1h bei 23°C mit bzw. ohne anti-bCD46-Serum (1:300) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und in 1ml Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika + 10% PEG (MG 6000) +  $10^7$  infektiöse Einheiten BVDV NADL aufgenommen. Zellen und Virus wurden 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und wiederholt leicht geschüttelt. Die Zellen wurden dann 5min bei 400g abzentrifugiert, aufgenommen in 1ml vorgewärmtem Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika + 37,5% PEG (MG 1500) und dann sukzessive mit Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika nach je 1min verdünnt: 2x0,5ml, 2x1ml, 2x2ml und 1x10ml. Die 18ml wurden auf einer 10cm-Gewebekulturschale ausgesät und 20h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Die Empfänglichkeit der Zellen wurde errechnet, indem die Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale auf den Kontrollzellen (CRIB-Zellen ohne anti-bCD46-Serum) als 100% angenommen und die Anzahl der Probe in % der Kontrolle angegeben wurde.

## 2.2.1.8 Bestimmung der pH-Stabilität von BVDV und Sindbis-Virus

Zellen:	MDBK
Virusstämme:	BVDV NADL, Sindbis-Virus
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Lösungen:	Citrat-Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten
Chemikalien:	1,4-Dithiothreit (Fa. Roth)

100µl des Testvirus wurden in 900µl Citrat-Phosphat-Puffer der unterschiedlichen pH-Werte 15min bei 23°C inkubiert. Danach wurde, wie in 2.2.1.7.2 beschrieben, der Virustiter bestimmt.

Alternativ wurden 100µl des Testvirus BVDV NADL mit 10µl 1M DTT (Endkonzentration 10mM) und 890µl Citrat-Phosphat-Puffer der unterschiedlichen pH-Werte 15min bei 23°C inkubiert. Auch hier wurde anschließend der Virustiter bestimmt. Der Virustiter bei pH 7,0 ohne DTT wurde als 100% festgesetzt, aus den Virustitern bei den anderen pH-Werten bzw. mit DTT wurde die Infektiosität in % der Kontrolle errechnet.

## 2.2.1.9 „fusion from without“

Zellen:	MDBK
Virusstämme:	BVDV NADL, Sindbis-Virus
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Lösungen:	Citrat-Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten
Chemikalien:	1,4-Dithiothreitol (Fa. Roth), Bafilomycin A1 (Fa. Alexis)

Die „fusion from without“ erfolgte auf subkonfluenten Zellen (ca. 80%) in 24-well-Gewebekulturschalen.  $5 \times 10^3$  infektiöse Einheiten des Testvirus wurden 1h bei 4°C an die Zellen adsorbiert. Die Zellen wurden dann 2min bei 37°C mit vorgewärmtem Citrat-Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten ohne DTT (bei Sindbis-Virus) bzw. + 10mM DTT (bei BVDV NADL) inkubiert. Anschließend wurde der Puffer durch Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika + 0,5µM Bafilomycin A1 ersetzt und für etwa 14h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Die Fusionsaktivität der Testviren auf den jeweiligen Zellen wurde errechnet, indem die Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale auf den Kontrollzellen (MDBK-Zellen bei pH 7,0 - DTT ohne Bafilomycin A1) als 100% angenommen und die Anzahl der jeweiligen Probe in % der Kontrolle angegeben wurde.

## 2.2.1.10 Zelloberflächen-ELISA zur Quantifizierung der Oberflächenexpression von bCD46

Zellen:	MDBK, CRIB
Antikörper:	mAks BVD/CA 17, 26, 27, Ziege anti-Maus IgG Meerrettich-Peroxidase konjugiert
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Lösungen:	4% Paraformaldehyd in PBS, PBS, PBS + 0,5% Tween 20, TMB-Substrat, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz. 1:4 verdünnt in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Geräte:	ELISA-Reader Spectra II (Fa. SLT)
Chemikalien:	Tetramethylbenzidine (TMB)

Für diesen Versuch wurden CRIB- und MDBK-Zellen, die in 96-well-Platten zu einem vergleichbar dichten Zellrasen gewachsen waren, verwendet. Von den monoklonalen Antikörpern BVD/CA 17, 26 und 27 (Hybridomüberstände) bzw. einem 1:1:1 Mix aus allen drei Hybridomüberständen wurde eine serielle Verdünnung (1:5) angesetzt. CRIB- und MDBK-Zellen wurden mit diesen Verdünnungen für 40min bei 4°C inkubiert (Negativkontrolle ohne ersten Antikörper). Anschließend wurden die Zellen 5x mit PBS Tween gewaschen und schließlich mit 4% Paraformaldehyd 30min bei 23°C fixiert. Danach wurde erneut gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG (1:1000) 1h bei RT inkubiert. Wieder wurde 3x mit PBS Tween gewaschen und dann 50µl TMB-Substrat pro „well“ zugegeben. Nach 5min wurde die

Reaktion durch Zugabe von 50µl 1:4 verdünnter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz. gestoppt. Im ELISA-Reader wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 430nm gemessen (Referenzwellenlänge 620nm). Die Extinktionswerte der Negativkontrollen wurden von den Extinktionswerten der einzelnen Proben der jeweiligen Zelllinie abgezogen.

#### 2.2.1.11 LDL-Internalisierungstest

Zellen:	MDBK, CRIB
Antikörper:	mAks BVD/CA 17, 26, 27, Ziege anti-Maus IgG FITC-konjugiert
Medium:	Dulbecco's MEM mit Antibiotika serumfrei, Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika
Lösungen:	4% Paraformaldehyd in PBS, 0,2% Triton X-100 in PBS, PBS + 1% BSA + 1% Pferdeserum, PBS, PBS Tween, Einbettungsmedium
Geräte:	Glas-Deckgläschen rund, 12 mm Ø (Fa. MAGV)
Chemikalien:	DiI-LDL (Fa. Molecular Probes), Mowiol (Polyvinylalkohol 4-88 Fa. Sigma), DABCO (Fa. Fluka)

CRIB- und MDBK-Zellen wurden so dicht auf Deckgläschen ausgesät, daß sie nach 18h einen fast konfluenten Zellrasen bildeten. Das Medium wurde durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen wurden erneut 6h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde DiI-LDL bis zu einer Endkonzentration von 5µg/ml zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, 30min bei RT mit 4% Paraformaldehyd fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,2% Triton X-100 30min bei RT lysiert und unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBS + BSA + Pferdeserum für 20min bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit einem Gemisch der drei monoklonalen Antikörper BVD/CA 17, 26 und 27 1:10 in PBS tween 45min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde mit einem FITC-konjugierten Ziege anti-Maus IgG (1:1000 in PBS Tween) 45min bei 37°C inkubiert. Die Deckgläschen wurden abgetupft und umgedreht auf einen Tropfen Einbettungsmedium gelegt. Der Rand wurde mit Nagellack versiegelt und die Präparate wurden in der konfokalen Lasermikroskopie beurteilt.

#### 2.2.2 Bindungsassay mit BVDV NADL

##### 2.2.2.1 Bindungsassay mit [<sup>3</sup>H]-markiertem BVDV NADL

##### 2.2.2.1.1 Radioaktive Markierung von BVDV NADL mit [<sup>3</sup>H]-Uridin

Zellen:	MDBK
Virus:	BVDV NADL
Substanz:	[5,6- <sup>3</sup> H]-Uridin (Fa. Amersham-Pharmacia) Optiprep Density Gradient Medium 60% (Fa. Sigma-Aldrich)

Geräte:	Szintillationscocktail rotiszint eco plus (Fa. Roth) Kühlzentrifuge Laborfuge 400R (Fa. Heraeus) Ultrazentrifuge L8-70 (Fa. Beckman) Liquid scintillation counter (LSC) 1209 Rackbeta (Fa. Wallac)
Medium:	Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika

$1 \times 10^7$  MDBK-Zellen wurden auf zwei 15cm-Gewebekulturschalen ausgesät, so daß sich nach 24h bei 37°C im Brutschrank ein subkonfluenten Zellrasen (ca. 80%) ausgebildet hatte. Das Medium der 15cm-Gewebekulturschale wurde entfernt und die Zellen mit BVDV NADL mit einer MOI von 0,1 in 6ml Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika 1h bei 37°C infiziert. Das Medium wurde anschließend auf 20ml aufgefüllt. 26h p.i. (beginnender zytopathischer Effekt) wurde das Kulturmedium durch 12ml frisches Medium ersetzt, das 500µl [5,6-<sup>3</sup>H]-Uridin enthielt. Nach weiteren 48h wurden die Kulturüberstände abgenommen und Zelldetritus durch Zentrifugation für 30min bei 4°C und 3939g abgetrennt. Um das markierte Virus zu pelletieren, wurde der Überstand über Nacht bei 4°C mit 38581g ultrazentrifugiert (Ultrazentrifuge L8-70 Fa. Beckman; Rotor: SW41). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das zurückbleibende Viruspellet wurde nach Zugabe von 300µl kaltem PBS über Nacht bei 0°C resuspendiert.

Die weitere Reinigung des nun in ca. 300µl gelösten, markierten Virus von nichtgebundener Restradioaktivität erfolgte über Flotation in einem Optiprep-Gradienten durch Ultrazentrifugation bei 4°C für 6h mit 165051g (Ultrazentrifuge:L8-70 Fa. Beckman; Rotor: SW60). 600µl Virus in 30% Optiprep/PBS wurden mit 600µl 25%, jeweils 500µl von 20%, 15%, 10%, 5% Optiprep-Fraktionen und 600µl PBS überschichtet.

Nach der Zentrifugation war ein deutliches Bandenmuster zu erkennen. Es wurden 20 Fraktionen à 200µl mit der Pipette von oben abgenommen. Von diesen 20 Fraktionen wurden jeweils 5µl mit 5ml des gebrauchsfertigen Szintillationscocktails gut gemischt und im LSC-Gerät wurden die cpm-Werte für jede Fraktion gemessen. Anhand der Meßergebnisse wurden die Fraktionen des Radioaktivitätspeaks (Fraktionen 13 und 14) gepoolt und im Bindungsassay eingesetzt.

#### 2.2.2.1.2 Bindungsassay

Zellen:	MDBK, CRIB, SK6 (T), SK6 (T) CD46 <sub>CRIB</sub> , SK6 (T) CD46 <sub>MDBK</sub>
Antikörper:	mAk BVD/CA 17, 26, 27
Lösungen:	PBS defiz., Pferdeserum, PBS
Substanz:	Doxyzyklin (Fa. ICN) Rotiszint eco plus (Fa. Roth)
Gerät:	Liquid scintillation counter (LSC) 1209 Rackbeta (Fa. Wallac)

Für den Bindungsassay wurden die zu testenden Zelllinien auf 24-well-Gewebekulturschalen so ausgesät, daß sich nach 24h bei 37°C ein konfluenten Zellrasen ausgebildet hatte. Die Tet on

Zelllinien wurden nicht induziert, induziert mit Präinkubation des monoklonalen Antikörper-Mix (BVD/CA 17, 26 und 27 1:1:1) und ohne Präinkubation des monoklonalen Antikörper-Mix im Dreifachansatz getestet. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 10µg/ml Doxyzyklin zum Medium der Zellen für mindestens 18h. Nicht-induzierbare Zellen wurden mit bzw. ohne Präinkubation des monoklonalen Antikörper-Mixes getestet. Präinkubiert wurden die Zelllinien nach Absaugen des Mediums für 1h bei 4°C. Nach erfolgter Präinkubation wurden pro „well“ einer 24-well-Gewebekulturschale 6000cpm der virushaltigen Optiprep-Fraktionen eingesetzt. Diese wurden mit PBS defiz. (mit Zugabe von 2% Pferdeserum) auf 200µl pro „well“ der Gewebekulturschale verdünnt und für 1h bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Virus von jedem „well“ einzeln abgenommen und in separaten Meßröhrchen (Fa. Roth) gesammelt. Die folgenden zwei Waschschriffe mit 200µl pro „well“ kaltem PBS wurden in denselben Röhrchen gesammelt. Im nächsten Schritt folgte die Zellyse (siehe 2.2.3.1). Das Zellysat und ein sich anschließender Waschschriff mit 200µl pro „well“ kaltem PBS wurden in neuen Meßröhrchen gesammelt. Vor der Messung der cpm-Werte im LSC-Gerät wurden pro Röhrchen 5ml gebrauchsfertiger Szintillationscocktail (rotiszint eco plus, Fa. Roth) hinzugegeben und die Röhrchen gut geschüttelt. Anschließend wurde für jede Probe die Radioaktivität im Überstand und die zellassoziierte Radioaktivität gemessen und der gebundene Anteil an der Gesamtradioaktivität in % errechnet. Hierfür wurden die gemessenen cpm-Werte der beiden Röhrchen addiert und anschließend der prozentuale Anteil des Röhrchens mit dem Zellysat an der Gesamtradioaktivität ermittelt. Als letztes wurde der Mittelwert aus den drei Ergebnissen jeder Zelllinie errechnet.

#### 2.2.2.1.3 Statistische Auswertung der Bindungsdaten

Die statistische Auswertung der Bindungsdaten erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biomathematik des Instituts für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen. Verwendet wurde das Statistikprogrammpaket BMDP / Dynamic 7.0 (Dixon, 1993).

#### 2.2.2.2 Internalisierungsassay mit BVDV NADL mittels Real-Time-PCR

Zellen:	CRIB, MDBK
Virus:	BVDV NADL
Lösungen:	PBS
Chemikalien:	β-Methyl-Cyclodextrin (Fa. Sigma)

Für den Internalisierungsassay wurden die zu testenden Zelllinien auf 6-well-Gewebekulturschalen so ausgesät, daß sich nach 24h bei 37°C ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte. Die Zellen wurden mit bzw. ohne Präinkubation mit 10mM β-Methyl-Cyclodextrin getestet. Präinkubiert

wurden die Zelllinien für 2h bei 37°C. Nach erfolgter Präinkubation wurde jedes „well“ einer 6-well-Gewebekulturschale mit BVDV NADL in einer MOI von 10 und einem Volumen von 1ml inokuliert. Zusätzlich wurde  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin in einer Endkonzentration von 10mM zugegeben bzw. ohne  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin inkubiert. Anschließend fand die Virusbindung für verschiedene Zeitspannen bei 4°C oder 37°C statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und jedes „well“ wurde 8x mit je 1ml PBS gewaschen. Von jedem „well“ wurde einzeln mittels RNeasy die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.4.4) und in die Real-Time-PCR eingesetzt (siehe 2.2.4.14).

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Zellyse

Lysispuffer: 1% Triton X-100 (w/v) in 50mM Tris/HCL pH 8,0  
 Geräte: Tischzentrifuge: 5415C (Fa. Eppendorf)  
 Lösungen: PBS

Alle Schritte der Zellyse fanden bei 0°C statt. Die Zellen wurden mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysispuffer für 10min inkubiert. Während die Zellwände aufgebrochen werden, bleiben die Zellkerne intakt und haften am Boden der Kulturschale, so daß das Lysat nicht durch Nukleinsäuren kontaminiert wird. Vor der weiteren Verwendung der Lysate wurden diese durch Zentrifugation (10000g, 5min) geklärt.

### 2.2.3.2 SDS-PAGE

Lösungen für das Gelsystem:

Probenpuffer:	6M	Harnstoff
	62,5mM	Tris-HCL pH 6,8
	2%	SDS
	10%	Glycerol (v/v)
	5%	$\beta$ -Mercaptoethanol (v/v), (nur für reduzierende Bedingungen)
	0,025%	Bromphenolblau (w/v)
	0,025%	Phenolrot (w/v)

Molekulargewichtsstandard: prestained marker protein (Fa. GIBCO)

Acrylamidlösung (30:1): 40% Acrylamid (w/v)  
 Glycerin: 87% (v/v) (Stammlösung)  
 TEMED: >99% (v/v) (Stammlösung)  
 Ammoniumpersulfat: 10mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (Stammlösung), jeweils frisch angesetzt  
 Geräte: Proteingelektrophoresekammern: Miniprotean II (Fa. Biorad);  
 Eigenbau JLU Gießen

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde ein SDS-PAGE System mit Tris-Tricin-Puffer oder Lämmli-Puffer verwendet (Trenngel 8-12% Acrylamid-Endkonzentration, Sammelgel 4% Acrylamid-Endkonzentration). Die Elektrophoresen wurden mit einer vertikalen Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Proteinproben wurden vor dem Auftragen in jeweils gleichem Volumen an Probenpuffer aufgenommen und 5min bei 95°C erhitzt. Falls die Proteine reduziert werden sollten, wurde dem Probenpuffer 10% β-Mercaptoethanol zugemischt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60V im Sammelgel und bei 120V im Trenngel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel für die Immunoblot-Analyse (siehe 2.2.3.3) weiterverwendet.

Tris-Tricin-Puffer:

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

Lämmli-Puffer:

2x Separating Gelpuffer:	0,75M	Tris HCl pH 8,8
2x Stacking Gelpuffer:	0,25M	Tris HCl pH 6,8
10x Laufpuffer:	0,25M	Tris HCl pH 8,3
	1,925M	Glycin
	1%	SDS

2.2.3.3 Immunoblot-Analyse von Proteinen (Western Blot)

Lösungen:	Transferpuffer:	Kathodenpuffer Roti Blot K 10x Konzentrat (Fa. Roth) Anodenpuffer Roti Blot A 10x Konzentrat (Fa. Roth)
	Blockierlösung:	Roti-Block 10x Konzentrat (Fa. Roth) 5% Magermilchpulver (Fa. Frema)
	Waschpuffer:	PBS + 0,01% Tween
Material:	Nitrozellulosemembran:	Pure nitrocellulose (Fa. Pall)
Antikörper:	Primärantikörper:	mAk-12CA5 (1:2500), mAk-Ab1(1:300), BVD/CA 26 (1:10)
	Sekundärantikörper:	Ziege anti-Maus IgG (1:10000)
Geräte:	Trans-Blot ® SD Semi-dry Transfer cell Apparatur (Fa. BioRad) Western Blot Prozessor (Fa. Pharmacia)	
Reagenz:	Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN <sup>TM</sup> ; Fa. Pierce)	

Diese Methode dient dem Nachweis von Protein im Anschluß an die SDS-PAGE (siehe 2.2.3.2). Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Sammelgel verworfen und die im Trenngel

aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran in einer Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer cell Apparatur bei 12V für 1h transferiert. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran im Western Blot Prozessor nach folgendem Programm inkubiert:

- |           |                               |           |
|-----------|-------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>= Blockierung: 60min</b>   |           |
| 2.        | 10,0min                       | } Waschen |
| 3.        | 6,5min                        |           |
| 4.        | 5,0min                        |           |
| <b>5.</b> | <b>= 1. Antikörper: 60min</b> |           |
| 6.        | 10,0min                       | } Waschen |
| 7.        | 5,0min                        |           |
| 8.        | 5,0min                        |           |
| <b>9.</b> | <b>= 2. Antikörper: 60min</b> |           |
| 10.       | 7,0min                        | } Waschen |
| 11.       | 5,0min                        |           |
| 12.       | 5,0min                        |           |

Die ca. 6x8cm große Membran wurde anschließend mit 0,7ml Oxidizing Reagent und 0,7ml Enhanced luminol Reagent des Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN<sup>TM</sup>) für ca. 1min inkubiert. Schließlich erfolgte eine Autoluminographie für ca. 10s, 60s und 5min.

#### 2.2.3.4 Isolierung von Membranfraktionen (Martin et al., 1999)

Zellen:	CRIB, MDBK
Lösungen:	Homogenisierungspuffer: 50mM Tris/HCl pH 7,4 50mM NaCl 300mM Saccharose Protease-Inhibitor-Cocktail (Fa.Sigma)
Geräte:	Sonopuls HD 200 (Fa. Bandelin) Ultrazentrifuge LB-70 (Fa. Beckmann) UZ Rotor Typ 60 Ti (Fa. Beckmann) „rubber policemen“

$2 \times 10^8$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden in je 10ml Homogenisierungspuffer mit einem „rubber policeman“ abgekratzt. Mittels Zentrifugation wurden sie 5min bei 4°C pelletiert und dann erneut in 10 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen. Anschließend wurden sie durch einen vierfachen Ultraschall-Puls von 5s bei 200W, 100% Leistung und 4°C homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10min bei 800g und 4°C geklärt. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert, mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt und 70min bei 4°C und 100.000g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500µl des Homogenisierungspuffers über Nacht bei 4°C resuspendiert.

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Anzucht von Bakterien

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

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

### 2.2.4.2 Plasmidisolierung

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

#### Minipräparation (Macherey & Nagel)

Lösung P1:	50mM	Tris-HCL, pH 8,0
	10mM	EDTA
Lösung P1/RNase:	Lösung P1	
	0,1mg/ml	RNase A
Lösung P2:	0,2M	NaOH
	1%	SDS
Lösung P3:	2,55M	Kalium-Acetat, pH 5,5
Geräte:	Tischzentrifuge 5415C (Fa.Eppendorf)	

Die Präparation kleinerer DNA-Mengen (bis 10µg) wurde durch Alkalische Lyse (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Eine 3ml Bakterienkultur wurde über Nacht inkubiert. 1,5ml der Kultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit ca. 10000g 2min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Sediment in 200µl der Lösung P1/RNase resuspendiert. Dann wurden 200µl der Lösung P2 hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 200µl der Lösung P3 zugegeben, die Suspension wurde gemischt und nach 10min Zentrifugation bei 10000g wurde der Überstand vorsichtig in ein neues

Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit 500µl Isopropanol präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde in 75µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

### Midipräparation (Macherey & Nagel)

Lösungen P1-P3 wie für Minipräparation beschrieben

Puffer N2:	100mM	Tris
	900mM	KCl
	15%	Ethanol
	mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6,3 einstellen	
Puffer N3:	100mM	Tris
	1150mM	KCl
	15%	Ethanol
	mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 6,3 einstellen	
Puffer N5:	100mM	Tris
	1000mM	KCl
	15%	Ethanol
	mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 8,5 einstellen	
Säulen:	Nukleobond AX 100 (Fa. Macherey & Nagel)	
Geräte:	Kühlzentrifuge Laborfuge 400R (Fa. Heraeus)	

Zur Präparation größerer DNA-Mengen (bis 100µg) aus 50ml Übernachtskulturen wurden Nukleobond AX 100-Säulen verwendet. Die Bakterien wurden für 10min bei 3939g pelletiert und anschließend in 4ml der Lösung P1/RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 4ml der Lösung P2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 4ml der Lösung P3 hinzugegeben und der Ansatz erneut vorsichtig durch Invertieren gemischt. Während der folgenden 15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kam es zur Präzipitation der bakteriellen Proteine sowie der chromosomalen DNA. In der Zwischenzeit wurde eine Nukleobond AX 100-Säule mit 3ml der Lösung N2 äquilibriert. Das präzipitierte Material wurde durch Filtration entfernt und die klare plasmidhaltige Phase auf die äquilibrierte Säule gegeben. Danach wurde die Säule zweimal mit jeweils 10ml der Lösung N3 gewaschen und die an die Säule gebundene Plasmid-DNA durch Zugabe von 3ml der Lösung N5 eluiert. Jeweils 1ml Eluat wurden mit 700µl Isopropanol präzipitiert und die pelletierte DNA anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde in 60µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

#### 2.2.4.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Bakterien:	<i>E.coli</i> K12-Stamm HB101
Medien:	
TFB I:	30mM KOAc
	100mM RbCl
	10mM CaCl <sub>2</sub>
	50mM MnCl <sub>2</sub>

15% Glycerol  
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und steril filtrieren

TFB II: 10mM MOPS  
75mM CaCl<sub>2</sub>  
10mM RbCl  
15% Glycerol  
mit KOH auf pH 6,5 einstellen und steril filtrieren

LB-Medium

Geräte: Kühlzentrifuge Laborfuge 400R (Fa. Heraeus)  
Schüttler (Fa. Infors)  
Photometer MP-plus 25 (Fa. MAGV GmbH)  
Heizblock (Fa. Eppendorf)

Um *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA effektiv zu transformieren, müssen sie zuerst kompetent gemacht werden. Dazu wurden 250ml LB-Medium mit 1:100 einer Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 185rpm und 37°C geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 erreicht war. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (5min bei 3939g, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 100ml eisgekühltem TFB I-Medium aufgenommen, resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (5min bei 3939g, 4°C), das Pellet in 10ml eiskaltem TFB II resuspendiert, für 1h auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und dann bei -70°C eingefroren und gelagert.

Zur Transformation wurden pro Ansatz 50µl der kompetenten Bakterien mit etwa 50ng Plasmid-DNA oder 10-15µl Ligationsansatz für 1h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1min bei 37°C wurden die Transformationsansätze mit LB-Medium auf 0,5ml aufgefüllt, 30min unter Schütteln bei 37°C inkubiert und schließlich auf LB-Agarplatten (LB/Amp) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C für 12-18h inkubiert; einzelne Kolonien wurden zum Animpfen von Kulturen für Mini- oder Midipräparationen (siehe 2.2.4.2) verwendet.

#### 2.2.4.4 Isolierung von Gesamt-RNA mittels RNeasy

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

Die RNA wurde aus Zellen im 6-well-Format (Internalisierungsassay) bzw. 10cm-Format (CD46-Isolierung) gewonnen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 350µl (600µl im 10 cm-Format) Lysis-Puffer RLT + 1% β-MCE 2min bei RT lysiert. Das Gesamtlisat wurde auf eine QiaShredder Säule gegeben und 1min bei 10000g zentrifugiert. Das Lysat wurde 1:1 mit 70% Ethanol versetzt und durch pipettieren gemischt. Mit dem gut vermischten Lysat wurde eine

RNeasy-Säule beladen, 15s bei 8000g zentrifugiert und das Lysat verworfen. Anschließend wurde 1x mit 700µl Waschpuffer RW1 und 2x mit 500µl Waschpuffer RPE gewaschen. Zum Trocknen wurde die RNeasy-Säule erneut 2min bei 10000g zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 30µl RNase freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> beladen, 2min bei RT inkubiert und dann bei 8000g 1min zentrifugiert. Abschließend konnte die RNA photometrisch quantifiziert werden (siehe 2.2.4.8).

#### 2.2.4.5 Isolierung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Zellen: HeLa Tet off Dyn<sup>wt</sup>  
Lösung: 20mM TRIS/20mM EDTA pH 8,0  
Enzyme: Proteinase K (Fa. Sigma 10mg/ml)  
Geräte: Tischzentrifuge Biofuge Pico (Fa. Heraeus)  
Medium: Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika

3x10<sup>6</sup> Zellen wurden abtrypsiniert und in 2ml Dulbecco's MEM mit FKS und Antibiotika resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 5min bei ca. 5000g pelletiert. Nach Resuspension in 200µl 20mM TRIS/ 20mM EDTA pH 8,0 wurden 10µl 10% SDS und 5µl Proteinase K-Lösung zugegeben und durch vortexen gemischt. Nachfolgend wurde 2h bei 37°C geschüttelt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 500µl aufgefüllt. Aus dieser Lösung wurde dann mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.4.6) die genomische DNA gereinigt und per Isopropanolzugabe im sauren Milieu gefällt (siehe 2.2.4.7). Die gefällte DNA wurde in 100µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen.

#### 2.2.4.6 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

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

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion dient zur weitgehenden Entfernung von kontaminierenden Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Zur Nukleinsäurelösung wurde 1x Volumen Phenol/Chloroform-Lösung (1:1) gegeben, der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend zur Verbesserung der Phasentrennung für ca. 5min in einer Zentrifuge bei 10000g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die Nukleinsäuren und konnte vorsichtig in ein zweites Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend wurde sie mit Ethanol bzw. Isopropanol präzipitiert (siehe 2.2.4.7).

#### 2.2.4.7 Ethanolpräzipitation von DNA/RNA und Isopropanolpräzipitation von DNA

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



Geräte: Gelelektrophoresekammern, Eigenbau JLU Gießen  
UV-Transilluminator (Fa. Bachofer)

Die Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten für analytische und präparative Zwecke erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in 0,8-2% (w/v) Agarosegelen bei konstanter Spannung (Feldstärke 4-8V/cm). Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer, der mit 125µg/l Ethidiumbromid (EtBr) versetzt war. Das im Puffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose mit einem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer/EtBr versetzt, durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in die „Schlitten“ der Elektrophoresekammern gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer/EtBr aufgefüllt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit etwa dem 0,1fachen Volumen DNA- bzw. RNA-Auftragspuffer gemischt. Als Längenstandard diente ein 1kb-Marker. Nach dem Lauf wurden die DNA- bzw. RNA-Fragmente des Gels unter UV-Licht an einem Transilluminator analysiert, photographisch dokumentiert oder die entsprechenden DNA-Banden für eine Aufreinigung aus der Agarose ausgeschnitten (siehe 2.2.4.10).

#### 2.2.4.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Material: Ultrafree<sup>®</sup>-DA-Säulen (Fa. Millipore)  
Geräte: Tischzentrifuge 5415C (Fa. Eppendorf)

Die Aufreinigung der DNA aus Agarose erfolgte mit Hilfe eines Kits (Ultrafree<sup>®</sup>-DA). Dieses Kit ist geeignet, um DNA zwischen 100-10000 Basenpaaren aus Agarosegelen für Klonierungszwecke oder für die Sequenzierung zu extrahieren. Zur Aufreinigung wird das DNA-haltige Agarosegelstück ausgeschnitten und in eine Säule („Gel Nebulizer“) überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 5000g, bei der feste Gelbestandteile zurückbehalten werden, befindet sich die extrahierte DNA im Agarosegelpufferhaltigen Filtrat und kann direkt weiter verwendet werden.

#### 2.2.4.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Enzyme: T4 DNA-Ligase (Fa. MBI-Fermentas)  
Restriktionsendonukleasen (Fa. New England BioLabs; Fa. Takara)  
Alkalische Phosphatase (CIAP) (Fa. Boehringer)  
T4-Polynukleotidkinase (Fa. New England BioLabs)  
Substanz: ATP (100mM)

Die Ligation von DNA-Fragmenten, z. B. das Einfügen von DNA-Fragmenten in Vektorplasmide, erfolgte mit T4 DNA-Ligase. T4 DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3'-OH-Gruppe mit der 5'-PO<sub>4</sub>-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNA durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch. Um ligierbare Enden zu erhalten, mußten zuvor beide Ligationspartner mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gleicher Spaltspezifität behandelt werden. Damit eine intramolekulare Religation eines linearisierten Vektorplasmids verhindert wurde, mußte der Vektor zusätzlich durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert werden. Der andere Ligationspartner mußte entsprechend phosphorylierte Enden aufweisen, damit die Ligation erfolgen konnte. Eine Phosphorylierung kann durch T4 Polynukleotidkinase mit ATP als Phosphatgruppendonator katalysiert werden. Ligationen wurden in einem Volumen von 20-35µl in 1x Ligationspuffer und mit 1U T4 DNA-Ligase angesetzt. Die Menge der Ligationspartner wurde über den Vergleich der Bandenintensitäten auf einem Agarosegel bestimmt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert betrug in etwa 1:3. Die Ligation fand bei 23°C statt.

#### 2.2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Enzyme:            *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. New England BioLabs)  
                      *Pfu*-DNA-Polymerase (Fa. Stratagene)  
Geräte :            PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400 (Fa. Perkin Elmer)  
                      PCR-Maschine Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)

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

Durchführung:

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

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

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einer PCR-Maschine, wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah (Standardbeispiel):

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

Nachdem die Erfolgskontrolle durch das Auftrennen von 1µl Reaktionsansatz im DNA-Agarosegel (siehe 2.2.4.9) durchgeführt worden war, wurden die PCR-Fragmente der Hälfte des Ansatzes (50µl) mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.2.4.7) und anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten. Für die Ligation in einen Plasmidvektor wurde der Plasmidvektor ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen geschnitten.

## 2.2.4.13 RT-PCR (Reverse Transkription)

Enzyme:	Hpr I Ribonuclease-Inhibitor (Fa. Takara) Superscript RT (Fa. Invitrogen)
Reagenzien:	1,4-Dithiothreit (Fa. Roth) 5x Reverse Transcriptase – Puffer (Fa. Gibco)
Geräte:	PCR-Maschine Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)

Die RT-PCR entspricht einer normalen PCR auf DNA-Basis, allerdings ist ein Schritt zur Transkription der RNA-Matrize in einzelsträngige DNA vorgeschaltet. Dazu wurde zuerst die RNA-Matrize mit einem Minusstrang DNA Primer hybridisiert. Darauf folgte die Synthese des einzelsträngigen DNA-Strangs durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT). Das entstandene einzelsträngige DNA-Produkt konnte für eine normale PCR auf DNA-Basis eingesetzt werden.

Durchführung:

Für das „Annealing“ des Minusstrang DNA Primers an die RNA Matrize wurde nach folgendem Pipettierschema gearbeitet:

RNA Matrize	x $\mu$ l (4 $\mu$ g)
Minusstrang-Primer [1pmol/ $\mu$ l]	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 10,0 $\mu$ l

In einer PCR Maschine wurde dann für 3min auf 95°C erhitzt und je 2min bei 72°C, 56°C und 42°C abgekühlt. Zu den 10 $\mu$ l RNA-Mix wurden dann 10 $\mu$ l RT-Mix gegeben und 1h bei 37°C inkubiert.

5x RT-Puffer	4 $\mu$ l
0,1M DTT	2 $\mu$ l
10mM dNTP's	1 $\mu$ l
RNase Inhibitor (Hpr I)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1,7 $\mu$ l
Superscript RT	0,8 $\mu$ l

Von der einzelsträngigen DNA wurden in der Regel 5 $\mu$ l als Matrize für die darauffolgende DNA PCR verwendet (siehe 2.2.4.12)

## 2.2.4.14 TaqMan-PCR zur quantitativen Erfassung von BVDV RNA

Reagenzien:	2,5x PCR-Puffer 8a (Institut für Virologie), 2x Universal Mastermix (Fa. Perkin Elmer)
Sonde:	PVTaq01
Oligonukleotide:	PV-02, PV-03R
Geräte:	ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems) PCR-Maschine Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)

Bei der TaqMan-PCR kann quantitativ die Menge der zur Verfügung stehenden DNA-Matrize bestimmt werden. Genutzt wird bei dieser Methode eine DNA-Sonde, die an der einen Seite mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, an der anderen Seite mit einem „Quencher-Molekül“, welches die Fluoreszenz dämpft, solange die Distanz zwischen Reporter und Quencher ein bestimmtes Maß nicht überschreitet. Während der Elongation des PCR-Fragmentes kommt es durch eine Exonukleasefunktion der Taq-Polymerase zur Abspaltung einzelner Nukleotide von der Sonde. Dadurch wird auch das Quencher-Molekül abgespalten und die Fluoreszenz des Reporter-Moleküls wird meßbar. Die Quantifizierung der Templatmenge ist möglich, indem in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion errechnet wird, wieviel Fluoreszenzzunahme pro Zyklus stattfindet.

Für die TaqMan-PCR zur Analyse von BVDV RNA wurde eine reverse Transkription vorgeschaltet und dann ein ca. 140 bp langes Stück aus der nicht translatierten Region (NTR)

amplifiziert, in dem die Sonde PVTaq01 bindet. Alle Mixe wurden als Mastermixe, das heißt für alle Proben gleichzeitig angesetzt. Vermischt wurden die Mixe durch Vortexen.

Pipettierschema TaqMan-PCR:

RNA	5,0	µl
PV03R (Minusstrang-Primer) [50pmol/µl]	1,0	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	19,0µl

Der RNA-Mix wurde auf 94°C erhitzt und dann 3min auf Eis abgekühlt.

2,5x PCR-Puffer 8a (RT-Puffer)	40,0	µl
RNase Inhibitor HPR I [40U/µl]	0,5	µl
Superscript RT [200U/µl]	0,5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad	81,0µl

Die 81µl RT-Mix wurden zu den 19µl RNA-Mix gegeben, 30min bei 45°C inkubiert und 2min bei 94°C erhitzt.

2x Universal Mastermix	30,0	µl
PV03R (Minusstrang-Primer) [50pmol/µl]	0,6	µl
PV02 (Plusstrang-Primer) [50pmol/µl]	0,6	µl
PVTaq01 (Sonde) [5pmol/µl]	3	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	19,8	µl

Für jede Probe wurden Triplikate angesetzt, so daß insgesamt 162µl RealTime-Mix mit 18µl RT-Produkt vermischt wurden. Daraus wurden je 50µl in die Reaktionsgefäße pipettiert, kurz zentrifugiert und die Reaktion gestartet.

Im Gegensatz zur normalen PCR findet bei dieser TaqMan-PCR „Elongation“ und „Annealing“ bei derselben Temperatur statt, so daß 1 Amplifikationszyklus nur aus 2 Schritten besteht.

Anzahl	Dauer	Temperatur
1x	2min	50°C
	10min	95°C
40x	15s	95°C
	1min	60°C

Als absoluter Standard, der bei der Real-Time-PCR zur Umrechnung auf Genomäquivalente essentiell ist, wurde eine serielle Verdünnung einer in-vitro synthetisierten BVDV NCP-7 RNA herangezogen. Diese serielle Verdünnung wurde photometrisch quantifiziert und mittels des „Schepartz Lab Biopolymer Calculator“ (<http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>) wurde die Molmasse des in-vitro Transkripts bekannter Sequenz errechnet. Anschließend konnte darüber eine Umrechnung der Real Time-Ergebnisse in Genomäquivalente erfolgen.

#### 2.2.4.15 Klonierung von PCR-Produkten

Enzyme: T4 DNA-Polymerase (Fa. Takara)  
 T4 Polynukleotidkinase (Fa. New Englands BioLabs)  
 Substanzen: dNTP's (10mM); ATP (100mM)

Um PCR-Produkte in einen linearisierten Vektor mit glatten Enden klonieren zu können, muß der 3'-Überhang des PCR-Produktes durch die Herstellung glatter Enden entfernt werden. Dieser Schritt erfolgt mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase. Dieses Enzym katalysiert eine 5'-3'-DNA-Synthese und besitzt zusätzlich eine 3'-5' („Proofreading“-) Exonuklease-Aktivität. 3'-Überhänge konnten daher mit diesem Enzym abgebaut werden. Gleichzeitig wurde eine Phosphorylierung der 5'-Enden des PCR-Produktes mit T4 Polynukleotidkinase durchgeführt. Dies war notwendig, um eine erfolgreiche Ligation in einen Vektor, dessen 5'-Enden zur Verhinderung einer Selbstligation dephosphoryliert waren, zu ermöglichen. Hierzu wurden der PCR-Reaktion (50µl) nach Beendigung der Amplifikation 2µl dNTP's (10mM), 1µl ATP (100mM), 1U T4 DNA-Polymerase und 5U T4 Polynukleotidkinase zugegeben und der Ansatz für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung der PCR-Produkte über eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.9).

#### 2.2.4.16 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“

Substanzen: „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ Kit (Fa. Stratagene)  
 Geräte: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400 (Fa. Perkin Elmer)  
 PCR-Maschine Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)  
 Enzyme: *Pfu* DNA-Polymerase (Fa. Stratagene)  
*Dpn* I (Fa. Stratagene)

Die Erzeugung einzelner Basenaustausche erfolgte weitgehend nach den Herstellerangaben des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ Kits. Bei dieser Methode dient ein doppelsträngiges Plasmid, in das die Mutation eingefügt werden soll, als Matrize. Für den gezielten Austausch bestimmter Basen in der Matrize wurden Oligonukleotide benötigt, welche die gewünschten Basenaustausche in ihrer Sequenz tragen und jeweils an den „sense“ und den „antisense“ Strang der DNA-Matrize binden. Mit Hilfe einer PCR-Maschine wird die Plasmid-DNA denaturiert; die Bindung der Oligonukleotide an die DNA und eine anschließende Primerextension wird durch das Enzym „*Pfu* DNA-Polymerase“ (besitzt eine „proofreading“ Aktivität) durchgeführt. Nach 12-16 Elongationsschritten, bei denen im Unterschied zur PCR lediglich die Ausgangs-DNA als Matrize diente, wurde die methylierte Ausgangs-DNA durch *Dpn* I abgebaut, während die mutierte, neu synthetisierte DNA nicht methyliert wurde und daher erhalten blieb. Die neu synthetisierte DNA ist

wie die Ausgangs-DNA doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche („nicks“) auf. Erst nach Transformation werden diese durch die Bakterien aufgefüllt.

Ein „QuikChange<sup>TM</sup>“-Standardansatz von 50µl wies folgende Zusammensetzung auf (ca. 50ng „Template“):

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

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

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

Im Anschluß an die Mutagenese-Reaktion wurde die Ausgangs-DNA durch Zugabe von 5U *Dpn* I und Inkubation für 1h bei 37°C abgebaut. Für die anschließende Transformation der mutierten DNA in Bakterien wurde 1µl des *Dpn* I-verdauten Reaktionsansatzes und ein 50µl-Aliquot kompetenter *E. coli* verwendet (siehe 2.2.4.3).

#### 2.2.4.17 *in vitro* Transkription

Enzyme: Sp6 RNA Polymerase (Fa. Takara)

Für die *in vitro* Transkription mit Sp6 RNA-Polymerase wurden 2µg Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau linearisiert, anschließend über eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.4.6) gereinigt und mit Ethanol gefällt (siehe 2.2.4.7). Nachdem das getrocknete DNA-Pellet in 10-15µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (RNase frei) aufgenommen worden war, setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

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

Die Transkription erfolgte für 1-2h bei 37°C. Anschließend wurde die Qualität der *in vitro* Transkripte über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert, bevor die transkribierte RNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.4.6) gereinigt und mit Ethanol gefällt wurde (siehe 2.2.4.7).

#### 2.2.4.18 Sequenzierung von DNA durch „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer

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

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

Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus Mini- oder Midipräparationen verwendet. Für eine Sequenzierungsreaktion wurde eine DNA-Menge von 200ng/kb Plasmidgröße und 2pMol eines Fluoreszenzfarbstoff (IR 800)-markierten Oligonukleotids (siehe 2.2.5.1) eingesetzt. Dieser Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 25µl aufgefüllt und anschließend auf vier PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Pro Reaktion wurden jeweils 2µl der verschiedenen Didesoxynukleotidgemische des Kits dazugegeben. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

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

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

#### 2.2.4.19 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Automatische Sequenzierung mit dem LI-COR 4000 L Sequenziergerät:

Elektrophoresepuffer:

10x „Long-Run“-Puffer:            162,0g            Tris  
    27,5g            Borsäure  
    9,3g             EDTA-Na<sub>2</sub>  
    mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1l auffüllen

„langes Gel“ (4%, 66cm):            32ml            Sequagel XR  
    8ml             Sequagel-Puffer  
    2ml             „Long Run“-Puffer  
    15ml            H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
    8g              Harnstoff  
    600µl           DMSO  
    400µl           10%iges APS  
    20µl            TEMED

„kurzes Gel“ (6%, 40cm):            30ml            Sequagel XR  
    7,5ml           Sequagel-Puffer  
    300µl           10%iges APS  
    400µl           DMSO

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

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf 0,2mm dicken Polyacrylamidgelen. Lange Gele (66cm) wurden für das Lesen von bis zu 1000 Basen verwendet; kurze Gele (40cm) für die Auftrennung von bis zu 600 Basen.

Die für die automatische Sequenzierung verwendeten Polyacrylamidlösungen wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Gelsystems angesetzt. Unmittelbar vor dem Gießen wurden TEMED und 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) zu den Polyacrylamidlösungen gegeben. Zur Herstellung

der Gele wurden „Spacer“ (Dicke 0,2mm) zwischen die Glasplatten gelegt, die Platten in dafür vorgesehene Schienen eingespannt und auf eine entsprechende Apparatur gelegt, die ein horizontales Gießen des Gels ermöglichte. Die Polymerisation erfolgte für mindestens 1h, anschließend wurde das Gel in das Sequenziergerät eingespannt und ein Vorlauf unter folgenden Bedingungen gestartet:

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

Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurden diese für 2min bei 72°C denaturiert. Der Gellauf wurde bei langen Gelen über 12h, bei kurzen Gelen über 5-6h unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenzfarbstoff-markierten DNA-Banden erfolgte mittels eines Lasers während des Laufs. Die als Bild oder Buchstabensequenz verfügbaren Daten wurden anschließend mit Hilfe eines Computerprogramms (DNA Strider) ausgewertet.

## 2.2.5 Klonierungen

### 2.2.5.1 Synthetische Oligonukleotide

Oligo	Nukleotidsequenz	Länge, Restriktions- schnittstelle	+/- Orientierung
BVR5	AAGAATTCACCATGAGGGCGTCTTGCACCC	30nt Eco R I	+
BVTK3	GAATTCATCTGTTCTGTTGCAGTGGTTGC	29nt Eco R I	-
BVTK21	AAGAATTCATGGGCAACCGCGGCATGGAAG	30nt Eco R I	+
BVTK22	TTTCTAGAGTTTAGAGGTCTGAAGGGGGGCCTG	32nt Xba I	-
BVTK29	CTGATTATGCTCATATGGGCAACCGCGGC	29nt	+
BVTK30	GAACATCATACTCCATGAATTCCTCGAGACG	31nt	-
BVTK31	CAGAGCGCCGGCGCGAGCTCGGTGCTC	27nt	+
BVTK32	GAGCACCGAGCTCGCGCCGGCGCTCTG	27nt	-

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

pTRE 320	GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCC	23nt	+
pTRE rev	TCACTGCATTCTAGTTGTGG	20nt	-
M13	GTAACACGACGGCCAGTG	18nt	+
M13rev	CAGGAAACAGCTATGACC	18nt	-

### 2.2.5.2 Klonierung der Dynamin-Konstrukte

Plasmide:           pBluescriptII SK- (Fa. Stratagene)  
                      pLitmus 28  
                      pTRE (Fa. Clontech)

Aus genomischer DNA wurde mit dem Plusstrang Primer BVTk21 und dem Minusstrang Primer BVTk22 das Dynamin per PCR isoliert, mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *Xba I* geschnitten und dann in den entsprechend geschnittenen pBluescriptII SK- ligiert (pT 73). Da das gesamte Dynamin-Gen ca. 2,7kb umfaßte und damit die Sequenzierung nicht möglich war, erfolgte zunächst ein Zwischenschritt. pT 73 wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoR I* und zusätzlich mit *Cla I* verdaut, einem Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz etwa in der Mitte des Dynamin-Gens liegt. Dieses Fragment wurde in einen mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *Cla I* geschnittenen pBluescriptII SK- ligiert (pT 75). Analog wurde die hintere Hälfte des Dynamin-Gens durch Verdauung mit den Restriktionsenzymen *Cla I* und *Xba I* aus pT 73 in einen mit den Restriktionsenzymen *Cla I* und *Xba I* geschnittenen pBluescriptII SK- ligiert (pT 74). In diesem Kontext wurde die Sequenzanalyse durchgeführt.

Für die Mutagenisierung und die N-terminale Fusion des HA-Tags wurden 200bp aus pT 75 mittels der Restriktionsenzyme *EcoR I* und *Aat II* herausgeschnitten und in einen mit *EcoR I* und *Aat II* geschnittenen pLitmus 28 ligiert (pT 78). Mit den Oligonukleotiden BVTk29 und BVTk30 und pT 78 als Matrize wurde durch die Pfu-Polymerase ein PCR-Produkt mit glatten Enden synthetisiert. Dieses wurde aufgereinigt (siehe 2.2.4.10) und religiert (pT 79). Der dadurch entstandene N-terminale HA-Tag wurde einer Sequenzkontrolle unterzogen (siehe 2.2.4.18).

Anschließend wurde wie in 2.2.4.16 beschrieben mit den Oligonukleotiden BVTk31 und BVTk32 eine Quik-Change<sup>TM</sup>-Site-Directed Mutagenesis durchgeführt, die zur Erzeugung der K44A-Mutation diente (pt 80). Auch diese Mutation wurde einer Sequenzkontrolle unterzogen.

Aus pT 79 bzw. pT 80 wurde mittels der Restriktionsenzyme *EcoR I* und *Aat II* das mutierte Fragment ausgeschnitten und in einen mit *EcoR I* und *Aat II* geschnittenen pT 75 ligiert (pT 82 bzw. pT 83). Aus pT 82 bzw. pT 83 wurde mit *EcoR I* und *Cla I* die gesamte vordere Hälfte des Dynamin-Gens herausgeschnitten, aus pT 74 mit *Cla I* und *Xba I* die hintere Hälfte. Beide Fragmente wurden in einer „3-Piece-Ligation“ in einen mit *EcoR I* und *Xba I* geschnittenen pTRE ligiert (pT 85 bzw. pT 86).

### 2.2.5.3 Klonierung des bovinen CD46 aus CRIB- und MDBK-Zellen

Plasmide:                pGEM-T (Fa. Promega)  
                              pTRE (Fa. Clontech)

Aus Gesamt-RNA von CRIB- und MDBK-Zellen wurde mittels RT-PCR (siehe 2.2.4.13) mit den Oligonukleotiden BVR5 (Plusstrang) und BVTk3 (Minusstrang) das bCD46 isoliert und in den pGEM-T ligiert (pT 12 bzw. pT 108). In diesem Plasmid besteht ein vorgefertigter Überhang eines Nukleotids Thymin, so daß PCR-Produkte, die durch die Taq-Polymerase synthetisiert wurden, mit ihrem Adenin-Überhang ohne weitere Modifikationen einligiert werden können.

In diesen Konstrukten (pT 12 bzw. pT 108) fanden die Sequenzanalysen statt. Zur Etablierung induzierbar exprimierender Zelllinien wurde aus pT 12 mit dem Restriktionsenzym *EcoR I* ein Fragment herausgeschnitten und in einen ebenfalls mit *EcoR I* geschnittenen pTRE ligiert. Ein Restriktionsverdau diente zur Kontrolle der richtigen Orientierung.

### 3.) Ergebnisse

#### 3.1.) Charakterisierung des Invasionsweges von BVDV

Der Invasionsweg von BVDV beginnt mit der Adsorption des Virions an den zellulären Rezeptor, dem bovinen CD46 (bCD46; (Maurer, 2002)). Der weitere Verlauf der Invasion ist bislang nicht näher untersucht. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von Pestiviren zu Flaviviren wurde bisher allgemein angenommen, daß BVDV nach der Adsorption via rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle gelangt.

##### 3.1.1.) Bedeutung der Endozytose für den Invasionsweg von BVDV

Behüllte Viren können nach der Rezeptorbindung mittels Oberflächenfusion oder rezeptorvermittelter Endozytose in die Wirtszelle eindringen. Welchen dieser beiden Invasionswege ein Virus benutzt, kann durch Blockade der Endozytose herausgefunden werden. Nur die Invasion von Viren, die endosomal in die Zelle eindringen, wird dadurch beeinflusst. Eine Möglichkeit, die Endozytose zu blockieren, ist die dominant-negative Mutante Dynamamin<sup>K44A</sup> (Dyn<sup>K44A</sup>) der GTPase Dynamamin-1. Der Effekt dieser dominant-negativen Mutante auf den Invasionsprozeß von BVDV wurde untersucht. Weiterhin wurde die Wirkung verschiedener chemischer und biophysikalischer Methoden zur Inhibition der Endozytose auf die BVDV Infektion bestimmt.

##### 3.1.1.1.) Abhängigkeit der BVDV Infektion von der GTPase Dynamamin-1

Fast alle Untersuchungen mit der dominant-negativen Mutante Dyn<sup>K44A</sup> wurden bislang entweder auf transient transfizierten Zellen oder aber mit HeLa Tet off-Zellen, die Dyn<sup>K44A</sup> oder Dyn<sup>wt</sup> induzierbar exprimierten (Damke et al., 1994) durchgeführt. Da diese bereits beschriebenen HeLa Tet off-Zellen resistent gegenüber BVDV sind und eine transiente Expression aufgrund niedriger Transfektionseffizienzen in MDBK-Zellen nicht möglich ist, mußte eine empfängliche Wirtszelllinie erzeugt werden, die Dyn<sup>K44A</sup> bzw. Dyn<sup>wt</sup> stabil

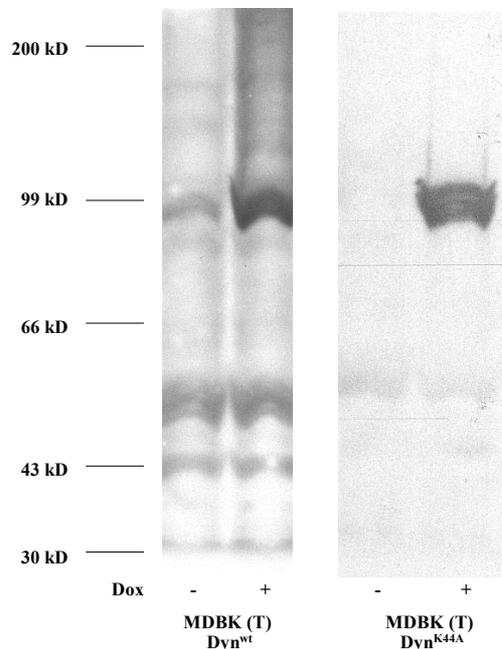
exprimiert. Um eine ausreichende Stabilität der Zelllinie zu gewährleisten, wurde ein induzierbares Expressionssystem (Tet on) in bovinen MDBK-Zellen gewählt (MDBK (T)). Diese MDBK (T)-Zellen synthetisieren ein Regulatorprotein, welches die induzierbare Expression des Zielgens ermöglicht.

Das Dynamin<sup>wt</sup>-Gen wurde per RT-PCR aus Dynamin<sup>wt</sup>-überexprimierenden HeLa-Zellen (Damke et al., 1994) isoliert. Mittels Quik-Change-Mutagenese wurde die Aminosäure K<sub>44</sub> durch Alanin ersetzt. Zusätzlich wurde per PCR ein Influenza Hämagglutinin (HA)-Tag (NH<sub>2</sub> - MEYDVPDYAH - COOH) eingefügt, mit dessen Hilfe eine immunologische Identifizierung der Fusionsproteine möglich war. Beide Veränderungen wurden per Sequenzanalyse kontrolliert.

Von beiden Varianten des Dynamin-1 (Dyn<sup>wt</sup> und Dyn<sup>K44A</sup>) wurden stabile, induzierbar exprimierende MDBK Tet on Zelllinien (MDBK (T)) hergestellt. Dazu wurde das Zielgen mittels Elektroporation in die MDBK (T)-Zellen transfiziert. Als dominant-selektierbarer Marker wurde ein Plasmid, das eine Puromycin-Resistenz kodiert, kotransfiziert. Die Zellen wurden bis auf Einzelzellebene verdünnt, mit Puromycin selektiert und dann zu Monolayerkulturen kultiviert. Die Dyn<sup>wt</sup> bzw. Dyn<sup>K44A</sup>-Expression der Zellklone wurde mittels eines Immunoblots mit einem mAk anti-HA untersucht (Abbildung 1). Induktion der MDBK (T) Dyn<sup>wt</sup>-Zellen bzw. MDBK (T) Dyn<sup>K44A</sup>-Zellen resultierte in einer deutlichen Expression des ca. 100kDa großen Proteins.

Zum Nachweis, daß die Expression von Dyn<sup>K44A</sup> tatsächlich die Endozytose der MDBK (T)-Zellen beeinflußt, wurden diese zunächst mit Sindbis-Virus (SinV) infiziert. SinV infiziert neben Zellen vieler anderer Spezies auch bovine Zellen und gilt als Prototyp endosomal aufgenommener Viren (DeTulleo et al., 1998). Die Anzahl der infizierten Zellen wurde immunhistochemisch bestimmt und zu der Anzahl auf MDBK-Zellen ins Verhältnis gesetzt. Diese dienten als Kontrolle und ihre Empfänglichkeit wurde auf 100% festgesetzt. Der

immunhistochemische Nachweis erfolgte mit einem gegen SinV gerichteten polyklonalen Kaninchenserum (G. Wengler, Gießen).



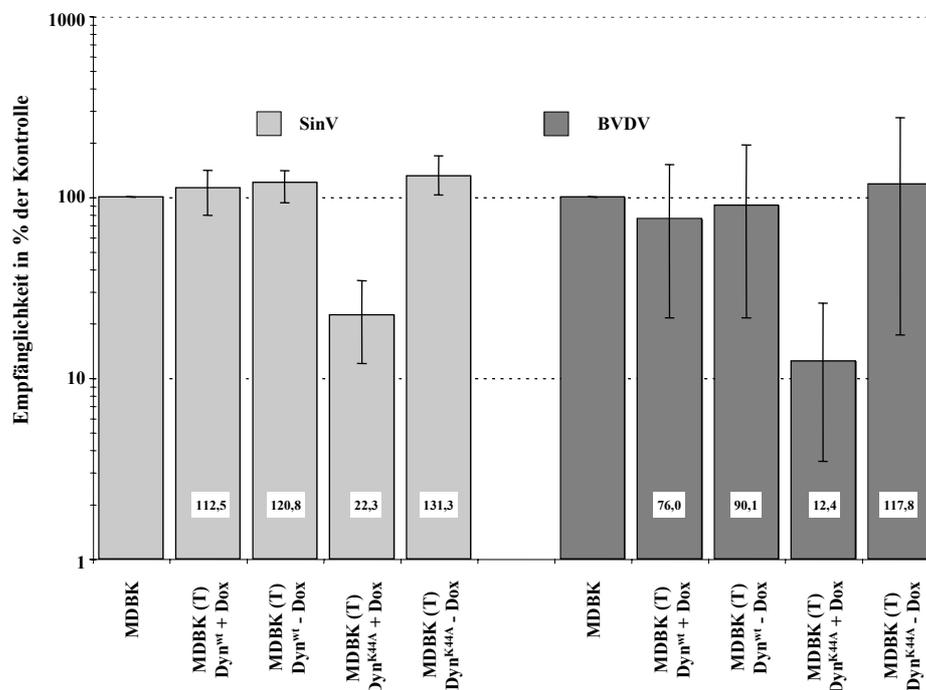
**Abbildung 1:** Nachweis der Expression von Dyn<sup>wt</sup> bzw. Dyn<sup>K44A</sup> in MDBK (T)-Zellen

Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden lysiert. Das Lysat von ca.  $1,4 \times 10^5$  Zellen wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dyn<sup>wt</sup> und Dyn<sup>K44A</sup> wurden nach Inkubation mit einem mAk anti-Hämagglutinin und einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

Bei MDBK (T) Dyn<sup>wt</sup>-Zellen war sowohl ohne Induktion (120,8%) als auch nach Induktion (112,5%) eine Empfänglichkeit ähnlich der Kontrolle zu beobachten (Abbildung 2). Dagegen resultierte eine Induktion der MDBK (T) Dyn<sup>K44A</sup>-Zellen in einer um den Faktor fünf reduzierten Empfänglichkeit (22,3%). In nicht induzierten MDBK (T) Dyn<sup>K44A</sup>-Zellen zeigte sich diese Reduktion nicht (131,3%). Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, daß in induzierten MDBK (T) Dyn<sup>K44A</sup>-Zellen tatsächlich die Endozytose gehemmt wurde.

Anschließend wurden MDBK-Zellen und MDBK (T) Dyn<sup>wt</sup>- und Dyn<sup>K44A</sup>-Zellen mit BVDV NADL infiziert. Immunhistochemisch wurde die Anzahl der infizierten Zellen bestimmt und daraus die Empfänglichkeit errechnet. Auch hier wurde die Empfänglichkeit der MDBK (T) Dyn<sup>K44A</sup> durch Induktion um einen Faktor acht im Vergleich zur Kontrolle reduziert (12,4%).

Ohne Induktion (117,8%) sowie in MDBK (T) Dyn<sup>wt</sup>-Zellen (-Dox 90,1%; +Dox 76%) zeigte sich eine kaum veränderte Empfänglichkeit gegenüber BVDV (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Die Invasion von SinV und BVDV NADL ist Dynamin-abhängig

Je  $5 \times 10^5$  Dyn<sup>wt</sup>- bzw. Dyn<sup>K44A</sup>-exprimierende MDBK (T)-Zellen wurden mit SinV und BVDV NADL infiziert. Als Kontrolle dienten MDBK-Zellen. Nach 16h wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch die Anzahl der infizierten Zellen bestimmt. Der Titer auf MDBK-Zellen wurde als 100% festgelegt. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

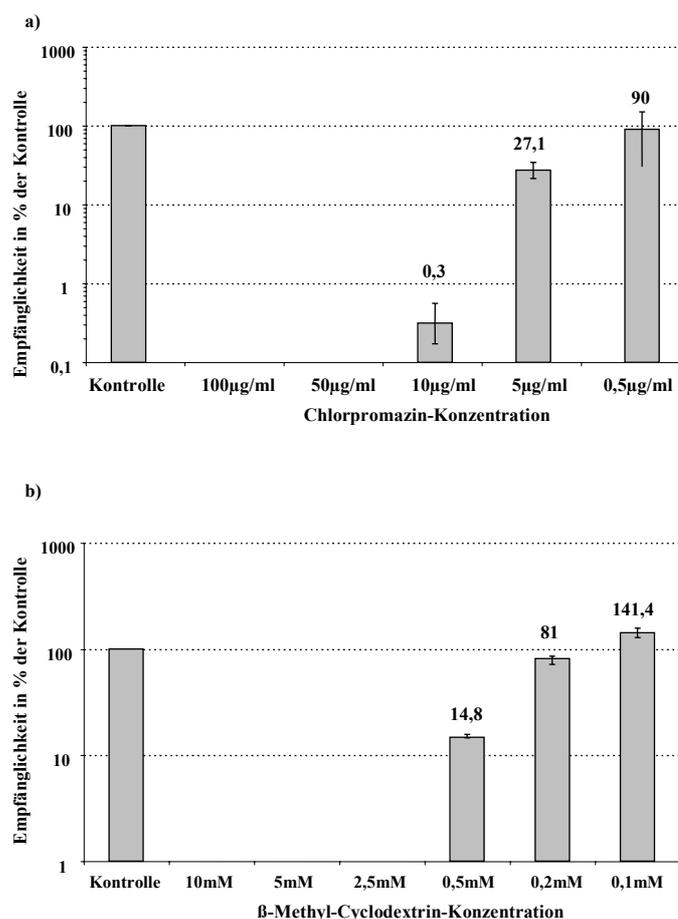
### 3.1.1.2.) Hemmung der Endozytose durch chemische und biophysikalische Methoden

Die Inhibition der BVDV Infektion durch Expression von Dyn<sup>K44A</sup> war ein guter Hinweis auf die Beteiligung der Endozytose an der Internalisierung des Virus. Zur weiteren Charakterisierung des Invasionsprozesses wurde der Einfluß verschiedener chemischer und biophysikalischer Inhibitionsmethoden der Endozytose auf die BVDV Infektion untersucht.

Chlorpromazin und  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin ( $\beta$ -MCD) wirken als potente Inhibitoren der Endozytose, indem sie die Abschnürung Clathrin-bedeckter Vesikel von der Zellmembran hemmen. In der Literatur wurden Endkonzentrationen von ca. 15-40  $\mu$ g/ml Chlorpromazin als ausreichend beschrieben, die Clathrin-abhängige Endozytose zu blockieren (Wang et al., 1993). Für  $\beta$ -MCD lagen die in der Literatur verwendeten Hemmkonzentrationen bei 10mM

(Rodal et al., 1999). Der Einfluß der beiden Inhibitoren auf die Invasion von BVDV wurde durch Infektion von MDBK-Zellen mit BVDV NADL in Abwesenheit bzw. Anwesenheit unterschiedlicher Endkonzentrationen Chlorpromazin bzw.  $\beta$ -MCD untersucht. Die Anzahl der infizierten Zellen wurde wiederum mittels immunhistochemischer Untersuchung bestimmt.

Schon  $0,5\mu\text{g/ml}$  Chlorpromazin resultierten in einer geringgradig reduzierten Empfänglichkeit der MDBK-Zellen (90%). Durch höhere Konzentrationen konnte die Empfänglichkeit der



**Abbildung 3:** Inhibitoren der Clathrin-abhängigen Endozytose hemmen die BVDV Infektion

Auf MDBK-Zellen wurde in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen (a) Chlorpromazin bzw. (b)  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin BVDV NADL titriert. 12h p.i wurden die Zellen fixiert und mittels immunhistochemischer Untersuchung die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. Die Empfänglichkeit unbehandelter MDBK-Zellen diente als Kontrolle und wurde auf 100% festgelegt. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

MDBK-Zellen gegenüber BVDV weiter gesenkt werden ( $5\mu\text{g/ml}$  – 27,1%) und bei  $10\mu\text{g/ml}$  Chlorpromazin war die BVDV Infektion fast vollständig (0,3%) blockiert (Abbildung 3a). In Konzentrationen  $\geq 50\mu\text{g/ml}$  verursachte Chlorpromazin einen deutlichen zytotoxischen Effekt. Endkonzentrationen  $\geq 2,5\text{mM}$   $\beta$ -MCD hemmten die Infektion von MDBK-Zellen mit BVDV NADL zu 99,9%. Dagegen betrug die Empfänglichkeit von MDBK-Zellen in Anwesenheit von  $0,5\text{mM}$   $\beta$ -MCD 14,8%. Bei  $0,2\text{mM}$   $\beta$ -MCD zeigte sich eine Empfänglichkeit von 81%. Niedrigere Konzentrationen zeigten keinen inhibitorischen Effekt (Abbildung 3b). Für beide Hemmstoffe wurde damit ein dosisabhängiger inhibitorischer Effekt auf die Infektion von BVDV nachgewiesen.

Es sind verschiedene biophysikalische Methoden bekannt, die spezifisch auf die Clathrin-abhängige Endozytose einwirken. Dazu gehören die intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Depletion, aber auch Inkubation in hyperosmolarem Medium, z.B. durch Zugabe von  $0,45\text{M}$  Saccharose (Bayer et al., 2001; Hansen, S. H. et al., 1993; Heuser et al., 1989; Madshus et al., 1987).

Der Einfluß einer intrazellulären  $\text{K}^+$ -Depletion auf die BVDV Infektion wurde untersucht, indem MDBK-Zellen nach einem hypotonen Schock in  $\text{K}^+$ -depletiertem Puffer bzw. Kontrollpuffer (+  $10\text{mM}$  KCl) mit BVDV NADL infiziert wurden. Die Anzahl infizierter Zellen wurde immunhistochemisch bestimmt und daraus wurde die Empfänglichkeit errechnet. Die intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Depletion resultierte in einer Empfänglichkeit von 14,8% im Vergleich zum  $\text{K}^+$ -haltigen Kontrollpuffer. In Kontrollversuchen konnte gezeigt werden, daß der  $\text{K}^+$ -depletierte Puffer keinen Einfluß auf die Infektiosität von Virionen hatte.

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluß hyperosmolares Medium auf die Infektion von MDBK-Zellen mit BVDV ausübt. Dazu wurden MDBK-Zellen mit BVDV NADL parallel in normalem Medium bzw. Medium +  $0,45\text{M}$  Saccharose infiziert. Die Anzahl infizierter Zellen wurde immunhistochemisch bestimmt und daraus wurde die Empfänglichkeit errechnet. Es zeigte sich, daß in hyperosmolarem Medium die BVDV Infektion zu 99,99% blockiert war,

wobei in Kontrollversuchen ein inaktivierender Einfluß des hyperosmolaren Mediums auf die Infektiosität von Virionen ausgeschlossen werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, daß für die Invasion von BVDV die Abschnürung von Vesikeln von der Zellmembran essentiell ist. Vermutlich handelt es sich bei diesem Penetrationsmechanismus, ähnlich wie bei verwandten Viren, um Clathrin-abhängige Endozytose.

### 3.1.2.) Säureabhängigkeit der BVDV Infektion

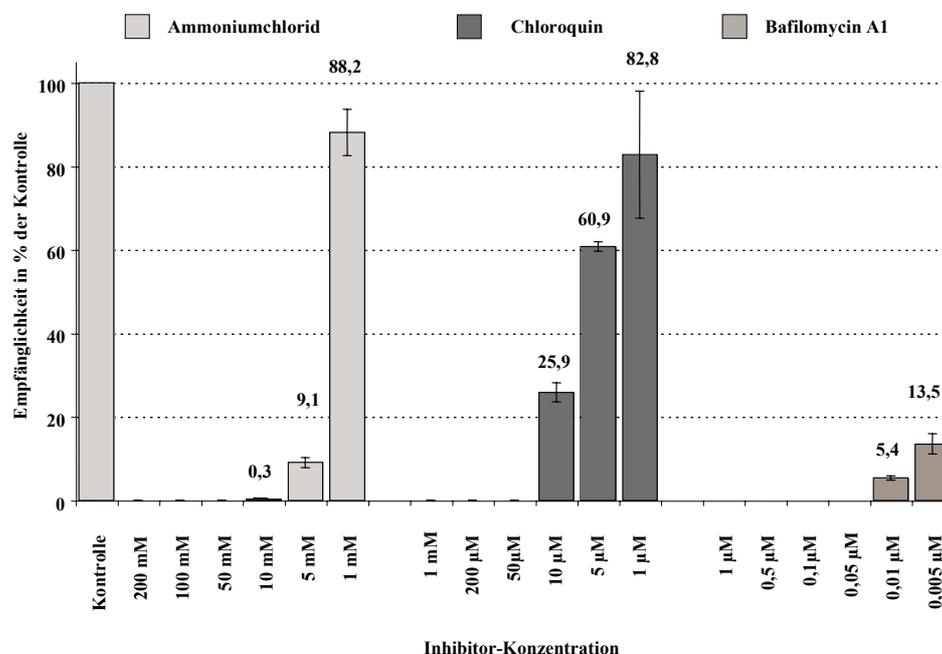
Während der physiologischen Reifung endosomaler Vesikel führt eine vakuoläre  $H^+$ -ATPase zu einer Azidifizierung des endosomalen Lumens. Bei den meisten behüllten Viren, die mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Wirtszelle gelangen, leitet diese Azidifizierung im Endosom eine Konformationsänderung der viralen Glykoproteine und damit eine Fusion des Virions mit der endosomalen Membran ein. Dadurch hängt die Invasion dieser Viren essentiell von einem endosomalen sauren Milieu ab. Für BVDV wurde diese pH-Abhängigkeit bislang nicht untersucht.

Eine solche Untersuchung ist möglich, indem die endosomale Azidifizierung gehemmt wird. Diese Hemmung kann durch die Zugabe lysosomotroper Reagenzien wie z.B. Ammoniumchlorid und Chloroquin erreicht werden (Cassell et al., 1984), welche die Ansäuerung im Endosom reversibel durch ihre Pufferwirkung verhindern. Dagegen wirkt Bafilomycin A1 als spezifischer Inhibitor der vakuolären  $H^+$ -ATPase und bedingt so eine irreversible Hemmung der endosomalen Ansäuerung (Perez et al., 1994).

Um den Einfluß von Ammoniumchlorid, Chloroquin und Bafilomycin A1 auf die BVDV Infektion zu untersuchen, wurden MDBK-Zellen in Abwesenheit bzw. Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen mit BVDV NADL infiziert. Die Anzahl infizierter Zellen wurde immunhistochemisch bestimmt und die Empfänglichkeit errechnet.

Konzentrationen  $\geq 50\text{mM}$  Ammoniumchlorid resultierten in einer vollständigen Inhibition der BVDV Infektion, 10mM Ammoniumchlorid resultierten in einer Empfänglichkeit von 0,3%. Bei geringerer Ammoniumchloridkonzentration zeigte sich eine Steigerung der Empfänglichkeit (Abbildung 4).

Für Chloroquin stellte sich das Ergebnis sehr ähnlich dar. Konzentrationen  $\geq 50\mu\text{M}$  Chloroquin inhibierten die BVDV Infektion vollständig. 10 $\mu\text{M}$  Chloroquin resultierten in einer Empfänglichkeit von 25,9% und geringere Chloroquin-Konzentrationen resultierten in einer höheren Empfänglichkeit gegenüber einer BVDV Infektion (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Inhibitoren der endosomalen Azidifizierung blockieren die BVDV Infektion

$1 \times 10^6$  MDBK-Zellen wurden mit  $2 \times 10^2$  infektiösen Einheiten BVDV NADL in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen Ammoniumchlorid, Chloroquin oder Bafilomycin A1 infiziert. 16h p.i. wurden die Zellen fixiert und mittels immunhistochemischer Untersuchung die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. Als Kontrolle, deren Empfänglichkeit auf 100% festgelegt wurde, dienten unbehandelte MDBK-Zellen. Die Experimente wurden als Zweifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

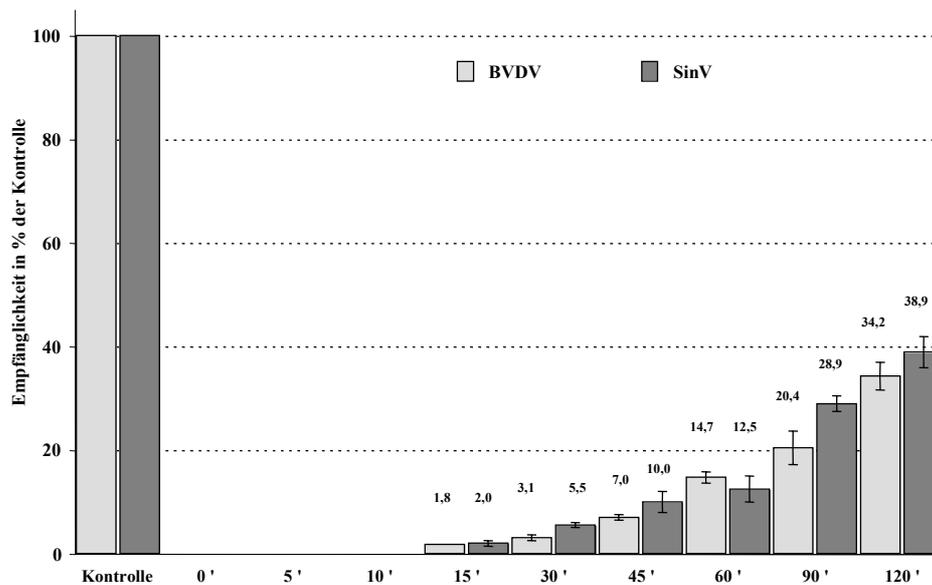
Bafilomycin A1 blockierte die BVDV Infektion bereits in Konzentrationen  $\geq 0,05\mu\text{M}$  vollständig. In Anwesenheit von  $0,01\mu\text{M}$  Bafilomycin A1 wurde eine Empfänglichkeit von 5,4% beobachtet und auch hier resultierten geringere Bafilomycin A1-Konzentrationen in

einer Steigerung der Empfänglichkeit (Abbildung 4). Alle drei Inhibitoren der endosomalen Azidifizierung blockierten die BVDV Infektion dosisabhängig.

### 3.1.3.) Invasionskinetik der BVDV und Sindbis-Virus Infektion auf MDBK-Zellen

Eine Möglichkeit, den Invasionsprozeß von BVDV näher zu charakterisieren, war die Erstellung einer Invasionskinetik von BVDV auf MDBK-Zellen. Diese Kinetik ist eine Eigenschaft, die von Zelle zu Zelle stark variieren kann und nur im Zusammenhang mit dem Versuchsaufbau zu beurteilen ist. Um Zellspezifität und Versuchsaufbau zu evaluieren, wurde parallel auch die Invasionskinetik von SinV auf MDBK-Zellen bestimmt. Ermöglicht wurde die Untersuchung der Invasionskinetik dadurch, daß Bafilomycin A1 in der Lage ist, die BVDV Infektion vollständig zu blockieren. Durch die Hemmung der endosomalen Azidifizierung wird ein sehr später Schritt des Invasionsprozesses verhindert, nämlich die Penetration der endosomalen Membran. BVDV NADL wurde an MDBK-Zellen bei 4°C adsorbiert und diese dann für wachsende Zeitabstände bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Bafilomycin A1 wurde dann die Infektion von Virionen blockiert, deren Penetration der endosomalen Membran noch nicht eingeleitet worden war. Die Anzahl infizierter Zellen wurde immunhistochemisch bestimmt, als Kontrolle dienten unbehandelte MDBK-Zellen. Innerhalb der ersten zehn Minuten nach der Temperaturanhebung auf 37°C war keine Penetration der endosomalen Membran zu beobachten (Abbildung 5). Ab 15min Inkubationszeit bei 37°C stieg die Anzahl der erfolgreich durch die endosomale Membran gelangten Virionen mit zunehmender Zeitdauer an. Nach 120min hatten ca. 35% der adsorbierten Virionen die endosomale Membran durchdrungen.

Für SinV ergab sich eine fast identische Invasionskinetik wie für BVDV (Abbildung 5).

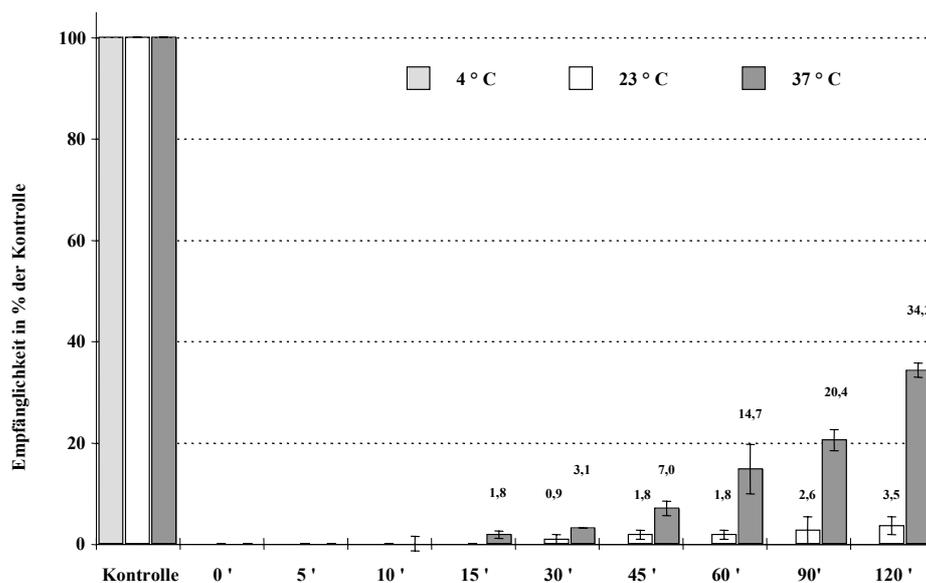


**Abbildung 5:** Invasionskinetik von BVDV und SinV auf MDBK-Zellen

$2 \times 10^2$  infektiöse Einheiten BVDV NADL bzw. SinV wurden an  $1 \times 10^6$  MDBK-Zellen für 1h bei  $4^\circ\text{C}$  adsorbiert. Die Zellen wurden mit DMEM gewaschen und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitspannen wurde Bafilomycin A1 in einer Endkonzentration von  $0,5\mu\text{M}$  zugegeben. 16h p.i. wurden die Zellen fixiert und mittels immunhistochemischer Untersuchung die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. Als Kontrolle, deren Empfänglichkeit auf 100% festgelegt wurde, dienten unbehandelte MDBK-Zellen. Die Experimente wurden als Zweifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Die Endozytose ist ein temperaturabhängiger und energieabhängiger Prozeß, der durch die Anforderungen an die Membranfluidität und freigesetzte Energie nur bei physiologischen Temperaturen stattfinden kann. Dagegen kann die Fusion zwischen Virusmembran und Zellmembran auch bei niedrigeren Temperaturen wie z.B. Raumtemperatur beobachtet werden (Corver et al., 2000). Die Invasionskinetik für BVDV wurde deshalb auch bei  $4^\circ\text{C}$  und  $23^\circ\text{C}$  untersucht.

Bei  $4^\circ\text{C}$  konnte innerhalb von 120min kein Virus die endosomale Membran durchdringen. Bei  $23^\circ\text{C}$  dagegen war nach 30min Inkubationszeit bei 0,9% der adsorbierten Virionen die Penetration der endosomalen Membran eingeleitet. Nach 120min betrug der Anteil der penetrierten Virionen ca. 3,5% (Abbildung 6). Damit konnte eine Temperaturabhängigkeit der BVDV Infektion gezeigt werden.



**Abbildung 6:** Die Infektion von BVDV auf MDBK-Zellen ist temperaturabhängig

$2 \times 10^2$  infektiöse Einheiten BVDV NADL wurden an  $1 \times 10^6$  MDBK-Zellen für 1h bei 4°C adsorbiert. Die Zellen wurden mit DMEM gewaschen und bei 4°C, 23°C und 37°C inkubiert. Nach unterschiedlich langer Inkubation wurde Bafilomycin A1 in einer Endkonzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  zugegeben. 16h p.i. wurden die Zellen fixiert und mittels immunhistochemischer Untersuchung die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. Als Kontrolle, deren Empfänglichkeit auf 100% festgelegt wurde, dienten unbehandelte MDBK-Zellen. Die Experimente wurden als Zweifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

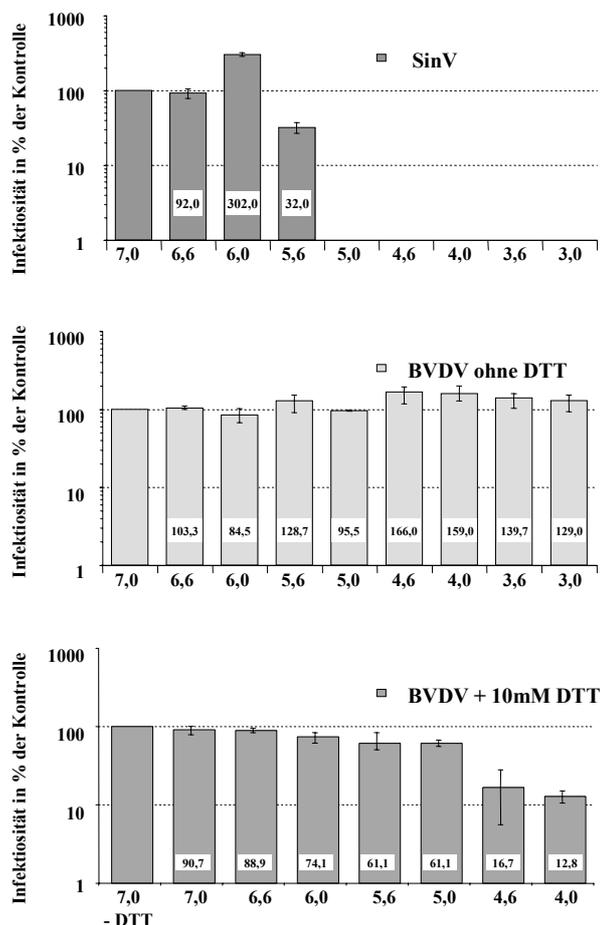
BVDV wird endosomal in die Wirtszelle aufgenommen. Während dieser Endozytose ist das Virion auf eine endosomale Azidifizierung angewiesen, wie sie für die Clathrin-abhängige Endozytose beschrieben ist. Kombiniert mit den Ergebnissen der chemischen und biophysikalischen Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose spricht das für eine Internalisierung von BVDV mittels Clathrin-abhängiger Endozytose.

#### 3.1.4.) Metastabilität von BVDV

Bei vielen behüllten Viren resultiert die für eine Fusion essentielle Konformationsänderung der viralen Glykoproteine aus der endosomalen Azidifizierung während der physiologischen Endosomenreifung. Dabei führt jede Unterschreitung eines Schwellenwertes (z.B. pH 6,0) im extrazellulären Raum zur angesprochenen Konformationsänderung. Dieser Zustand wird als Metastabilität bezeichnet. Niedrige pH-Werte inaktivieren diese Viren. Die geänderte

Konformation der viralen Glykoproteine verhindert die Rezeptorbindung, das Virion ist dadurch nicht mehr infektiös.

Es wurde berichtet, daß BVDV sauren pH-Werten gegenüber resistent ist (Depner et al., 1992), was in gewissem Widerspruch zu den Daten über die pH-Abhängigkeit der BVDV Infektion steht. Darum wurde die pH-Stabilität von BVDV NADL im direkten Vergleich mit der von SinV untersucht. Dazu wurde Virus unterschiedlichen pH-Werten bei 23°C ausgesetzt und auf MDBK-Zellen titriert. SinV wurde ab einem pH von 5,0 vollständig inaktiviert. Im Gegensatz dazu behielt BVDV NADL selbst nach Behandlung mit pH-Werten <3,6 weitgehend seine Infektiosität (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Die Säureresistenz von BVDV ist sensitiv gegen Reduktion mit DTT

$2 \times 10^6$  infektiöse Einheiten Sindbis-Virus bzw. BVDV NADL wurden in Ab- bzw. Anwesenheit (nur BVDV NADL) von 10mM DTT in einem Phosphat-Citrat-Puffer des betreffenden pH-Wertes für 15min bei 23°C inkubiert. Anschließend wurde das Virus seriell in DMEM verdünnt und auf MDBK-Zellen titriert. Nach Fixierung 16h p.i. wurde immunhistochemisch die Anzahl der infizierten Zellen bestimmt und der Virustiter errechnet. Als Kontrolle, deren Infektiosität auf 100% festgelegt wurde, diente das betreffende Virus nach Inkubation bei pH 7,0 ohne DTT. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Die zusätzliche Protonierung der viralen Glykoproteine durch ein saures Milieu reichte nicht aus, eine Konformationsänderung zu induzieren. Im Gegensatz zu SinV tritt BVDV extrazellulär also offensichtlich nicht in einem metastabilen Zustand auf.

Als Stabilisierungsfaktor könnten die inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken dienen, die bei Pestiviren besonders zahlreich ausgebildet werden. Jedes der drei Glykoproteine liegt als durch Disulfidbrücken vernetztes Homo- oder Heterodimer vor. Um zu überprüfen, ob diese Disulfidbrücken für die Stabilisierung der extrazellulären Virionen eine Rolle spielen, wurde die pH-Stabilität von BVDV NADL auch in Anwesenheit von reduzierenden Substanzen untersucht.

Nach Behandlung von Virus mit DTT war eine 7–10fache Reduktion der Infektiosität bei pH-Werten  $<5,0$  zu beobachten (Abbildung 7). Diese Titerreduktion trat nur bei Kombination von niedrigen pH-Werten und Reduktion auf, so daß die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken tatsächlich an der Stabilisierung des extrazellulären Zustandes von BVDV beteiligt zu sein scheinen.

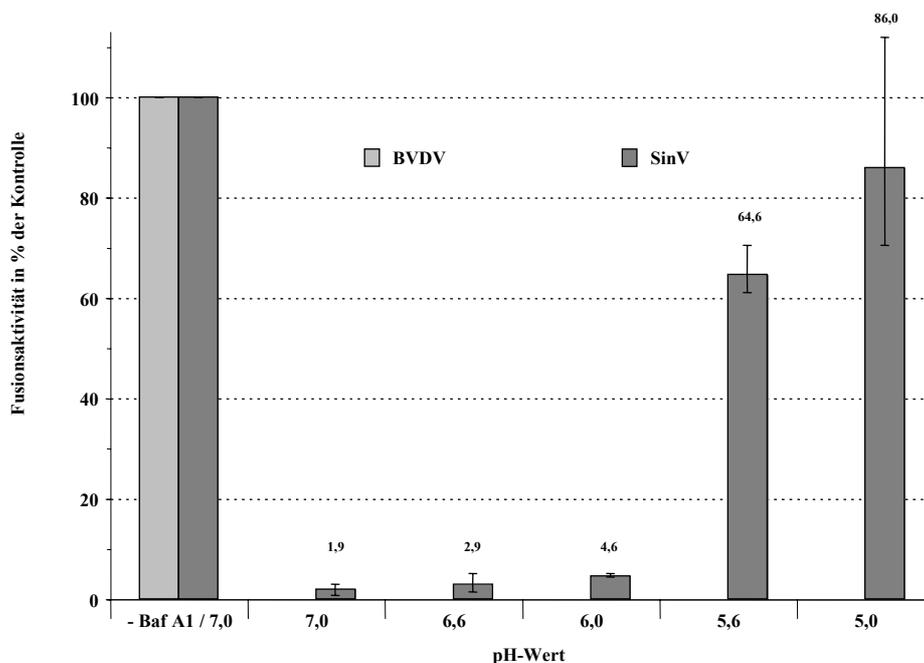
Der metastabile Zustand anderer behüllter Viren wie z.B. Alphaviren erlaubt eine Simulation der endosomalen, pH-vermittelten Fusion an der Zellmembran („fusion from without“). Bei diesem Versuch werden Virionen an die Zellmembran adsorbiert und durch kurze Exposition der Zellen mit pH 5,6 wird die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran induziert (Helenius et al., 1980; White, J. et al., 1980). Die endosomale Fusion wird anschließend durch Hemmung der endosomalen Azidifizierung blockiert. Durch Bestimmung der Anzahl der infizierten Zellen kann die Effizienz der „fusion from without“ immunhistochemisch bestimmt werden.

#### 3.1.4.1.) „fusion from without“ von BVDV und Sindbis-Virus auf MDBK-Zellen

Die „fusion from without“ ist nicht auf allen Zellen möglich (Marsh et al., 1997). Aufgrund dieser Zellspezifität der „fusion from without“ wurde die Untersuchung parallel mit BVDV NADL und mit SinV durchgeführt, welches mittels „fusion from without“ effektiv

Wirtszellen infizieren kann. Das betreffende Virus wurde an MDBK-Zellen adsorbiert. Anschließend wurden diese 2min verschiedenen pH-Werten bei 37°C ausgesetzt. Die endosomale Aufnahme wurde mittels Bafilomycin A1-Zugabe blockiert und 14h p.i. wurde die Anzahl infizierter Zellen immunhistochemisch bestimmt.

Bereits bei pH 7,0 zeigte sich eine geringe Fusionsaktivität von SinV (1,9%), die bei Absenkung des pH-Wertes anstieg. Bei pH 5,6 fusionierten schon über die Hälfte aller adsorbierten Virionen an der Zellmembran (Abbildung 8). Dies zeigte, daß bei MDBK-Zellen die „fusion from without“ möglich ist. Unter gleichen Bedingungen konnte für BVDV keine „fusion from without“ beobachtet werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** BVDV kann MDBK-Zellen nicht mittels „fusion from without“ infizieren

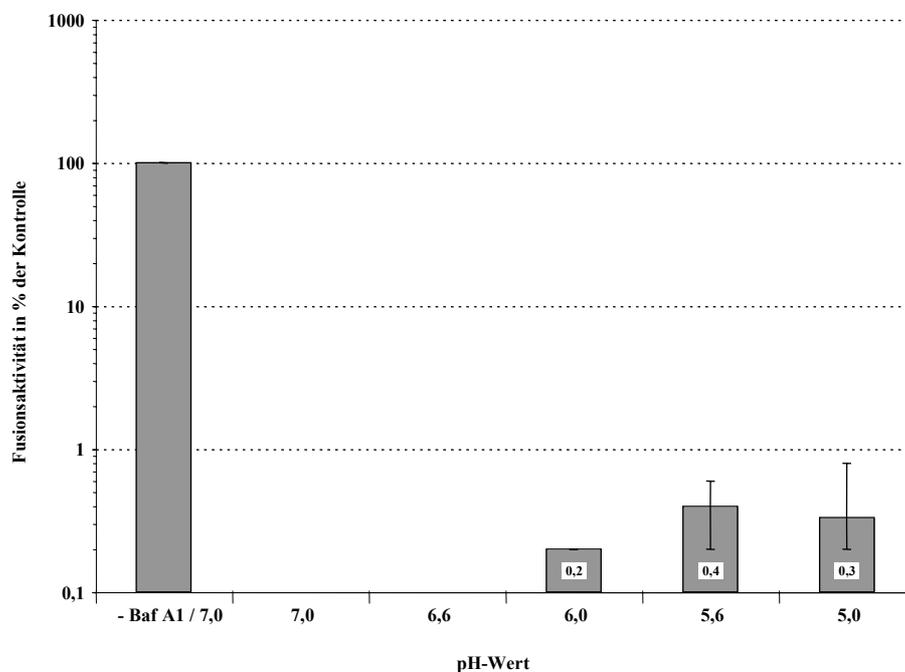
$5 \times 10^3$  infektiöse Einheiten BVDV NADL bzw. SinV wurden an  $1 \times 10^6$  MDBK-Zellen 1h bei 4°C adsorbiert. Mit 37°C warmem Puffer unterschiedlicher pH-Werte wurde 2min bei 37°C inkubiert und die Puffer wurden anschließend durch DMEM + 0,2µM Bafilomycin A1 ersetzt. 14h p.i. wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. MDBK-Zellen, die mit pH 7,0 gewaschen und ohne Bafilomycin A1 inkubiert wurden, dienten als Kontrolle, deren Empfänglichkeit auf 100% festgelegt wurde. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

### 3.1.4.2.) „fusion from without“ von BVDV in Anwesenheit reduzierender Substanzen

Die „fusion from without“ von BVDV konnte nicht durch einen sauren pH-Wert herbeigeführt werden. Falls eine stabilisierende Wirkung von den Disulfidbrücken ausging,

könnte die Behandlung mit DTT diese so weit abschwächen, daß eine Fusion an der Zellmembran möglich werden sollte. Aus diesem Grund wurde die „fusion from without“ mit Puffern durchgeführt, die neben dem angegebenen pH-Wert auch 10mM DTT enthielten. 14h p.i. wurde die Anzahl infizierter Zellen immunhistochemisch bestimmt.

Tatsächlich konnten nach kombinierter Behandlung mit niedrigem pH und 10mM DTT infizierte Zellen detektiert werden, während weder niedriger pH-Wert noch DTT allein zu einer Fusion führten. Die Fusionsaktivität lag von pH 6,0–5,0 unter 0,5% (Abbildung 9). Niedrigere pH-Werte wirkten in Verbindung mit 10mM DTT sehr zelltoxisch.



**Abbildung 9:** In saurem Milieu ermöglicht eine Reduktion mit DTT eine „fusion from without“ von BVDV auf MDBK-Zellen

$5 \times 10^3$  infektiöse Einheiten BVDV NADL wurden an  $1 \times 10^6$  MDBK-Zellen 1h bei 4°C adsorbiert. Mit 37°C warmem Puffer unterschiedlicher pH-Werte + 10mM DTT wurde 2min bei 37°C gewaschen und die Puffer wurden anschließend durch DMEM + 0,2µM Bafilomycin A1 ersetzt. 14h p.i. wurden die Zellen fixiert und durch immunhistochemische Untersuchung die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. MDBK-Zellen, die mit pH 7,0 + 10mM DTT gewaschen und ohne Bafilomycin A1 inkubiert wurden, dienten als Kontrolle, deren Empfänglichkeit auf 100% festgelegt wurde. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß BVDV nach der Internalisierung mittels Clathrin-abhängiger Endozytose auf ein saures endosomales Milieu angewiesen ist. Gleichzeitig scheint neben der Azidifizierung aber noch mindestens ein weiterer Faktor an der Initiation der Konformationsänderung beteiligt zu sein, die zur Fusion der viralen mit der

endosomalen Membran führt. Dies könnten die im Virion vorhandenen kovalenten Disulfidbrücken sein, deren Reduktion zu einem metastabilen Zustand führt. Anschließend kann die pH-abhängige Fusion eingeleitet werden.

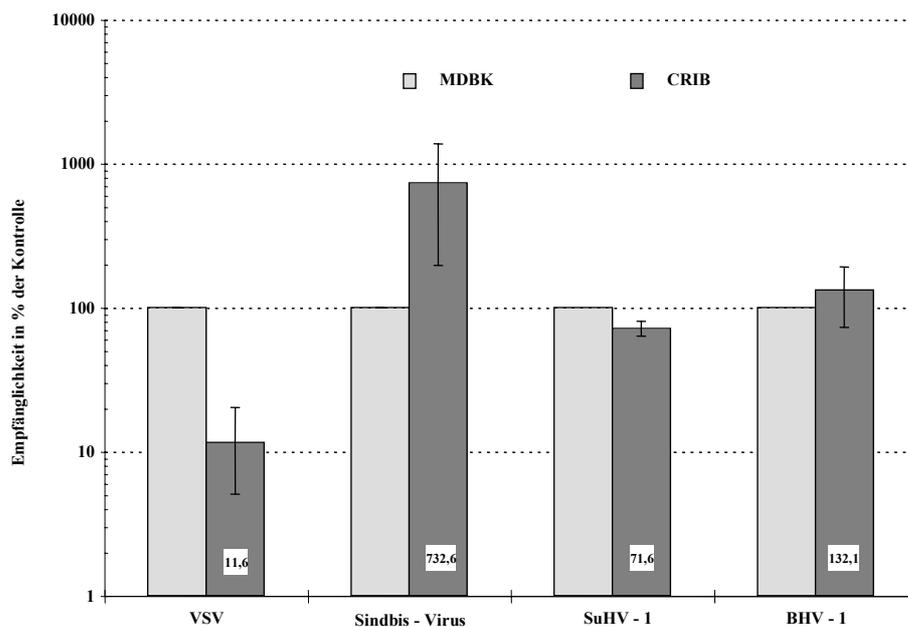
### 3.2.) Charakterisierung der CRIB-Zellen

CRIB-Zellen entstanden vermutlich durch Mutation während einer Infektion mit dem zytopathogenen BVDV-Stamm „Singer“. Sie wurden als spezifisch resistent gegen Pestiviren beschrieben (Flores et al., 1995; Flores et al., 1996). Der Defekt der CRIB-Zellen konnte im Invasionsprozeß lokalisiert werden, eine genauere Charakterisierung liegt jedoch bislang nicht vor. Aufgrund von gesicherten Erkenntnissen über den zellulären Rezeptor von BVDV (bCD46) und der detaillierten Untersuchungen dieser Arbeit bezüglich des Invasionsweges, stellte die Charakterisierung des Defekts der CRIB-Zellen vielversprechende Erkenntnisse über die Invasion von Pestiviren in Aussicht. Ziel der Untersuchung war die Identifizierung der für die Invasion von BVDV notwendigen Schritte, die in CRIB-Zellen blockiert sind.

#### 3.2.1.) Bestätigung des Phänotyps der CRIB-Zellen

Zur Bestätigung des beschriebenen Phänotyps wurden CRIB-Zellen und MDBK-Zellen auf ihre Empfänglichkeit gegenüber drei Stämmen unterschiedlicher Pestiviruspezies überprüft. Zu diesem Zweck wurden parallel beide Zelllinien mit den Pestiviren BDV X818, BVDV 519 und „Giraffe“ infiziert und immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper Code 4 (gegen pestivirales NS 3 gerichtet) ausgewertet. Während bei der Infektion mit BDV X818 und BVDV 519 keine infizierten CRIB-Zellen beobachtet werden konnten, lag die Empfänglichkeit der CRIB-Zellen gegenüber dem „Giraffe“-Isolat bei  $\approx 0,0004\%$  der Empfänglichkeit von MDBK-Zellen.

Auch die Empfänglichkeit von CRIB- und MDBK-Zellen gegenüber anderen Viren, die bovine Zellen infizieren können, wurde bestimmt. Als Viren, die an der Zelloberfläche fusionieren, wurden das bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) und das porcine Herpesvirus 1 (SuHV-1) ausgewählt. Parallel wurde auf MDBK- und CRIB-Zellen Virus titriert und im Plaquetest ausgewertet. CRIB-Zellen zeigten im Vergleich zu MDBK-Zellen weder für SuHV-1 noch für BHV-1 eine deutlich veränderte Empfänglichkeit (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Empfänglichkeit der CRIB-Zellen für VSV, SinV, SuHV-1 und BHV-1

VSV, SinV, SuHV-1 und BHV-1 wurden auf  $2 \times 10^6$  CRIB- und MDBK-Zellen in 10er Verdünnungsreihen titriert. Nach 14h (SinV) wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch die Anzahl infizierter Foci bestimmt. Die Infektion mit VSV, SuHV-1 und BHV-1 wurde mit Methylzellulose-Medium überschichtet und nach 72h fixiert. Die Zellen wurden mit 1% Kristallviolett-Lösung gefärbt und die gebildeten Plaques ausgezählt. Die Titer auf MDBK-Zellen wurden als Kontrolle auf 100% festgelegt. Die Experimente wurden als Zweifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Als Viren, von denen bekannt ist, daß sie mittels Endozytose in die Zelle gelangen, wurden das Virus der Vesikulären Stomatitis (VSV, Rhabdovirus) und das SinV (Alphavirus) ausgewählt. Virus wurde parallel auf CRIB- und MDBK-Zellen titriert und im Plaquetest (VSV) bzw. durch immunhistochemische Färbung (SinV) mit einem gegen SinV Protein gerichteten polyklonalen Kaninchenserum (G.Wengler, Gießen) ausgewertet. Während sich im Vergleich zu MDBK-Zellen bei CRIB-Zellen eine um den Faktor acht reduzierte Empfänglichkeit gegenüber VSV zeigte, war die Empfänglichkeit der CRIB-Zellen gegenüber SinV um den Faktor sieben erhöht (Abbildung 10).

Um nachzuweisen, daß der Phänotyp der CRIB-Zellen sich nur auf den Invasionsprozeß, nicht aber auf die virale Replikation auswirkt, wurde die spezifische Infektiosität von BVDV NCP-7-RNA in CRIB- und MDBK-Zellen bestimmt. Dazu wurde mittels Elektroporation eine Verdünnungsreihe eines in-vitro-Transkriptes parallel in CRIB- und MDBK-Zellen

transfiziert und immunhistochemisch 14h p.t. die Anzahl der transfizierten Zellen bestimmt. Diese Anzahl wurde zur Menge transfizierter RNA ins Verhältnis gesetzt. Für beide Zelllinien konnte eine spezifische Infektiosität von  $6-7 \times 10^4$  infizierten Zellen/ $\mu\text{g}$  elektroporierter RNA nachgewiesen werden.

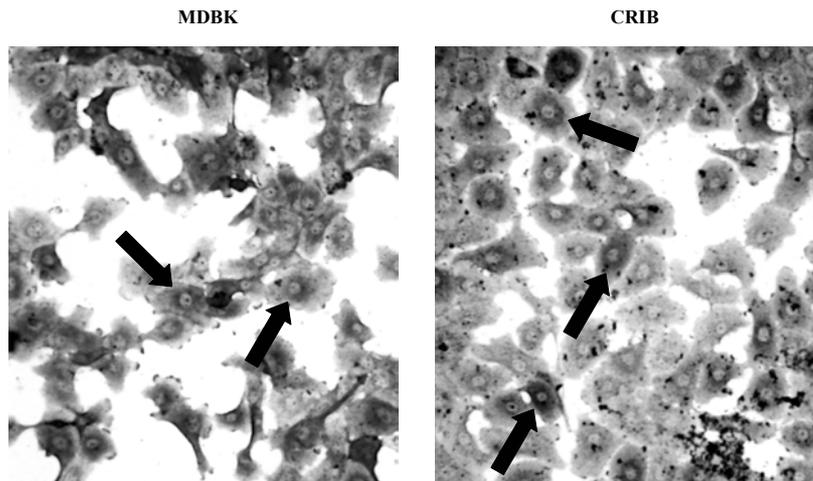
Zur Bestimmung der Virusfreisetzung aus CRIB- und MDBK-Zellen wurden beide Zelllinien mittels Elektroporation mit je  $1 \mu\text{g}$  desselben in-vitro-Transskriptes von BVDV NCP-7 transfiziert. Der Überstand wurde nach 18h abgenommen und auf MDBK-Zellen titriert. Im Gegensatz zu MDBK-Zellen unterbleibt bei CRIB-Zellen die Ausbreitung von Zelle zu Zelle, weshalb die Virusfreisetzung schon zu diesem frühen Zeitpunkt beurteilt werden mußte. Nach 18h enthielt der Überstand aus MDBK-Zellen ca.  $9 \times 10^3$  PfU/ml, der Überstand aus CRIB-Zellen ca.  $13 \times 10^3$  PfU/ml.

### 3.2.2.) Bedeutung des bovinen CD46 für die Resistenz der CRIB-Zellen

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten, daß die für den Phänotyp der CRIB-Zellen verantwortliche Mutation spezifisch die Invasion von Pestiviren blockiert. Ausgehend von der kürzlich erfolgten Identifizierung von bovinem CD46 als zellulärem Rezeptor für BVDV (Maurer, 2002) und den experimentellen Evidenzen in Bezug auf den Invasionsweg wurde eine genauere Charakterisierung der CRIB-Zellen möglich.

#### 3.2.2.1.) Nachweis von bovinem CD46 in CRIB-Zellen

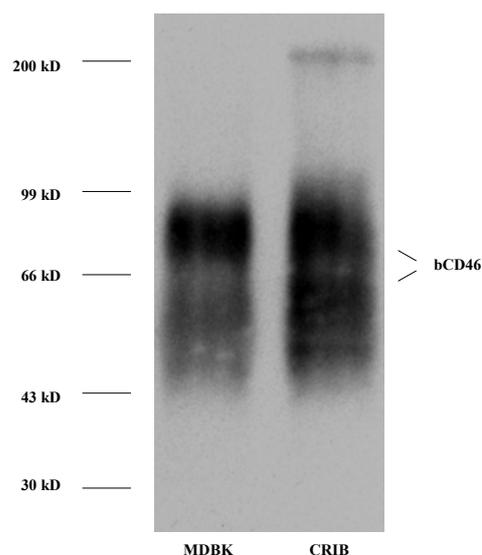
Zunächst konnte die Anwesenheit von bCD46 auf CRIB-Zellen durch mAk's anti-bCD46 immunhistochemisch belegt werden (Abbildung 11). Zur weiteren Charakterisierung des bCD46<sub>CRIB</sub> erfolgte eine Immunoblotanalyse. Hierfür wurden Zellysate einer gleichen Anzahl von CRIB- und MDBK-Zellen in einer SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert, mittels des mAk's BVD/CA 26 markiert und durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.



**Abbildung 11:** Immunhistochemischer Nachweis von bCD46 auf CRIB- und MDBK-Zellen

$3 \times 10^5$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden ausgesät, über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend fixiert. Der Nachweis von bCD46 erfolgte mittels mAk's anti-bCD46 in der indirekten immunhistochemischen Untersuchung. Die Pfeile zeigen die Membranfärbung bei besonders ausgeprägt gefärbten Zellen.

Im MDBK Zellysate läßt sich eindeutig das charakteristische Muster von zwei Banden im Bereich von 50-60kDa und 80-90kDa erkennen (Abbildung 12). Diese Banden werden von unterschiedlichen Spleißvarianten verursacht, die sich vor allem durch den Grad der Glykosilierung unterscheiden.



**Abbildung 12:** Nachweis der bCD46-Expression in CRIB-Zellen mittels Western Blot Analyse

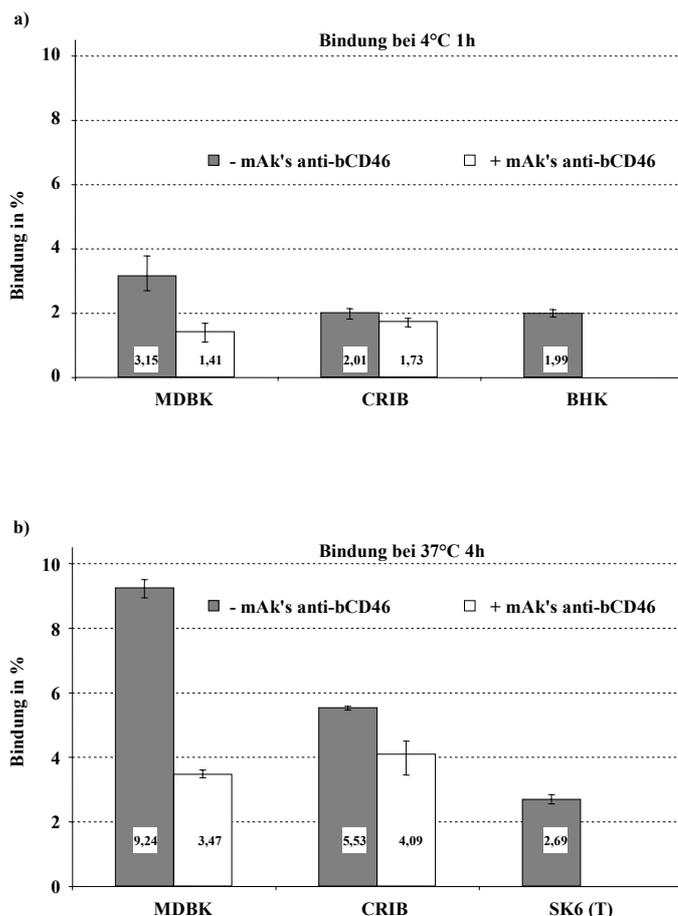
$2 \times 10^6$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden lysiert. Das Lysat von ca.  $1,4 \times 10^5$  Zellen wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das bovine CD46 wurde nach Inkubation mit dem mAk BVD/CA 26 und einem Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Sekundäntikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

Auch CRIB-Zellen zeigten im Immunoblot das beschriebene Muster. Da für den Immunoblot analoge Zellzahlen bzw. Probenmengen eingesetzt wurden, war anzunehmen, daß auch das Expressionsniveau des bCD46 in beiden Zelllinien ähnlich war.

#### 3.2.2.2.) Nachweis der Bindung von [<sup>3</sup>H]-BVDV an CRIB-Zellen

Da auf CRIB-Zellen offensichtlich bCD46 exprimiert wurde, sollte im nächsten Schritt eine genaue Quantifizierung der Virusbindung an CRIB-Zellen durchgeführt werden. Dazu wurde die Adsorption von [<sup>3</sup>H]-Uridin markiertem BVDV NADL bei 4°C für 1h an CRIB- und MDBK-Zellen bestimmt. Bei MDBK-Zellen zeigte sich eine Virusbindung von 3,15%, die durch Präinkubation mit mAk's anti-bCD46 auf 1,41% reduziert werden konnte. Auf BHK-Zellen, die als Negativkontrolle dienten, zeigte sich eine Bindung von 1,99%. Bei CRIB-Zellen konnte eine Bindung von 2,01% gemessen werden und durch Präinkubation mit mAk's anti-bCD46 wurde diese Bindung auf 1,73% reduziert (Abbildung 13a).

Um zu verdeutlichen, daß es sich tatsächlich um eine bCD46-spezifische Virusbindung handelte, wurden Zeitdauer und Temperatur der Virusbindung verändert. Ein weiterer Bindungsversuch wurde durchgeführt, bei dem die Adsorption bei 37°C für 4h durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen konnte bei den MDBK-Zellen 9,24% Bindung beobachtet werden, durch Präinkubation mit mAk's wurde diese Bindung auf 3,47% reduziert. Die SK6 (T)-Zellen, die als Negativkontrolle dienten, wiesen 2,69% Virusbindung auf. CRIB-Zellen zeigten unter diesen Bedingungen 5,53% Bindung, die durch Präinkubation mit mAk's auf 4,09% reduziert wurde (Abbildung 13b).



**Abbildung 13:** Bindung von [<sup>3</sup>H]-markiertem BVDV NADL an CRIB-Zellen

CRIB-Zellen, MDBK-Zellen und als Kontrolle dienende BHK- bzw. SK6 (T)-Zellen wurden (a) 1h bei 4°C bzw. (b) 4h bei 37°C mit [<sup>3</sup>H]-BVDV inkubiert. CRIB- und MDBK-Zellen wurden mit bzw. ohne Präinkubation mit mAk's anti-bCD46 auf Bindung getestet. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Diese Daten wurden einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Einflußfaktoren Zelllinie und Präsenz von mAk's anti-bCD46 unterzogen. Zusätzlich wurde für jede Zelllinie bei 4°C und 37°C separat ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, um zu prüfen, ob sich statistisch die Signifikanz der bCD46-spezifischen Bindung nachweisen ließ.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab sowohl bei 4°C ( $p = 0,0057$ ) als auch bei 37°C ( $p < 0,0001$ ), daß die Wirkung der mAk's anti-bCD46 auf den beiden untersuchten Zelllinien statistisch signifikant unterschiedlich war. Die inhibitorische Wirkung der mAk's war also auf MDBK-Zellen statistisch signifikant höher als auf CRIB-Zellen. Der t-Test für unabhängige Stichproben zeigte, daß die Bindung von BVDV NADL auf MDBK-Zellen durch mAk's anti-bCD46 mit  $p = 0,009$  (4°C) bzw.  $p < 0,0001$  (37°C) signifikant inhibiert wurde. Für die

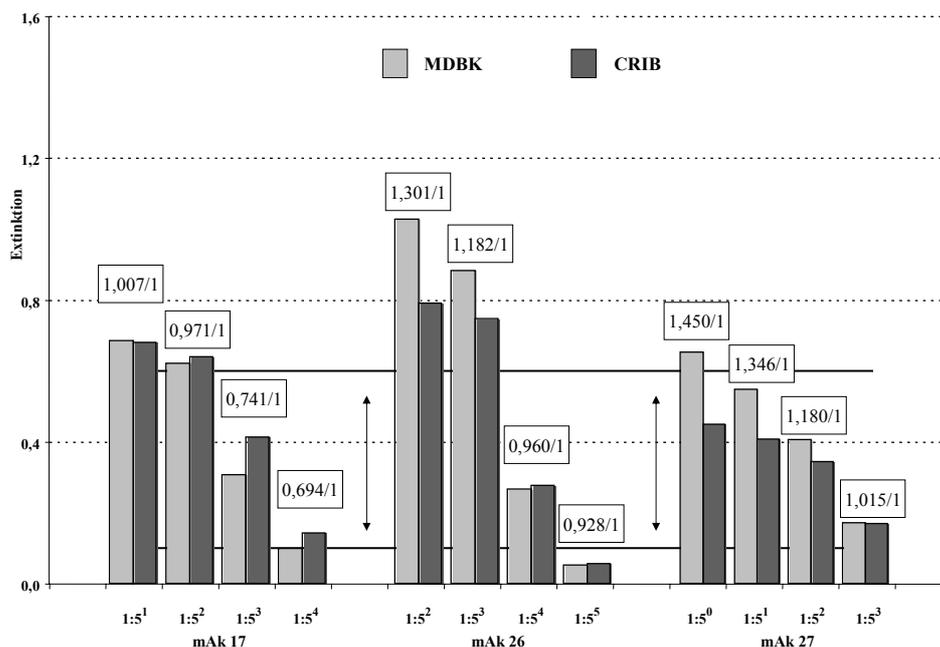
Bindung von BVDV NADL auf CRIB-Zellen konnte bei 4°C keine signifikante Wirkung der mAk's anti-bCD46 festgestellt werden. Bei 37°C dagegen wurde die Bindung von BVDV durch Präinkubation mit mAk's mit  $p = 0,0463$  signifikant inhibiert. Insgesamt zeigte die statistische Auswertung eine im Vergleich zu MDBK-Zellen reduzierte, aber nachweisbare bCD46-spezifische Bindung auf CRIB-Zellen.

### 3.2.2.3.) Quantifizierung des oberflächenständigen bovinen CD46 in CRIB-Zellen

Aufgrund der reduzierten bCD46-spezifischen Bindung mußte überprüft werden, ob es zwischen CRIB- und MDBK-Zellen Unterschiede in der Oberflächenexpression von bCD46 gab. CRIB- und MDBK-Zellen wurden diesbezüglich mit einem indirekten zellulären Oberflächen-ELISA untersucht. Hierfür wurden vitale Zellen mit einer Verdünnungsreihe verschiedener mAk's anti-bCD46 inkubiert, gewaschen und anschließend fixiert. Danach wurde mittels eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers und eines löslichen Substrats die Quantifizierung der oberflächenständigen bCD46-Moleküle über eine Extinktionsmessung der Farbreaktion vorgenommen.

Ausgewertet wurden nur die Verdünnungen, die im linearen Meßbereich des ELISA-Readers lagen (Abbildung 14). Für diese Verdünnungen wurde jeweils das Verhältnis zwischen den Extinktionswerten auf MDBK- und CRIB-Zellen errechnet. Beispielsweise bedeutete also ein Verhältnis von 1,007/1, daß auf MDBK-Zellen geringfügig mehr (1,007-fach) oberflächenexponiertes bCD46 exprimiert wurde als auf CRIB-Zellen.

Trotz leichter Schwankungen bei den einzelnen mAk's konnte zusammenfassend das bCD46 auf der Plasmamembran von CRIB- und MDBK-Zellen in fast identischen Mengen nachgewiesen werden.



**Abbildung 14:** Quantifizierung von bCD46 auf CRIB- und MDBK-Zellen durch Oberflächen-ELISA

$1 \times 10^6$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden 40min bei 4°C mit unterschiedlichen mAk's anti-bCD46 markiert. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper und einem löslichen Substrat inkubiert. Die Extinktion wurde photometrisch quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, bei denen keine mAk's anti-bCD46 zugegeben wurden. Diese Negativkontrolle wurde direkt von der Extinktion der Proben abgezogen. Der lineare Meßbereich des ELISA-Readers (Extinktion von ca. 0,1-0,6) wurde durch Pfeile deutlich gemacht.

#### 3.2.2.4.) Funktionelle Charakterisierung des bovinen CD46<sub>CRIB</sub>

Es wurde gezeigt, daß bCD46 in CRIB-Zellen präsent und auf der Zellmembran exponiert ist. Da gleichzeitig jedoch die Virusbindung im Vergleich zu MDBK-Zellen deutlich reduziert war, wurde eine funktionelle Charakterisierung des Moleküls durchgeführt. Ein zellulärer Rezeptor ist durch die beiden Funktionen 1) Virusbindung und 2) Beteiligung an der Infektion charakterisiert. Die Untersuchung dieser beiden Funktionen sollte zeigen, ob bCD46<sub>CRIB</sub> in der Lage ist, als zellulärer Rezeptor für BVDV zu dienen.

Das bCD46 wurde mittels RT-PCR aus CRIB- und MDBK-Zellen isoliert und in einen Sequenziervektor kloniert. Anschließend wurden die Sequenzen des bCD46 aus beiden Zelllinien analysiert. Dabei zeigte sich, daß zwischen bCD46<sub>CRIB</sub> und bCD46<sub>MDBK</sub> in den extrazellulären Domänen keine Unterschiede auf Aminosäureebene vorhanden waren. Im Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz aus bovinen Gehirnkapillaren (Shusta et al., 2002)

wurden neun Aminosäureaustausche beobachtet, nämlich L<sub>23</sub>R, C<sub>39</sub>S, R<sub>104</sub>K, Q<sub>106</sub>R, N<sub>109</sub>T, S<sub>185</sub>N, K<sub>228</sub>Q, Y<sub>244</sub>H und Q<sub>244</sub>Y (der hintere Buchstabe bezieht sich dabei auf die Sequenz des bCD46<sub>CRIB</sub>). Von der bekannten bCD46-Sequenz, die aus einer bovinen Lymphknotenbank stammt (Maurer, 2002), unterschieden sich beide in zwei Aminosäureaustauschen, H<sub>73</sub>R und N<sub>124</sub>S. Aus der Mutation N<sub>124</sub>S resultiert eine zusätzliche potentielle N-Glykosilierungsstelle in der CCP-2-Domäne. H<sub>73</sub>R liegt in der CCP-1-Domäne, beide Mutationen lagen in der Region, in der die Virusbindungsstelle von BVDV lokalisiert werden konnte (Himmelreich, 2003). Erst im N-terminalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 15) waren Unterschiede zwischen bCD46<sub>CRIB</sub>, bCD46<sub>MDBK</sub>, bCD46 aus Lymphknoten und bCD46 aus Gehirnkapillaren zu sehen. Diese konnten allerdings durch drei unterschiedliche C-Termini erklärt werden, die auf bekannte Spleißvarianten zurückzuführen sind (Maurer et al., 2004). Differentielles Spleißen wurde auch in der STP-Region beobachtet. In CRIB-Zellen wurde eine Isoform gefunden, die eine um 36 Aminosäuren verlängerte STP-Region besaß (pTK12). In Anlehnung an die Terminologie der drei STP-Segmente des humanen CD46 (Liszewski et al., 1992) enthielt die STP-Region von pTK12 die Segmente A, B und C, während die anderen Isoformen nur aus Segment C bestanden (Abbildung 16). Durch zusätzliche O-Glykosilierung ist diese STP-Region verantwortlich für die 80-90kDa Bande, die das bCD46 im Immunoblot verursacht. In der extrazytoplasmatischen Domäne des bCD46, die für die Virusbindung verantwortlich ist (Himmelreich, 2003), konnten aber keine Sequenzunterschiede zwischen CRIB- und MDBK-Zellen identifiziert werden.

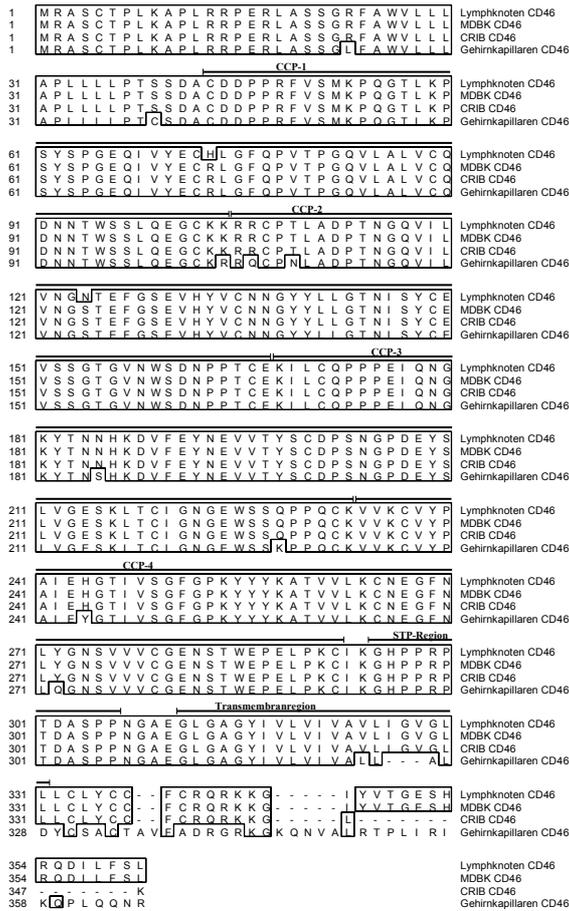


Abbildung 15: Vergleich des bCD46<sub>CRIB</sub> mit verschiedenen publizierten bCD46-Aminosäuresequenzen

Die Aminosäuresequenz von bCD46 aus Lymphknoten (Maurer et al., 2004), aus Gehirnkapillaren (Shusta et al., 2002), aus MDBK- und aus CRIB-Zellen wurde verglichen. CCP-Domänen, STP-Region und Transmembranregion wurden durch Balken über dem Sequenzvergleich kenntlich gemacht. Übereinstimmende Aminosäuren wurden eingerahmt. Zwischen CRIB- und MDBK-Zellen sind keine Aminosäureaustausche in den CCP-Domänen oder der STP-Region zu beobachten. Im Vergleich zu bCD46 aus Lymphknoten wurden im bCD46<sub>CRIB</sub> zwei, im Vergleich zu bCD46 aus Gehirnkapillaren neun Aminosäureaustausche beobachtet.

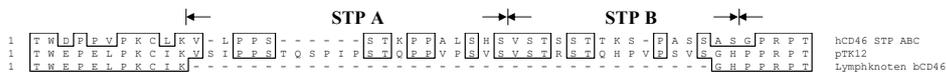


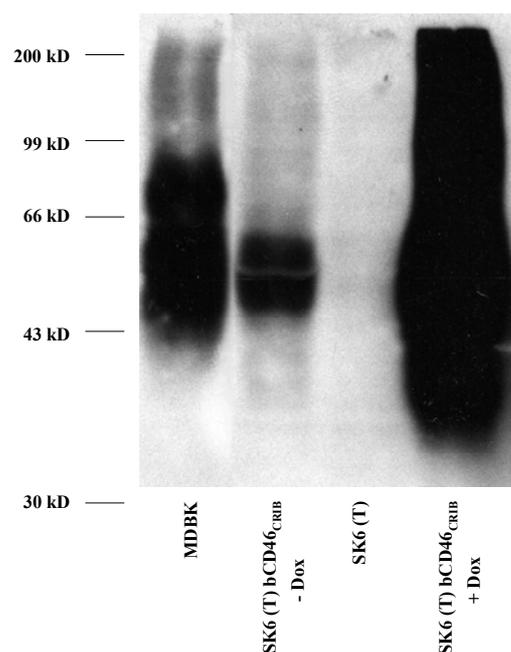
Abbildung 16: STP-Region differierender bCD46- und hCD46-Isoformen

Die STP-Region von bCD46 aus Lymphknoten wurde mit pTK12 und der analogen Isoform des humanen CD46 (STP A, B und C) verglichen. In Anlehnung an die Terminologie des hCD46 umfaßt pTK12 die STP-Segmente A, B und C, wobei ein Teil von Segment A dupliziert wurde. Dagegen enthält das bCD46 aus Lymphknoten nur das STP-Segment C.

Da keine Sequenzunterschiede zwischen bCD46<sub>CRIB</sub> und bCD46<sub>MDBK</sub> gefunden wurden, mußte die Funktion des bCD46<sub>CRIB</sub> als zellulärer Rezeptor für BVDV ermittelt werden. Dies kann durch Expression in einem heterologen, aber empfänglichen Zellsystem geschehen. Im

Fall von BVDV wurde das für porcine SK6-Zellen bereits beschrieben (Himmelreich, 2003). SK6-Zellen sind um einen Faktor 100-200fach weniger empfänglich für BVDV als MDBK-Zellen.

Es wurden mittels eines Tet on Expressionssystems SK6 (T)-Zellen erzeugt, die stabil und induzierbar  $bCD46_{CRIB}$  exprimieren. Dazu wurde das  $bCD46_{CRIB}$ -Gen in das pTRE-Plasmid kloniert (pTK 13), transfiziert und dann nach dem oben beschriebenen Verfahren durch Selektion mit Puromycin SK6 (T)  $bCD46_{CRIB}$ -Zellen erzeugt. Überlebende Zellklone wurden mittels Immunhistochemie auf Präsenz von  $bCD46_{CRIB}$  überprüft, die induzierbare Expression von  $bCD46_{CRIB}$  in positiven Zellklonen wurde mittels Immunoblot demonstriert (Abbildung 17).



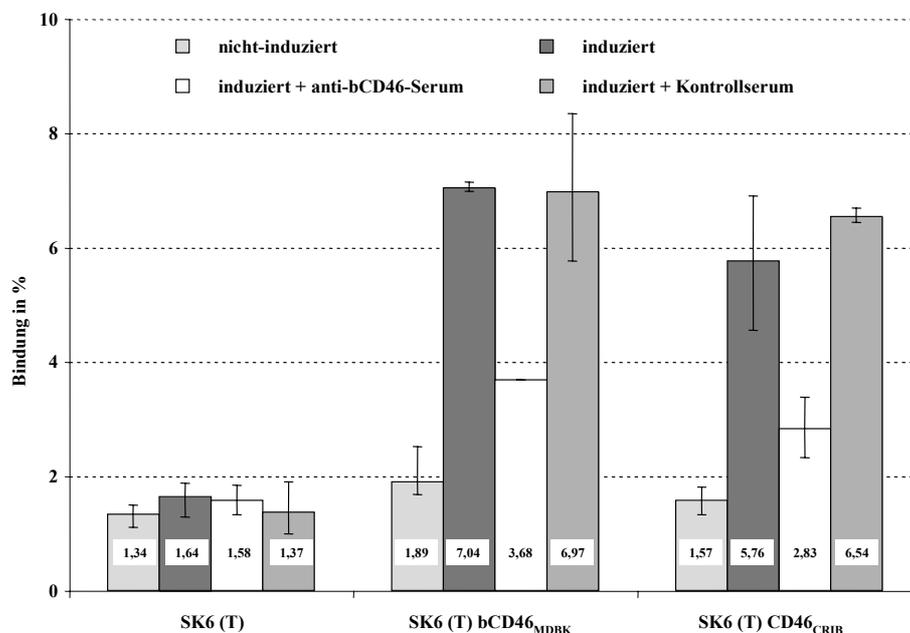
**Abbildung 17:** Western Blot Analyse der SK6 (T)  $bCD46_{CRIB}$ -Zellen

$2 \times 10^6$  SK6 (T)-Zellen, SK6 (T)  $bCD46_{CRIB}$ - und MDBK-Zellen wurden induziert (nur SK6 (T)  $bCD46_{CRIB}$ -Zellen) und nicht induziert lysiert. Das Lysat von ca.  $1,4 \times 10^5$  Zellen wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.  $bCD46$  wurde nach Inkubation mit dem mAk BVD/CA 26 und einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörper durch Chemilumineszenz detektiert.

Die Fähigkeit von  $bCD46_{CRIB}$  BVDV NADL zu binden, wurde mit diesen SK6 (T)  $bCD46_{CRIB}$  überprüft. Die Zellen wurden für 24h induziert und im Bindungsversuch mit [ $^3$ H]-BVDV wurde überprüft, ob die Virusbindung durch die Expression von  $bCD46_{CRIB}$  gesteigert

wurde. Als Kontrollen wurden SK6 (T)-Zellen (Negativkontrolle), SK6 (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen (Positivkontrolle) und nicht induzierte SK6 (T) bCD46<sub>CRIB</sub> verwendet.

Die SK6 (T) CD46<sub>CRIB</sub>-Zellen zeigten eine Bindung von 1,57%, die durch Induktion auf 5,76% gesteigert wurde. Durch Zugabe des anti-bCD46 Kaninchensерums wurde die Bindung auf 2,83% reduziert, hingegen resultierte die Zugabe von Kontrollserum in 6,54% Bindung (Abbildung 18). Die SK6 (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen zeigten eine geringe Bindung ohne Induktion (1,89%), eine gesteigerte Bindung nach Induktion (7,04%), die durch Zugabe des anti-CD46-Serums (3,68%), nicht jedoch des Kontrollserums (6,97%) reduziert wurde.



**Abbildung 18:** bCD46<sub>CRIB</sub>-Expression vermittelt gesteigerte Virusbindung von [<sup>3</sup>H]-BVDV NADL an SK6 (T)-Zellen

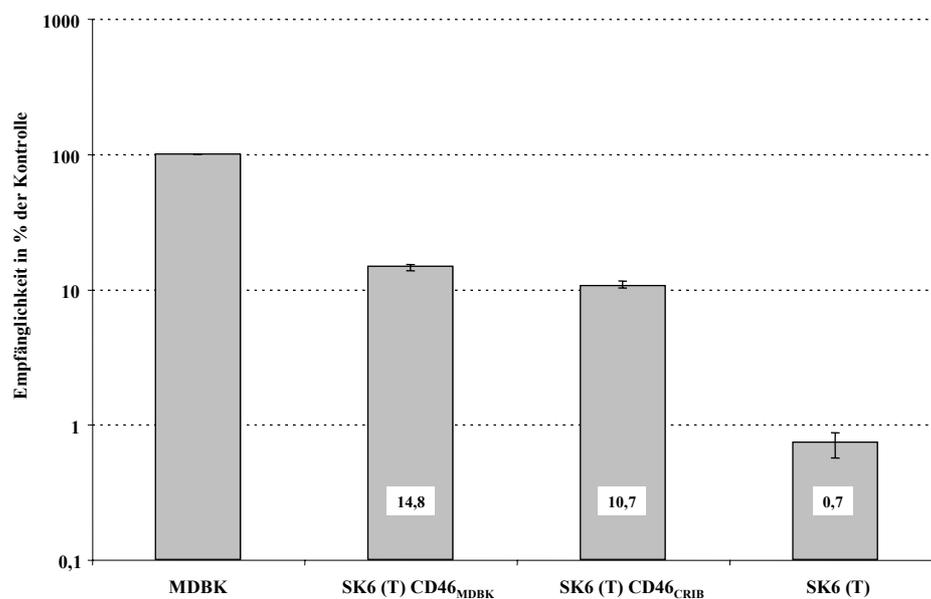
SK6 (T)-, SK6 (T) bCD46<sub>MDBK</sub>- und SK6 (T) bCD46<sub>CRIB</sub>-Zellen wurden 1h bei 4°C mit [<sup>3</sup>H]-BVDV inkubiert. Die Bindung wurde nicht induziert bzw. induziert nach Präinkubation mit einem polyklonalen anti-bCD46 Kaninchensерum bzw. Kontrollserum untersucht. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Dagegen war bei der Negativkontrolle (SK6 (T)-Zellen) keine Veränderung der Virusbindung erkennbar (1,34%-1,64% in allen Proben). Damit zeigte das bCD46<sub>CRIB</sub> auf SK6-Zellen fast identische Bindungseigenschaften für [<sup>3</sup>H]-BVDV wie das bCD46<sub>MDBK</sub>.

Neben der Virusbindung ist ein zellulärer Rezeptor auch an der Infektion beteiligt. Expression von bCD46<sub>MDBK</sub> auf SK6 (T)-Zellen führte zu einer Steigerung der Empfänglichkeit

gegenüber BVDV NADL um den Faktor 20. Daher war es von Interesse, zu bestimmen, ob die Expression von bCD46<sub>CRIB</sub> ebenfalls zu einer Steigerung der Empfänglichkeit von SK6 (T)-Zellen führte.

BVDV NADL wurde parallel auf SK6 (T) bCD46<sub>CRIB</sub>-Zellen, SK6 (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen, MDBK-Zellen und SK6 (T)-Zellen titriert. Die Auswertung erfolgte durch immunhistochemische Bestimmung der Anzahl infizierter Zellen. SK6 (T)-Zellen wiesen eine Empfänglichkeit von 0,7% auf, diese wurde durch die Expression von bCD46<sub>CRIB</sub> auf 10,7% gesteigert (Abbildung 19).



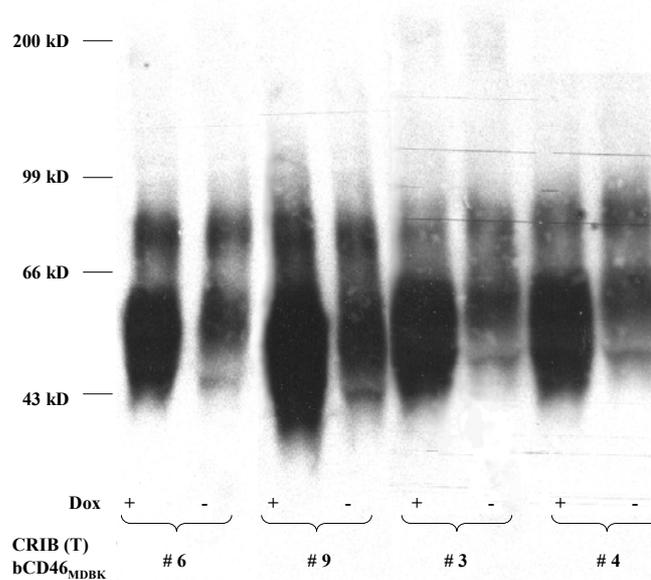
**Abbildung 19:** bCD46<sub>CRIB</sub>-Expression vermittelt gesteigerte Empfänglichkeit von SK6 (T)-Zellen für BVDV NADL

BVDV NADL wurde auf  $1 \times 10^6$  MDBK-, SK6 (T)-, induzierten SK6 (T) bCD46<sub>MDBK</sub>- und SK6 (T) bCD46<sub>CRIB</sub>-Zellen titriert. Nach 24h wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch die Anzahl infizierter Zellen bestimmt. Der Titer auf MDBK-Zellen wurde als Kontrolle auf 100% festgelegt. Die Experimente wurden als Zweifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Nach Expression von bCD46<sub>MDBK</sub> zeigte sich eine Empfänglichkeit von 14,8%. Die Empfänglichkeit von SK6-Zellen wurde also durch Expression von bCD46<sub>MDBK</sub> um das 20fache gesteigert, durch Expression von bCD46<sub>CRIB</sub> um das 14,5fache. Das bCD46<sub>CRIB</sub> zeigte sich also fast ebenso funktionell wie das bCD46<sub>MDBK</sub>.

Falls die Mutation der CRIB-Zellen das bCD46 beträfe, wäre zu erwarten, daß eine Überexpression von bCD46<sub>MDBK</sub> (also einem funktionellen Rezeptor) in CRIB-Zellen zu einer Wiederherstellung der Empfänglichkeit führen würde. Aus diesem Grund wurden CRIB (T)-Zellen erzeugt, die das Gen des Regulatorproteins „reverse tetracycline-controlled transactivator“ (rtTA) exprimierten. In diesen Zellen war eine induzierbare Expression durch Zugabe von Doxyzyklin oder Tetrazyklin möglich. Auf Basis dieser CRIB (T)-Zellen wurde eine Zelllinie hergestellt, die induzierbar das bCD46<sub>MDBK</sub> exprimiert (CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen). Da eine Identifikation induzierbar exprimierender Zellklone mittels Immunhistochemie nicht möglich war (Quantifizierung ist immunhistochemisch nur sehr eingeschränkt möglich), wurden induzierte und nicht induzierte CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen lysiert und die Expression von bCD46<sub>MDBK</sub> in diesen Zellen durch Immunoblot mit einem mAk anti-bCD46 (BVD/ CA 26) nachgewiesen (Abbildung 20).

Zunächst wurde auf diesen Zellen die bCD46-spezifische Bindung für 4h bei 37°C im Bindungsversuch mit radioaktiv markiertem Virus untersucht. Als Kontrollen wurden nicht induzierte CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen, SK6 (T)-Zellen (Negativkontrolle) und und SK6 (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen (Positivkontrolle) verwendet. CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen zeigten eine Virusbindung von 3,58%, die durch Induktion auf 6,56% gesteigert wurde. Präinkubation mit dem Kontrollserum resultierte in 6,17% Virusbindung, während die mAk's anti-bCD46 zu einer reduzierten Bindung von 4% führten. Während bei der Negativkontrolle kaum eine veränderte Virusbindung erkennbar war (2,23%-3,03% in allen Proben), zeigte sich bei der Positivkontrolle eine deutliche Bindung nach Induktion (10,47%, ohne Induktion 3,39%). Präinkubation mit mAk's anti-bCD46 reduzierte im Gegensatz zur Zugabe von Kontrollserum (10,59%) die Virusbindung auf 7,06%. Insgesamt konnten CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen also bCD46-spezifisch BVDV binden.



**Abbildung 20:** Western Blot Analyse der CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen

$2 \times 10^6$  Zellen der einzelnen Zellklone wurden mit und ohne Induktion lysiert. Das Lysat von je ca.  $1,4 \times 10^5$  Zellen wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das bCD46 wurde nach Inkubation mit dem mAk BVD/CA 26 und einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

Interessanterweise blieben CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>-Zellen trotz der gesteigerten Virusbindung durch die Expression von bCD46<sub>MDBK</sub> vollständig resistent gegenüber BVDV. CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub>- und MDBK-Zellen wurden mit BVDV NADL infiziert und die Anzahl infizierter Zellen immunhistochemisch bestimmt. Während MDBK-Zellen fast zu 100% infiziert waren, konnten bei CRIB (T) bCD46<sub>MDBK</sub> keine infizierten Zellen detektiert werden. Durch Komplementation der CRIB-Zellen mit einem funktionellen Rezeptor wurde also die Resistenz gegenüber BVDV nicht beeinflusst.

### 3.2.3.) Bedeutung des LDL-Rezeptors für die Resistenz der CRIB-Zellen

Offensichtlich verfügen CRIB-Zellen über ein funktionelles bCD46. Demzufolge betrifft die Mutation vermutlich andere Faktoren, die bei der Invasion von Pestiviren eine zentrale Rolle spielen. Der LDL-Rezeptor (LDL-R) wurde von Agnello et al. als zellulärer Rezeptor für BVDV beschrieben (Agnello et al., 1999). Gestützt wurde diese Hypothese von der Tatsache, daß CRIB-Zellen keinen funktionellen LDL-R exprimieren. Eine der experimentellen

Evidenzen für die Rezeptortheorie war eine Inhibition der BVDV Infektion durch einen mAk anti-LDL-R. Da diese Inhibition bei vorläufigen Experimenten nicht bestätigt werden konnte, lag es nahe, CRIB-Zellen auf die Existenz und Funktionalität des LDL-R zu überprüfen.

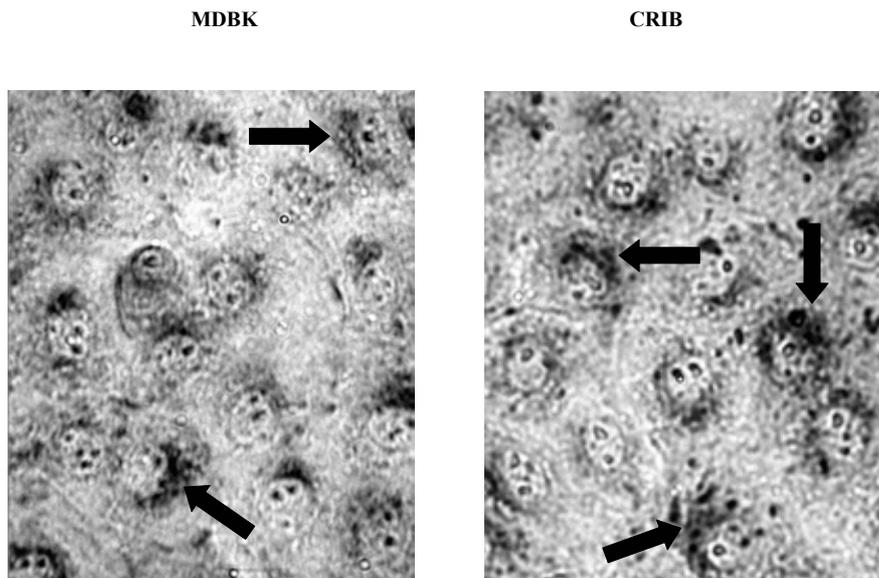
#### 3.2.3.1.) Präsenz des LDL-Rezeptors auf CRIB-Zellen

Die Präsenz des LDL-R wurde mittels Immunhistochemie und Immunoblot überprüft. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden parallel CRIB- und MDBK-Zellen fixiert und mit einem gegen humanen LDL-R gerichteten monoklonalen Antikörper (Ab-1) markiert. In der immunhistochemischen Untersuchung der CRIB-Zellen war eindeutig ein perinukleäres Signal erkennbar, das dem Signal bei MDBK-Zellen entsprach (Abbildung 21).

Für den Immunoblot wurden eine gleiche Anzahl CRIB- und MDBK-Zellen lysiert und nach der Homogenisierung mittels Ultraschall durch Zentrifugation für 10min bei 800g vorgeklärt. Anschließend wurden zelluläre Membranen mittels Ultrazentrifugation pelletiert und resuspendiert (Martin et al., 1999).

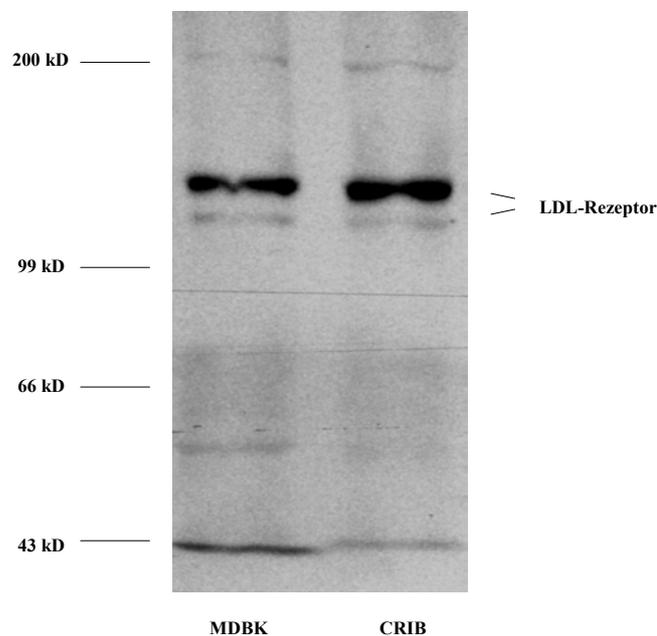
Diese Membranfraktionen wurden in der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, mittels eines gegen den LDL-R gerichteten monoklonalen Antikörpers (Ab-1) markiert und durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Es war eindeutig zu sehen, daß CRIB-Zellen den LDL-R tatsächlich exprimierten (Abbildung 22). Die sichtbare Doppelbande entspricht der beschriebenen glykosilierten bzw. deglykosilierten Form von 165 bzw. 130kDa (Martin et al., 1999). Ein Unterschied im Expressionsniveau wurde nicht beobachtet.



**Abbildung 21:** Immunhistochemischer Nachweis des LDL-Rezeptors auf CRIB- und MDBK-Zellen

$3 \times 10^5$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden ausgesät, über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und dann fixiert. Mit dem mAk mAb-1 wurde der LDL-R markiert und mit Hilfe eines Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers und eines löslichen Substrats sichtbar gemacht. Die Pfeile zeigen die perinukleäre Lokalisation der Markierung.



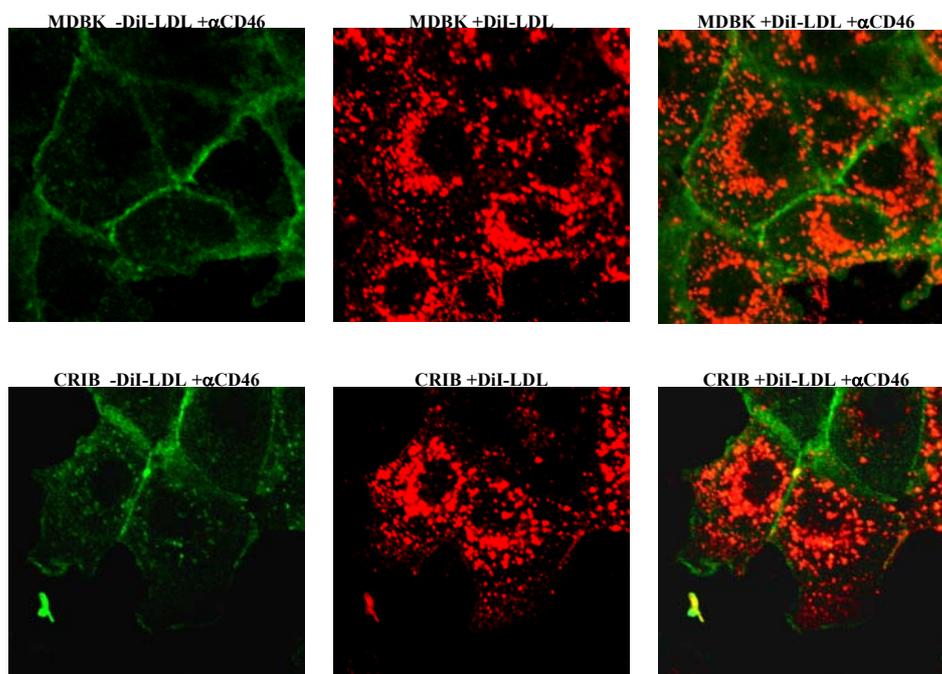
**Abbildung 22:** Western Blot Analyse der LDL-Rezeptor-Expression in CRIB- und MDBK-Zellen

$10^8$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden homogenisiert und mittels Zentrifugation 10min bei 800g vorgeklärt. Aus dem Überstand wurden zelluläre Membranen mittels Ultrazentrifugation für 70min bei 100.000g pelletiert und anschließend resuspendiert. Membranfraktion von ca.  $6 \times 10^6$  Zellen wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der bovine LDL-R wurde nach Inkubation mit dem mAk mAb-1 und einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.

3.2.3.2.) Funktionelle Charakterisierung des LDL-Rezeptors<sub>CRIB</sub>

Als ein weiterer Hinweis für das Fehlen des LDL-R in CRIB-Zellen zeigten Agnello et al., daß CRIB-Zellen im Gegensatz zu MDBK-Zellen kein Fluoreszenz-markiertes LDL (DiI-LDL) internalisierten. Um dies zu überprüfen, wurden CRIB- und MDBK-Zellen mit Fluoreszenz-markiertem LDL inkubiert, fixiert und als Kontrolle wurde eine immunologische Markierung der Zellmembran mittels mAk's anti-bCD46 und einem FITC-markierten Sekundärantikörper durchgeführt. Anschließend wurde mittels konfokaler Lasermikroskopie die Internalisierung von DiI-LDL beurteilt.

Mit dieser Technik wurde die Schärfenebene so gewählt, daß sicher zwischen intrazellulärem DiI-LDL auf der einen Seite und gebundenem, aber extrazellulärem DiI-LDL auf der anderen Seite unterschieden werden konnte. Beide Zelllinien zeigten deutlich eine typische gelbgrüne Färbung der Zellmembran, die auf die immunologische Markierung von bCD46 zurückzuführen war (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Internalisierung von DiI-markiertem LDL in CRIB- und MDBK-Zellen

$5 \times 10^5$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  DiI-LDL (Molecular Probes) und/oder mAk's anti-bCD46 1h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die Untersuchung der Präparate erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie. An der Zellmembran war das membranständige, durch mAk's markierte bCD46 als Fluoreszenz erkennbar. Das DiI-LDL zeigte die tröpfchenförmige Verteilung früher und später Endosomen.

Auch die tröpfchenförmige rote Färbung, die durch das DiI-LDL in den Endosomen verursacht wurde, konnte bei beiden Zelllinien beobachtet werden. Die intrazelluläre Verteilung des DiI-LDL, die einer charakteristischen Anfärbung der frühen und späten Endosomen entspricht, war sowohl bei CRIB- als auch bei MDBK-Zellen sehr typisch und fast identisch zu erkennen. Es gab keinen Hinweis auf das Fehlen eines funktionellen LDL-R in CRIB-Zellen.

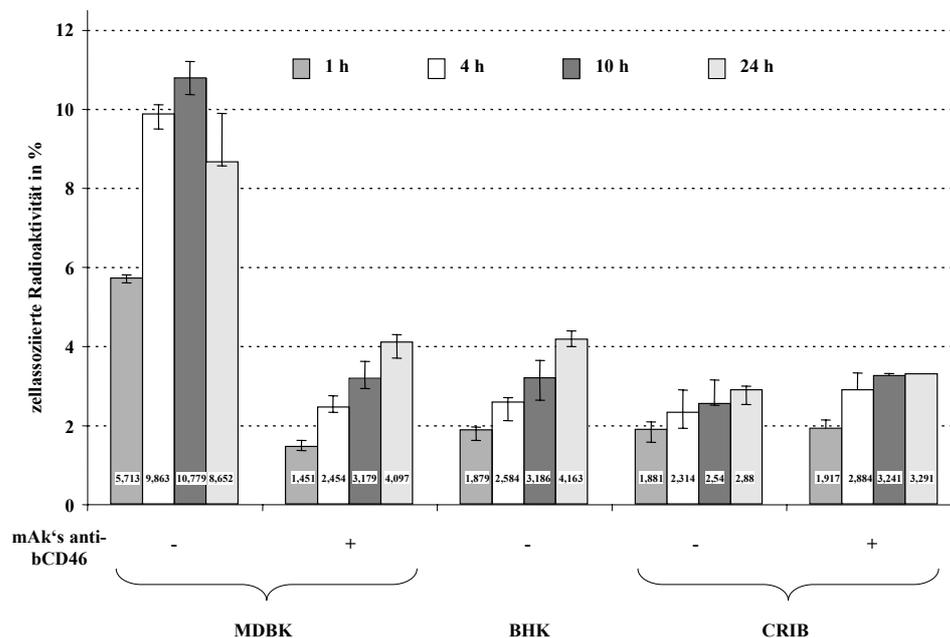
#### 3.2.4.) Internalisierung in CRIB-Zellen

Die Tatsache, daß CRIB-Zellen bCD46-spezifisch BVDV binden konnten, jedoch die Virusbindung auf CRIB-Zellen gegenüber MDBK-Zellen deutlich erniedrigt war, legte den Schluß nahe, daß durch die Mutation der CRIB-Zellen die Virusbindung beeinflusst wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein Defekt, der Komponenten der Zellmembran der CRIB-Zellen beeinflusst. Um diese Hypothese zu unterstützen, wurde untersucht, ob Virus in CRIB-Zellen in die Endosomen gelangen kann oder ob bereits dieser Prozeß blockiert ist.

##### 3.2.4.1.) Internalisierung von [<sup>3</sup>H]-BVDV NADL

Zunächst wurde die Internalisierung in CRIB-Zellen mit Hilfe von [<sup>3</sup>H]-BVDV untersucht. Hierbei wurde die Internalisierung des [<sup>3</sup>H]-BVDV bei 37°C für unterschiedliche Intervalle (1h, 4h, 10h, 24h) bei MDBK- (Positivkontrolle), BHK- (Negativkontrolle) und CRIB-Zellen beobachtet. MDBK- und CRIB-Zellen wurden auch nach Präinkubation mit mAk's anti-bCD46 getestet. Dieses Verfahren erlaubt nur eine unzureichende Unterscheidung zwischen adsorbiertem und internalisiertem Virus. Ca. 4h nach der Inokulation ist allerdings keine wesentliche Zunahme der Virusbindung zu erwarten, die weitergehende Zunahme der zellassozierten Radioaktivität ist also wahrscheinlich auf Internalisierung von gebundenem Virus zurückzuführen. Die gemessene zellassozierte Radioaktivität wurde deswegen der Einfachheit halber hier mit internalisiertem Virus gleichgesetzt.

Bei den als Negativkontrolle dienenden BHK-Zellen war bei Steigerung der Inkubationszeit eine lineare Zunahme der zellassozierten Radioaktivität zu beobachten (Abbildung 24). Diese stellte vermutlich eine Aufnahme von unspezifischer Radioaktivität aus dem Überstand dar. Ursache dieser unspezifischen Radioaktivität ist vermutlich eine unzureichende Aufreinigung des [ $^3\text{H}$ ]-BVDV bei der Gradientenzentrifugation. Hierbei werden Abfall- oder Stoffwechselprodukte der radioaktiv markierten RNA bzw. [ $^3\text{H}$ ]-Uridin nicht vollständig abgetrennt. Dadurch kommt der hohe Hintergrund an zellassoziierter Radioaktivität zustande. Die CRIB-Zellen zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf der zellassozierten Radioaktivität wie BHK-Zellen. Dabei spielte die Präinkubation mit mAk's anti-bCD46 kaum eine Rolle. Auch auf MDBK-Zellen, die mit mAk's anti-bCD46 präinkubiert worden waren, war das Profil dem der BHK-Zellen sehr ähnlich.



**Abbildung 24:** CRIB-Zellen internalisieren kein [ $^3\text{H}$ ]-markiertes BVDV NADL

Zu  $2 \times 10^6$  CRIB-, MDBK- und BHK-Zellen wurde für verschiedene Zeitspannen bei  $37^\circ\text{C}$  [ $^3\text{H}$ ]-BVDV zugegeben. CRIB- und MDBK-Zellen wurden dabei mit und ohne mAk's anti-bCD46 inkubiert. Nach 24h führte auf MDBK-Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  der viral bedingte zytopathische Effekt (CpE) zu einer Ablösung von Zellen und damit zu einer Reduktion der zellassozierten Radioaktivität. Die Experimente wurden als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Dagegen zeigte sich auf MDBK-Zellen ohne Präinkubation ein Anstieg der Virusinternalisierung bis 10h. Nach 24h konnte mikroskopisch ein deutlicher zytopathischer

Effekt (cpE) beobachtet werden, der durch BVDV NADL (zp Virus) verursacht wurde. Dadurch hatten sich viele Zellen schon abgelöst und verfälschten damit aus technischen Gründen das Ergebnis.

#### 3.2.4.2.) Internalisierung in Anwesenheit von $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin

Zur genaueren Unterscheidung zwischen Virusadsorption und Virusinternalisierung fehlte zu diesem Zeitpunkt eine geeignete Kontrolle. Bei einer solchen Kontrolle mußte spezifische Virusbindung möglich, eine Initiierung der Endozytose aber blockiert sein. Aufgrund der Tatsachen, daß erstens die Invasion von BVDV durch  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin ( $\beta$ -MCD) fast vollständig inhibiert wird und zweitens genau bekannt ist, daß die Abschnürung endozytotischer Vesikel blockiert wird, stellten mit  $\beta$ -MCD präinkubierte MDBK-Zellen eine geeignete Kontrolle dar. Da die Virusbindung von CRIB-Zellen gegenüber MDBK-Zellen reduziert ist, durfte die Interpretation allerdings nicht anhand der absoluten Virusinternalisierung, sondern nur durch einen Vergleich der Internalisierungskinetik vorgenommen werden.

Um das hohe Hintergrundniveau des [ $^3$ H]-BVDV zu umgehen (Hintergrundbindung von 1,5%-2,5% auch bei Negativkontrollen) und gleichzeitig die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen, wurde die Detektion von pestiviraler RNA mittels Taq-Man-PCR (Cedillos-Rosario, nicht veröffentlicht) eingeführt. Ein zwischen den meisten BVDV Stämmen konserviertes Fragment der 5'-nicht-translatierten Region wurde dabei in DNA umgeschrieben und amplifiziert. Zur Evaluierung dieser Methode wurde aus einer seriellen Verdünnung BVDV NADL die Gesamt-RNA mittels RNeasy präpariert und mittels Real Time-PCR analysiert. Parallel wurde BVDV NADL auf MDBK-Zellen titriert. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Verdünnung des Virus um den Faktor 10 mit einer Abnahme der errechneten Genomäquivalente um den gleichen Faktor korrelierten. Weiterhin konnte das Verhältnis von infektiösen Einheiten auf MDBK-Zellen und Genomäquivalenten für BVDV NADL bestimmt

werden. Dieses betrug ca. 54 Genomäquivalente pro infektiöse Einheit. Insgesamt konnte damit gezeigt werden, daß die Detektion von pestiviraler RNA mittels Taq-Man-PCR für die Untersuchung der Virusinternalisierung spezifischer und sensitiver war, als die Verwendung von [<sup>3</sup>H]-BVDV.

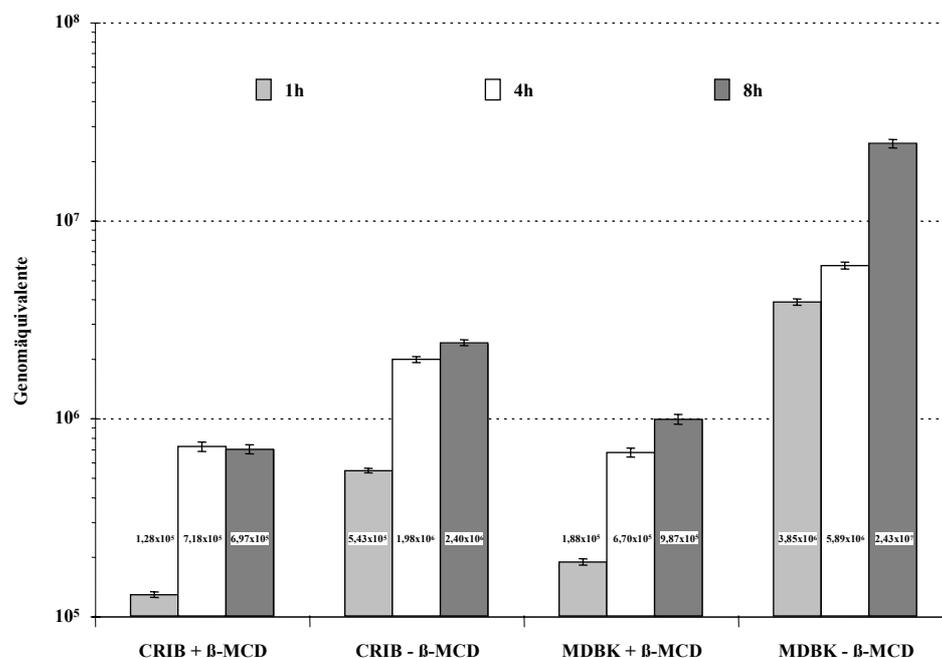
β-MCD depletiert selektiv Cholesterin aus der Zellmembran. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß auch die Bindung von BVDV NADL an mit β-MCD präinkubierten MDBK-Zellen durch die Cholesterinreduktion beeinflusst wurde. Aus diesem Grund wurde ein Kontrollversuch auf MDBK-Zellen parallel mit und ohne β-MCD-Präinkubation durchgeführt, bei dem die gebundene Virusmenge pro Zelle quantifiziert wurde. Dabei zeigte sich, daß die Präinkubation mit β-MCD für 4h bei 37°C die Virusbindung um ca. 43% verringert.

Zur Untersuchung der Internalisierung von BVDV in CRIB-Zellen wurden ca.  $6 \times 10^5$  CRIB- und MDBK-Zellen parallel mit BVDV NADL in einer MOI von 10 für unterschiedliche Zeitspannen (1h, 4h und 8h) bei 37°C inkubiert, intensiv mit PBS gewaschen und dann lysiert. Aus der RNA von ca.  $10^5$  Zellen wurde mittels quantitativer Real Time-PCR die Anzahl der Genomäquivalente bestimmt. Gleichzeitig wurde bei den präinkubierten Zellen ein Korrekturfaktor für die reduzierte Bindung von BVDV nach Präinkubation mit β-MCD einbezogen.

Auf MDBK-Zellen, die nicht mit β-MCD präinkubiert wurden, lag die Anzahl der zellassoziierten Genomäquivalente nach 1h um ca. den Faktor 10 höher als bei den anderen getesteten Zellen. Von 1h zu 4h stieg die Anzahl nur um ca. den Faktor 1,5 an. Dagegen war von 4h auf 8h ein Anstieg um mehr als das Vierfache zu beobachten. Dieser Anstieg war vermutlich auf die beginnende Replikation des internalisierten Virus zurückzuführen. Die Anzahl der zellassoziierten Genomäquivalente stieg bei MDBK-Zellen, bei denen durch β-MCD die Vesikelabschnürung von der Zellmembran blockiert war, zwischen 1h und 4h auf das 3,6-fache an. Dagegen lag die Anzahl der Genomäquivalente nach 8h nur um den Faktor

1,5 höher als nach 4h. Bei CRIB-Zellen, die nicht mit  $\beta$ -MCD präinkubiert wurden, zeigte sich nur zwischen 1h und 4h ein Anstieg in der Anzahl der zellassozierten Genomäquivalente (Abbildung 25). Dieser Verlauf konnte auch bei CRIB-Zellen ohne  $\beta$ -MCD bestätigt werden, allerdings stieg die Anzahl der zellassozierten Genomäquivalente auch noch zwischen 4h und 8h um den Faktor 1,2 an. Auch nach Berücksichtigung der verringerten Bindung bewirkte die  $\beta$ -MCD-Präinkubation auf beiden Zelllinien eine Reduktion der Virusaufnahme.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß das Profil der Virusinternalisierung von MDBK-Zellen nach 1h, 4h und 8h von der Präinkubation mit  $\beta$ -MCD entscheidend verändert wurde.



**Abbildung 25:** Präinkubation mit  $\beta$ -MCD bewirkt eine Angleichung der Internalisierungsprofile von BVDV auf CRIB- und MDBK-Zellen

$6 \times 10^5$  CRIB- und MDBK-Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von 10mM  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin ( $\beta$ -MCD) mit  $6 \times 10^6$  infektiösen Einheiten BVDV NADL für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach intensivem Waschen lysiert, die Gesamt-RNA aus dem Lysat präpariert und die Anzahl der BVDV Genomäquivalente durch TaqMan-PCR bestimmt. Die Quantifizierung der Genomäquivalente wurde als Dreifachansatz durchgeführt, wobei der Mittelwert, sowie als Fehlerbalken die Maximal- und Minimalwerte angegeben wurden.

Durch die Blockade der Abschnürung Clathrin-bedeckter Vesikel von der Zellmembran konnte dieses Profil dem Internalisierungsprofil von CRIB-Zellen fast vollständig angeglichen werden. Die absoluten Werte der zellassozierten Genomäquivalente bei CRIB-

Zellen ohne Präinkubation mit  $\beta$ -MCD lagen etwa um den Faktor 2 höher. Dennoch lassen diese Ergebnisse vermuten, daß auf CRIB-Zellen die spezifische Initiation der Endozytose von BVDV, also der Prozeß, in dessen Verlauf die Virionen ins Endosom gelangen, inhibiert ist.

#### 3.2.4.3.) Internalisierung in CRIB-Zellen mittels PEG

Es ist beschrieben, daß CRIB-Zellen mit BVDV „Singer“ infizierbar sind, wenn sie nach der Virusadsorption mit Polyethylenglykol (PEG) behandelt wurden (Flores et al, 1996). Die Zugabe von 5% PEG (MG 6000) bewirkte eine erfolgreiche Infektion der CRIB-Zellen, obwohl diese Konzentrationen vermutlich nicht ausreichend sind, um eine Fusion mit der Zellmembran herbeizuführen. Es ist daher anzunehmen, daß PEG den physiologischen, endosomalen Internalisierungsweg unterstützt. Für detailliertere Untersuchungen wurde das Experiment in modifizierter Form mit und ohne Präinkubation eines polyklonalen anti-bCD46 Kaninchenserums bzw. des endosomalen Azidifizierungsinhibitors Bafilomycin A1 (0,1 $\mu$ M) durchgeführt.

Nach Präinkubation der CRIB-Zellen mit oder ohne polyklokales Kaninchenserum wurde BVDV NADL in Suspension an die Zellen adsorbiert. Diese Zellsuspension wurde 1h mit 10% PEG (MG 6000) bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert und in 1ml 37,5% PEG (MG 1500) in Medium resuspendiert. Innerhalb von 8min wurde das Volumen mit serumfreiem Medium schrittweise auf 18ml erhöht und die Zellen dann ausgesät. Die Anzahl infizierter Zellen wurde immunhistochemisch bestimmt. Es zeigte sich, daß durch Präinkubation mit dem Kaninchenserum die Empfänglichkeit der CRIB-Zellen auf ca. 17,5% der Kontrolle (CRIB-Zellen ohne Kaninchenserum) reduziert wurde. Dies zeigte erneut, daß auch bei dieser Internalisierung ein großer Teil der Bindung von BVDV an CRIB-Zellen bCD46-spezifisch ist. Präinkubation der CRIB-Zellen mit Bafilomycin A1 reduzierte die Empfänglichkeit der

CRIB-Zellen auf 15,8%. Die Ergebnisse bestätigten also, daß PEG die physiologische Internalisierung von BVDV NADL auf CRIB-Zellen stimulierte.

## 4.) Diskussion

### 4.1.) Charakterisierung des Invasionsweges von BVDV

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, auf welche Weise BVDV nach der Bindung an bovines CD46 (bCD46) in die Wirtszelle aufgenommen wird. Alle experimentellen Evidenzen dieser Arbeit weisen daraufhin, daß diese Internalisierung des Virus durch Clathrin-abhängige Endozytose geschieht, wie sie für viele behüllte RNA-Viren beschrieben ist.

Bislang lagen keine Untersuchungen darüber vor, wie der Invasionsprozeß von BVDV nach der Adsorption an bCD46 fortgesetzt wird. Insbesondere der Mechanismus der Penetration und das Uncoating waren ungeklärt. Für andere behüllte RNA-Viren, z.B. Flavi- und Alphaviren, wurde Clathrin-abhängige Endozytose beschrieben, die in eine pH-abhängige Fusion der Virusmembran mit der endosomalen Membran mündet (Heinz et al., 2000).

Zur Charakterisierung des Penetrationsmechanismus von BVDV wurden verschiedene Methoden angewandt. Der Einfluß einer dominant negativen Mutante von Dynamin-1, welche die Endosomenabschnürung von der Zellmembran hemmt, auf die Invasion von BVDV wurde untersucht. Weiterhin wurden verschiedene chemische (Chlorpromazin und  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin) bzw. biophysikalische Inhibitionsmethoden (intrazelluläre  $K^+$ -Depletion, Hyperosmolarität) der Clathrin-abhängigen Endozytose angewandt und überprüft, ob sie die Invasion von BVDV beeinflussen. Abschließend wurde bestimmt, inwieweit die Invasion von BVDV von einer endosomalen Azidifizierung abhängt.

Dynamin-1 ist ein Membranprotein, welches in der Membran vor allem in den sogenannten „clathrin coated pits“ auftritt. Obgleich der genaue Mechanismus immer noch umstritten ist, gilt als sicher, daß durch eine Konformationsänderung bei der Bindung von GTP ein ringförmiges Molekül entsteht, das den Abschnürungsprozeß des eingestülpten Endosoms einleitet. Endgültig getrennt wird das Endosom von der Zellmembran durch eine mit der GTP-Hydrolyse einhergehende, erneute Veränderung der Dynaminkonformation (Bottomley et al., 1999). Die Spaltung von GTP zu GDP

durch die GTPase Dynamin-1 ist daher essentiell für den Prozeß der Endosomenabschnürung. Die beschriebene dominant-negative Mutante des Dynamin-1 (Damke et al., 1994) ( $\text{Dyn}^{\text{K44A}}$ ) kann diese GTPase-Funktion nicht mehr erfüllen und blockiert deshalb die Endosomenabschnürung von der Zellmembran.

Für die Untersuchung des Effekts von Dynamin-1 auf die Invasion von BVDV war es notwendig, ein neues Zellsystem zu etablieren (MDBK (T)  $\text{Dyn}^{\text{wt}}$  bzw.  $\text{Dyn}^{\text{K44A}}$ ). Diese Zelllinien wurden mit dem Alphavirus Sindbis-Virus (SinV) evaluiert, dessen Invasionsprozeß gut charakterisiert ist. Es zeigte sich, daß Zellen, die  $\text{Dyn}^{\text{K44A}}$  exprimierten nur etwa 20% der Empfänglichkeit aller Kontrollzellen gegenüber SinV aufwiesen. Gegenüber BVDV NADL zeigten  $\text{Dyn}^{\text{K44A}}$ -exprimierende Zellen eine Empfänglichkeit von ca. 12%. Damit war eine Abhängigkeit der BVDV Infektion von Dynamin-1 klar erkennbar.

Die wichtigste Ursache für die nicht vollständig blockierte Empfänglichkeit liegt wahrscheinlich darin begründet, daß selbst mit induzierbarer Expression keine ausreichende Homogenität der  $\text{Dyn}^{\text{K44A}}$ -Expression in der Zellpopulation erreicht werden kann. Es ist beschrieben, daß die Empfänglichkeit induzierbar  $\text{Dyn}^{\text{K44A}}$  exprimierender HeLa-Zellen gegenüber dem Alphavirus Semliki Forest Virus (SFV) durch Induktion von ca. 20% auf ca. 6% reduziert wurde (DeTulleo et al., 1998). Gleichzeitig wurde allerdings in mehr als 20% dieser Zellpopulation die Clathrin-abhängige Endozytose auch nach Induktion nicht vollständig inhibiert. Nur Zellen mit funktionierender Clathrin-abhängiger Endozytose konnten mit SFV infiziert werden. Zusätzlich muß erwähnt werden, daß auch für  $\text{Dyn}^{\text{K44A}}$  eine minimale GTP-Hydrolyseaktivität beschrieben wurde (Damke et al., 2001), die einen geringen Prozentsatz an Endosomenabschnürung gestattet.

Die meisten Viren, die mittels Endozytose in die Wirtszelle eindringen und für die der Penetrationsmechanismus aufgeklärt wurde, überwinden die Zellmembran mittels Clathrin-abhängiger Endozytose. Aus diesem Grund wurde die Wirkung zweier spezifischer Inhibitoren der Clathrin-abhängigen Endozytose ( $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin und Chlorpromazin) auf die Invasion von BVDV untersucht.  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin ( $\beta$ -MCD) depletiert selektiv Cholesterin aus der

Zellmembran. Es wirkt demzufolge als potenter Inhibitor der Endozytose von Caveolae (Sieczkarski et al., 2002). Zusätzlich blockiert  $\beta$ -MCD allerdings auch die Abschnürung von Clathrin-bedeckten Vesikeln (Rodal et al., 1999), indem es die Formation dieser Vesikel an der Plasmamembran hemmt. Für Chlorpromazin dagegen ist bisher ein inhibierender Effekt ausschließlich auf die Clathrin-abhängige Endozytose beschrieben (Sieczkarski et al., 2002). Die „clathrin coated pits“ an der Plasmamembran werden depletiert bzw. die membranständigen Clathrin-Käfige werden von der Plasmamembran an endosomale und andere intrazelluläre Membranen umverteilt (Wang et al., 1993). Auswirkungen auf andere Endozytoseprozesse sind bisher nicht bekannt. Beide Inhibitoren verursachten eine dosisabhängige Hemmung der BVDV Infektion.

Es wurde gezeigt, daß ein hypotonischer Schock in Verbindung mit intrazellulärer Kalium-Ionen- ( $K^+$ )-Depletion eine Umverteilung der Clathrin-Käfige von der Zellmembran ins Zytoplasma verursacht (Bayer et al., 2001; Madshus et al., 1987). Diese Umverteilung führt zu einer massiven Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen war allerdings ersichtlich, daß ca. 20% der „clathrin coated pits“ nach hypotonischem Schock in Verbindung mit intrazellulärer  $K^+$ -Depletion funktionell auf der Zellmembran blieben (Larkin et al., 1983). Durch intrazelluläre  $K^+$ -Depletion wurde die BVDV Infektion um 86% reduziert, eine stärkere Inhibition der BVDV Infektion war aufgrund der ca. 20% noch vorhandenen, funktionellen „clathrin coated pits“ an der Zellmembran nicht zu erwarten. Nach Heuser et al. bewirkte die Inkubation in hyperosmolarem Medium (0,45 M Saccharose) ebenso wie die intrazelluläre  $K^+$ -Depletion eine Entfernung der Clathrin-Käfige von der Plasmamembran (Hansen, S. H. et al., 1993; Heuser et al., 1989). In hyperosmolarem Medium wurde im Vergleich zu isoosmolarem Medium <0,01% der BVDV Infektion beobachtet. Für beide Methoden ist neben der Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose allerdings bekannt, daß sie unspezifisch auch andere Endozytoseprozesse beeinflussen.

Offensichtlich wird BVDV durch einen endozytotischen Prozeß in die Wirtszelle aufgenommen. Dafür sprechen eindeutig sämtliche Ergebnisse der Untersuchungen mit den chemischen, biomechanischen und biophysikalischen Inhibitoren. Schwieriger ist die Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf die Art der Endozytose, mittels derer BVDV in die Zelle gelangt. Jede der angewandten Methoden inhibiert die Clathrin-abhängige Endozytose, jedoch ist keine absolut spezifisch. Die Kombination der Ergebnisse aller fünf Inhibitionsmethoden (Dynamin, Chlorpromazin,  $\beta$ -Methylcyclodextrin, intrazelluläre  $K^+$ -Depletion und hyperosmolares Medium) stützt jedoch die Annahme, daß BVDV vermutlich mittels Clathrin-abhängiger Endozytose in die Wirtszelle gelangt, wie es auch für Flavi- und Alphaviren beschrieben ist.

Im Endosom erfolgt bei diesen beiden Virusfamilien die Penetration, das heißt durch Fusion der viralen mit der endosomalen Membran gelangt das virale Nukleokapsid ins Zytoplasma. Dieser Schritt ist abhängig vom sauren Milieu im reifenden Endosom. Die Wirkung der Inhibitoren der endosomalen Azidifizierung auf die BVDV Infektion zeigte deutlich, daß dieser Mechanismus auch für BVDV zutrifft. Interessant ist dabei, daß BVDV gegenüber niedrigen pH-Werten unempfindlich ist (Depner et al., 1992), während Flavi- und Alphaviren in saurem Milieu vollständig inaktiviert werden. Diese Inaktivierung ist auf eine konformationelle Umlagerung zurückzuführen, die neben dem Verlust der Rezeptorbindung und damit der Inaktivierung des Virions bei niedrigen pH-Werten gleichzeitig auch die Exposition des viralen Fusionspeptids bewirkt. Dieser Zustand wird als Metastabilität bezeichnet.

Die Tatsache, daß Pestiviren nicht durch einen sauren pH-Wert inaktiviert werden, läßt zwei mögliche Schlüsse zu. Entweder die konformationellen Änderungen der pestiviralen Glykoproteine in Anwesenheit eines sauren pH-Wertes sind reversibel oder aber BVDV liegt extrazellulär nicht metastabil vor, sondern wird durch zusätzliche Faktoren stabilisiert.

Virale Fusionsproteine werden in zwei verschiedene Klassen eingeteilt: die Klasse I-Fusionsproteine, zu denen das Influenza-Hämagglutinin gehört, aber auch die Fusionsproteine von Paramyxoviren, Retroviren und Filoviren und die Klasse II-Fusionsproteine, zu denen das E-Protein

der Flaviviren und das E1-Protein der Alphaviren gezählt werden (Heinz et al., 2001). Die konformationellen Änderungen in viralen Fusionsproteinen, unabhängig davon, ob sie im Endosom oder an der Zelloberfläche stattfinden, werden durch eine energetisch vorteilhafte Reaktion vom metastabilen in einen stabilen Zustand getrieben. Die strukturelle Umwandlung von metastabilem zu stabilem Zustand bedarf eines bestimmten Stimulus, der in Form der zusätzlichen Protonierung der Glykoproteine oder der Rezeptor- bzw. Korezeptorbindung bereitgestellt wird. Bei Flavi- und Alphaviren ist die zusätzliche Protonierung durch den angesäuerten endosomalen pH-Wert allein der auslösende Faktor für die Konformationsänderung des E-Proteins (Flaviviren) bzw. des E1-Proteins (Alphaviren). Das E-Protein des TBE-Virus („tick borne encephalitis virus“) liegt bei neutralem pH-Wert als Homodimer vor, eine kurze Ansäuerung führt jedoch zu einer irreversiblen Bildung von Homotrimeren (Heinz et al., 2001). Das E1 des SFV liegt als Heterodimer mit E2 vor, durch Ansäuerung des pH-Wertes kommt es auch hier zu einer Umlagerung zu Homotrimeren (Wahlberg et al., 1992). Eine Möglichkeit, die Metastabilität endosomal aufgenommener Viren zu überprüfen, ist die „fusion from without“. Dabei werden adsorbierte Virionen kurz einem sauren Milieu ausgesetzt, dadurch wird eine konformationelle Umlagerung der viralen Glykoproteine induziert und dadurch die Fusion mit der Zellmembran herbeigeführt.

Als Beispiel für eine reversible Konformationsänderung der viralen Glykoproteine gehört das Glykoprotein G der Rhabdoviren in keine der beiden genannten Klassen viraler Fusionsproteine. Für G ist ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen drei verschiedenen Konformationen beschrieben (Gaudin, 2000). Auch hier ist ein saurer pH-Wert (5,8-6,0) essentielle Voraussetzung für eine erfolgreiche Fusion und pH-Werte  $<6,7$  führen zu einer Inaktivierung des Virus. Im Gegensatz zu anderen behüllten Viren ist diese Inaktivierung allerdings vollständig durch Rekonstitution bei pH 7,0 reversibel. Der eigentliche Mechanismus der Fusion von Rhabdoviren ist allerdings dem von Influenzavirus sehr ähnlich (Gaudin, 2000). Daher ist zu vermuten, daß eine „fusion from without“, obwohl sie für Rhabdoviren bislang nicht beschrieben wurde, möglich ist.

Die Tatsache, daß eine „fusion from without“ von SinV auf MDBK-Zellen durch saure pH-Werte < 6,0 induzierbar war, eine „fusion from without“ von BVDV allerdings nicht, sprach gegen eine reversible Konformationsänderung des Fusionsproteins von BVDV. Auch diese hätte theoretisch nach Ansäuerung des Milieus zur Fusion mit der Zellmembran und zu einer produktiven Infektion führen sollen. Damit zeigte sich, daß BVDV wahrscheinlich extrazellulär nicht in einem metastabilen Zustand vorliegt, wie er für Flavi- und Alphaviren bekannt ist. Die viralen Glykoproteine werden vermutlich zusätzlich stabilisiert, so daß die endosomale Azidifizierung alleine nicht ausreicht, die für die Fusion essentielle konformationelle Umlagerung einzuleiten.

Vorläufige Ergebnisse deuten daraufhin, daß BVDV E2 den bCD46-bindenden Ligand des Virus darstellt (Himmelreich, 2003). Welche pestiviralen Glykoproteine darüberhinaus welcher Funktion im Invasionsprozeß zugeordnet werden können, insbesondere die Identität des pestiviralen Fusionsproteins, konnte noch nicht bestimmt werden. Auf der Basis von Sequenzvergleichen zwischen dem Flavivirus TBEV, Hepatitis C Virus und dem Virus der Klassischen Schweinpest (KSPV) wurde kürzlich postuliert, daß eine N-terminale Domäne des Glykoproteins E2 von KSPV als Fusionspeptid dient (Garry et al., 2003). Diese Hypothese wurde allerdings noch nicht experimentell bestätigt. Biochemische Analysen der viralen Strukturproteine ergaben, daß alle pestiviralen Glykoproteine intermolekulare Disulfidbrücken aufweisen (Thiel, H. J. et al., 1991). Sowohl E<sup>ms</sup> als auch E2 kommen als Homodimer vor, E1 tritt als Heterodimer mit E2 auf.

Die Tatsache, daß durch Addition von 10mM DTT die pH-Stabilität von BVDV NADL um 90% vermindert werden konnte, zeigte, daß die angesprochenen Disulfidbrücken eine Stabilisierung des extrazellulären Zustands bewirken könnten. Allerdings wurden auch 10% der Virionen durch 10mM DTT nicht beeinflusst. In der Literatur ist beschrieben, daß Konzentrationen von 2-5mM DTT ausreichen um die Entstehung von Disulfidbrücken im Endoplasmatischen Retikulum zu verhindern. Es ist allerdings davon auszugehen, daß die Reduktion bestehender Disulfidbrücken höhere Konzentrationen von DTT erfordert und z.B. von der Tertiär- und Quartärstruktur des

jeweiligen Proteins abhängt. Insofern könnte die Reduktionskapazität von 10mM DTT zu gering sein, um allen Virionen bei saurem pH-Wert eine Konformationsänderung zu ermöglichen.

Im endolysosomalen System herrscht ein reduzierendes Milieu, welches durch das Verhältnis Cystein:Cystin (reduziert:oxidiert) bestimmt wird. Das Verhältnis der Reaktionspartner wird durch passive Diffusion von Cystein aus dem Zytoplasma und aktiven Transport von Cystin ins Zytoplasma reguliert. Da bei saurem pH das absolute Redoxpotential bei gleichbleibendem Verhältnis der Reaktionspartner geringer wird als bei neutralem pH, wird dieses Verhältnis bei zunehmender Azidifizierung angepaßt, um das absolute Redoxpotential konstant zu halten (Pillay et al., 2002). Diese Anpassung wird durch aktiven Transport von Cystin aus dem endolysosomalen System erreicht. Eine wichtige Rolle bei der endosomalen Reduktion von Disulfidbrücken könnte zusätzlich eine Familie von Thiol-Reduktasen (Disulfid-Isomerasen) spielen, welche die Reduktion von Disulfidbrücken katalysieren und im endo- und lysosomalen Degradationsapparat identifiziert wurden (Arunachalam et al., 2000).

Die Erzeugung eines reduzierenden Milieus durch Addition von 10 mM DTT zum sauren pH-Wert verminderte nicht nur die pH-Stabilität von BVDV, sie erlaubte auch eine geringgradige „fusion from without“ auf MDBK-Zellen. Die Fusionsaktivität lag maximal bei ca. 0,4% der adsorbierten Virionen, was einen sehr geringen Wert im Vergleich zu den ca. 80% Fusionsaktivität von SinV bei pH 5,0 darstellt. Nimmt man allerdings den Grad der Inaktivierung durch saures Milieu als Maßstab, in welchem Umfang die konformationelle Umlagerung der Glykoproteine stattgefunden hat, so wird eine vollständige Konformationsänderung bei SinV schon durch pH 5,0 induziert (Infektiosität 0%). Dagegen kann für BVDV selbst bei pH 4,0 + 10mM DTT noch über 10% Infektiosität beobachtet werden und demzufolge hat bei pH 5,0 vermutlich nur bei einem Teil der adsorbierten Viren überhaupt eine Konformationsänderung stattgefunden. Ein weiterer Faktor, der die Auswertung des Experiments erschwert, ist die Tatsache, daß DTT in Konzentrationen von 10mM toxisch auf die Zellen wirkt.

Durch Erzeugung eines reduzierenden Milieus in Verbindung mit saurem pH-Wert können BVD Virionen, die an die Zellmembran adsorbiert sind, zur Fusion mit dieser angeregt werden. Diese Eigenschaft von BVDV, unter reduzierenden Bedingungen zur „fusion from without“ fähig zu sein, ist ein starker Hinweis auf eine Beteiligung der inter-, eventuell auch intramolekularen, viralen Disulfidbrücken an der Stabilisierung der extrazellulär vorliegenden Virionen. Dies ist ein fundamentaler Unterschied zu den Mechanismen, wie sie von Flavi- und Alphaviren bekannt sind. Im Vermehrungszyklus dieser beiden wird der metastabile Zustand durch proteolytische Spaltung mit Furin bzw. Furin-artigen Proteasen schon während der Virusmorphogenese erzeugt. Bei Alphaviren wird das Vorläuferprotein p62 prozessiert (Lobigs et al., 1990), bei Flaviviren wird das preM gespalten (Kuhn et al., 2002). In Tabelle 1 sind beispielhaft Unterschiede in Mechanismus und Lokalisierung der energetischen Zustände der viralen Glykoproteine unterschiedlicher Virusgenera aufgelistet.

Virus	Zustand	Mechanismus		Mechanismus	
		stabil	metastabil	stabil	metastabil
Alphaviren	intrazellulär	proteolytische Spaltung	extrazellulär	saurer pH	endosomal
Flaviviren	intrazellulär	proteolytische Spaltung	extrazellulär	saurer pH	endosomal
Rhabdoviren	reversibel	saurer pH	reversibel	saurer pH	endosomal
Pestiviren	intra- / extrazellulär	<b>Reduktion der Disulfidbrücken</b>	endosomal	saurer pH	endosomal

**Tabelle 1:** Vergleichende Übersicht von Lokalisierung und Mechanismen der energetischen Aktivierung viraler Glykoproteine unterschiedlichen Ursprungs

Alpha- und Flaviviren, bei denen die Proteolyse unterbleibt (z.B. durch Mutation der Spaltstelle) sind nicht zur Konformationsänderung durch saure pH-Werte in der Lage. Im Glykoprotein E2 von BVDV NADL befinden sich zwar zwei potentielle Furinspaltstellen, allerdings gibt es bislang keine experimentellen Evidenzen, daß an diesen Stellen tatsächlich eine Spaltung erfolgt.

Die Aktivierung von BVDV zum metastabilen Zustand findet offenbar im endosomalen Lumen statt, da bei einer Aktivierung auf der Zelloberfläche die „fusion from without“ möglich sein sollte.

---

Für Pestiviren ist bislang nichts über eine späte Spaltung (während der Invasion) der viralen Glykoproteine bekannt. Zusätzlich oder an Stelle der Reduktion der inter- bzw. intramolekularen Disulfidbrücken ist auch eine Aktivierung der Metastabilität durch proteolytische Prozessierung im endolysosomalen System denkbar, um die Fusion zu initiieren. Eine große Anzahl verschiedener, pH-stabiler Proteasen, die meist eine recht geringe Spaltspezifität aufweisen, wurden im Endosom identifiziert (Pillay et al., 2002).

Trotz der Unterschiede zwischen BVDV und SinV in der Aktivierung des metastabilen Zustands war die Internalisierungskinetik beider Viren auf MDBK-Zellen fast identisch. Von der Clathrin-abhängigen Endozytose ist bekannt, daß endozytierte Partikel nach ca. 5-10 Minuten das späte Endosom erreichen, nach ca. 15 Minuten das Lysosom (Lodish et al., 1996). In Anbetracht dieser Tatsache verdeutlichte die Invasionskinetik von BVDV auf MDBK-Zellen, daß die Invasion von BVDV einen überraschend langsamen Prozeß darstellt. Die Evaluierung der Kinetik mit SinV zeigte, daß es sich hierbei allerdings vermutlich um eine zellspezifische Eigenschaft der MDBK-Zellen handelt. Für Influenza-Virus ist beschrieben, daß nach ca. 20-35 Minuten ca. 50% des Hämagglutinins (HA) in einer pH-induzierten veränderten Konformation vorlag, die zur Fusion führte, während die anderen 50% in der Ursprungsform beobachtet werden konnten (Murphy et al., 1982). Daraus ergibt sich, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Endozytose von Viren nicht unbedingt die mechanische Ein- und Abschnürung von Vesikeln zu sein scheint, sondern vermutlich eher die Einleitung der Konformationsänderung viraler Glykoproteine. Die Ähnlichkeit der Internalisierungskinetik von BVDV und SinV läßt allerdings auch darauf schließen, daß die zusätzlich erforderliche Aktivierung des metastabilen Zustands von BVDV ein Prozeß ist, der die Internalisierung nicht merklich verzögert.

#### 4.2.) Charakterisierung der CRIB-Zellen

CRIB-Zellen entstanden während einer Infektion mit einer hohen Dosis des zytopathogenen BVDV-Stamms „Singer“ und einer darauffolgenden Kultivierung (Flores et al., 1995; Flores et al., 1996). Schon bei der Erstbeschreibung wurde die Hypothese vertreten, daß eine Mutation den Phänotyp der CRIB-Zellen verursacht, die essentiell und spezifisch einen zentralen Faktor des Invasionsprozesses von Pestiviren betrifft. Eine Eingrenzung und Identifizierung des durch Mutation veränderten Faktors verspricht neue Einblicke in den pestiviralen Invasionsprozeß.

Der zelluläre Bindungsrezeptor für BVDV ist kürzlich identifiziert worden (Maurer et al., 2004). Das bovine CD46 vermittelt auf heterologen Zellen Virusbindung und ist in der Lage, die Empfänglichkeit porziner Zellen gegenüber BVDV um den Faktor 100 zu erhöhen. Das völlige Fehlen eines solchen Bindungsrezeptors auf CRIB-Zellen wäre die naheliegendste Erklärung der vorliegenden Daten. Mit besonderem Augenmerk auf bCD46 sollte insofern eine genauere Charakterisierung des Defekts der CRIB-Zellen vorgenommen werden.

Das bCD46 zeigte sich auf CRIB-Zellen in ähnlicher Menge und Verteilung wie auf MDBK-Zellen. Proteinbiochemische Analysen ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen bCD46<sub>CRIB</sub> und bCD46<sub>MDBK</sub>. Zur Klärung der Funktionalität von bCD46<sub>CRIB</sub> wurde das entsprechende Gen kloniert, sequenziert und in heterologen Zellen exprimiert. In der Sequenzanalyse konnten keine Unterschiede zum bCD46<sub>MDBK</sub> festgestellt werden. Das in SK6-Zellen exprimierte bCD46<sub>CRIB</sub> erhöhte in gleichem Maße die Empfänglichkeit gegenüber BVDV und die Bindung von BVDV wie bCD46<sub>MDBK</sub>. Die Komplementation der CRIB-Zellen mit bCD46<sub>MDBK</sub> bewirkte keine Änderung des gegen BVDV resistenten Phänotyps. Es ist daher sicher, daß bCD46 nicht den gegen BVDV resistenten Phänotyp der CRIB-Zellen verursacht. Die Tatsache, daß CRIB-Zellen auch gegen andere Pestiviren vollständig resistent sind, die das bCD46 nicht als Bindungsrezeptor nutzen (z.B. KSPV, BDV), spricht ebenfalls dafür, daß ein anderer, für

die Invasion aller Pestiviren essentieller Faktor für den Phänotyp der CRIB-Zellen verantwortlich ist.

Es ist beschrieben, daß die Resistenz der CRIB-Zellen durch den fehlenden LDL-Rezeptor (LDL-R) verursacht wird (Agnello et al., 1999). In dieser Veröffentlichung wurde der LDL-R auch als zellulärer Rezeptor von BVDV und von Hepatitis C Virus postuliert. Der LDL-R gilt als Prototyp des Clathrin-abhängig endozytierten Rezeptors, der bei saurem pH-Wert von seinem Ligand dissoziiert und wieder zur Zellmembran zurücktransportiert wird.

Die vorliegenden Daten zur Expression und Funktionalität des LDL-R zeigten aber eindeutig, daß auch auf CRIB-Zellen ein funktioneller LDL-R exprimiert wird. Es konnte mittels Immunhistochemie und Immunoblot eindeutig die Präsenz des LDL-R und mittels Internalisierung von Fluoreszenz-markiertem LDL auch die Funktion des LDL-R nachgewiesen werden. Die BVDV Infektion auf MDBK-Zellen wurde in früheren Experimenten durch einen gegen humanen LDL-R gerichteten monoklonalen Antikörper nicht beeinflußt. Damit konnten die drei experimentellen Evidenzen, daß 1) gegen humanen LDL-R gerichtete monoklonale Antikörper in der Lage sind, die BVDV Infektion zu inhibieren, 2) auf CRIB-Zellen in der Immunfluoreszenz kein LDL-R nachzuweisen ist und 3) in CRIB-Zellen kein Fluoreszenz-markiertes LDL internalisiert wird (Agnello et al., 1999) widerlegt werden. Aufgrund dessen muß auch die Beteiligung des LDL-R an der BVDV Infektion insgesamt angezweifelt werden. Jedenfalls stellt der LDL-R nicht den fehlenden bzw. defekten Faktor der CRIB-Zellen dar.

Eine genauere Lokalisierung der für den Phänotyp der CRIB-Zellen verantwortlichen Mutation wurde durch die Untersuchung der [<sup>3</sup>H]-BVDV-Bindung ermöglicht. Obwohl funktionelles bCD46 in ausreichender Menge auf CRIB-Zellen exprimiert wird, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen CRIB- und MDBK-Zellen. Für die Virusbindung bei 37°C konnte der inhibitorische Einfluß der mAk's anti-bCD46 als statistisch signifikant abgesichert und damit die Beteiligung des bCD46 an der Bindung von BVDV NADL auch auf CRIB-Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich, daß die Virusbindung auf CRIB-Zellen im Vergleich zu MDBK-Zellen deutlich

reduziert war. Aus den Ergebnissen der molekularen Charakterisierung des bCD46<sub>CRIB</sub> ging hervor, daß diese verminderte Virusbindungskapazität der CRIB-Zellen nicht durch Mutation(en) im eigentlichen Bindungsrezeptor verursacht wird.

Gleichzeitig erscheint es unwahrscheinlich, daß Faktoren, die erst im Endosom in den Invasionsprozeß von BVDV eingreifen, die Virusbindung beeinflussen. Insofern lassen diese Ergebnisse vermuten, daß der mutierte Faktor ein Bestandteil der Plasmamembran ist oder zumindest mit dieser in Verbindung steht. Es wäre denkbar, daß der mutierte Faktor der CRIB-Zellen die Virusbindung durch Interaktion mit bCD46 stabilisiert.

Zur Klärung der Frage, ob die Internalisierung von BVDV in CRIB-Zellen gestört ist, war eine genaue Differenzierung zwischen adsorbiertem und endozytiertem Virus notwendig. Diese Differenzierung war auf MDBK-Zellen möglich, in denen die Vesikelabschnürung chemisch blockiert wurde (z.B. durch  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin). Falls in CRIB-Zellen tatsächlich die Internalisierung von BVDV von der Mutation betroffen ist, sollten sich MDBK-Zellen nach  $\beta$ -MCD-Präinkubation verhalten wie CRIB-Zellen. Aufgrund der geringeren Virusbindung der CRIB-Zellen konnten diese mit  $\beta$ -MCD-präinkubierten MDBK-Zellen nur anhand einer Internalisierungskinetik, nicht anhand absoluter Zahlen internalisierter Virionen verglichen werden. Für diese Untersuchungen eignete sich [<sup>3</sup>H]-BVDV nicht, da eine zellassoziierte Radioaktivität von ca. 1-2% selbst bei Kontrollzellen (SK6 (T), BHK) immer gemessen werden konnte. Diese Hintergrundradioaktivität wurde vermutlich durch Bindung oder Aufnahme freier Radioaktivität verursacht und liegt in der nicht ausreichenden Aufreinigung des radioaktiv markierten Virus begründet. Um die Spezifität zu erhöhen und den Versuch gleichzeitig sensitiver zu gestalten, wurde die Detektion von pestiviraler RNA mittels Taq-Man-PCR eingeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, spezifisch RNA-Moleküle eines bestimmten Genombereichs von Pestiviren zu detektieren. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt theoretisch bei ca. 100-1000 RNA-Molekülen/Ansatz. Bei einem Verhältnis von ca. 50 Genomäquivalenten pro Plaque bildender Einheit (PFU) entsprechen diese Anzahl RNA-Moleküle also 2-20 PFU, die man in einer Probe

nachweisen kann. Tatsächlich lag die untere Nachweisgrenze bei ca. 50 PfU pro Probe. Demgegenüber entsprechen die in den Bindungsversuch eingesetzten 6000 cpm ca.  $2 \times 10^7$  PfU BVDV NADL. Die Taq-Man-PCR ist damit deutlich sensitiver als die Detektion des radioaktiv markierten Virus.

Durch Präinkubation mit  $\beta$ -MCD konnte die Virusinternalisierung auf MDBK-Zellen der von CRIB-Zellen angeglichen werden. Das läßt vermuten, daß die Blockade der Vesikelabschnürung auf MDBK-Zellen durch  $\beta$ -MCD dem Defekt der CRIB-Zellen in Bezug auf die BVDV Invasion entspricht. Das würde bedeuten, daß die Mutation der CRIB-Zellen verhindert, daß an bCD46 adsorbierte Virionen in Clathrin-bedeckte Vesikel gelangen bzw. transportiert werden können. Auch die Untersuchung der Internalisierung von [ $^3$ H]-BVDV in CRIB-Zellen ließ die Schlußfolgerung zu, daß vermutlich die Internalisierung von BVDV in CRIB-Zellen gestört ist. Gleichzeitig deuten aber die Bindungsergebnisse an, daß die für den Phänotyp der CRIB-Zellen verantwortliche Mutation die extrazelluläre Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle beeinflusst.

Den CRIB-Zellen fehlt wahrscheinlich ein für die Internalisierung essentieller Faktor. Dieser fehlende Faktor ließ sich jedoch mit Hilfe von PEG umgehen, da PEG eine Infektion mit BVDV ermöglichte. Über PEG ist bekannt, daß es sowohl die Virusbindung beeinflussen kann (Gripone et al., 1993; Hoekstra et al., 1989) als auch die Virus-Zell-Fusion stimulieren kann (Asanaka et al., 1993; Herrmann et al., 1993). Für die Infektion der CRIB-Zellen mit BVDV vermuteten Flores et al., daß das PEG nicht zu einer vermehrten oder verstärkten Virusbindung führte, sondern Invasionsschritte nach der Adsorption stimulierte (Flores et al., 1996). Eigene Experimente, in denen bei CRIB-Zellen durch Bafilomycin A1 ca. 85% der PEG-vermittelten Infektion mit BVDV NADL blockiert werden konnten, bestätigten dies. Dadurch wurde gezeigt, daß auch die PEG-induzierte Infektion der CRIB-Zellen von einem sauren pH-Wert im Endosom abhängig ist, also vermutlich durch PEG die Internalisierung mittels Clathrin-abhängiger Endozytose stimuliert wird. Die partielle Aufhebung der Resistenz der CRIB-Zellen gegenüber BVDV durch die PEG-Wirkung spricht dafür, daß ohne PEG die normale Internalisierung mittels Clathrin-abhängiger Endozytose

blockiert ist. Da CRIB-Zellen LDL internalisieren können und LDL mittels Clathrin-abhängiger Endozytose internalisiert wird, ist diese in CRIB-Zellen nicht gestört. Der mutierte Faktor stellt also wahrscheinlich ein Bindeglied zur Clathrin-abhängigen Endozytose dar, die die virusspezifische Internalisierung von gebundenem BVDV vermitteln.

Die Funktion dieses in CRIB-Zellen fehlenden Faktors entspricht der allgemeinen Definition eines Corezeptors. Corezeptoren sind definiert als zelluläre Faktoren, die entweder an das native Virion oder an das durch die Rezeptorbindung konformationell veränderte Virion binden können und eine wichtige Rolle im viralen Invasionsprozeß spielen (Young, 2000). Als Corezeptoren sind beispielsweise eine Familie von Chemokinrezeptoren für das Humane Immundefizienz Virus (HIV) beschrieben (Berger et al., 1999). HIV bindet zunächst an den primären Bindungsrezeptor CD4 und dann an einen der beschriebenen Corezeptoren (CXCR-4, CCR-5), wodurch eine Konformationsänderung induziert wird. Erst durch diese Konformationsänderung wird das eigentliche Fusionspeptid freigesetzt und die Fusion mit der Zellmembran kann beginnen. Ebenso sind für Adenoviren bestimmte Integrine beschrieben, die zwar die Internalisierung vermitteln, nicht aber die Virusbindung (Wickham et al., 1993).

Da für das humane CD46 gezeigt wurde, daß es aktiv von der Endozytose ausgeschlossen bzw. aussortiert wird (Maisner et al., 1997) und an der Zelloberfläche akkumuliert, stellt sich die Frage, wie das Virus in die Endosomen gelangt. Ein Corezeptor könnte auch diese Frage einleuchtend beantworten.

Für viele Viren wird die Wirtsspezifität durch den Bindungsrezeptor determiniert. Dies wurde zuerst für Poliovirus beschrieben (Holland, 1961), wird aber seitdem bei immer mehr Viren beobachtet. Die Wirtsspezifität von Pestiviren erstreckt sich sowohl in vivo als auch in Zellkultur fast ausschließlich auf Angehörige der Ordnung *Artiodactyla*, also der Paarhufer. BVDV kann das porcine CD46 nicht als zellulären Rezeptor nutzen (nicht veröffentlicht), trotzdem werden aber Schweinezellen infiziert. Weiterhin werden Zelllinien, die nicht dem Wirtsspektrum entsprechen, auch durch Expression von bCD46 nicht empfänglich gegenüber einer BVDV Infektion. Daher muß

die Wirtsspezifität der Pestiviren durch andere Faktoren als den zellulären Rezeptor determiniert sein. Im Hinblick auf die Resistenz der CRIB-Zellen gegenüber allen Pestiviren wäre der mutierte Faktor ein idealer Kandidat für einen pestiviralen Corezeptor, der maßgeblich an der Wirtsspezifität aller Pestiviren beteiligt sein könnte.

Aufgrund dieser Überlegungen kann folgende Arbeitshypothese aufgestellt werden:

BVDV bindet zunächst an die Zelle, wobei vermutlich verschiedene Bindungsrezeptoren benutzt werden können. Der hauptsächlich benutzte Rezeptor ist das bovine CD46, aber alternative Rezeptoren wie beispielsweise Heparansulfat können durchaus eine Rolle spielen. Es bleibt noch unklar, ob die Virusbindung an bCD46 durch weitere zelluläre Membranbestandteile stabilisiert wird und welche zellulären Mechanismen einen Einfluß auf diese Bindung ausüben. Aus der Tatsache, daß bCD46<sub>CRIB</sub> als Bindungsrezeptor funktionell, gleichzeitig aber die Virusbindung deutlich reduziert ist, kann aber abgeleitet werden, daß eine Beeinflussung der Bindung durch weitere zelluläre Faktoren wahrscheinlich ist. Nach der Bindung an den Bindungsrezeptor rekrutiert das Virion einen oder mehrere weitere zelluläre Faktoren. Diese sind dafür verantwortlich, daß das an bCD46 adsorbierte Virion in die Endosomen gelangen kann. Da BVDV wahrscheinlich via Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert wird, müssen der oder die weiteren zellulären Faktoren insbesondere ein Bindeglied zwischen bCD46 und den „clathrin coated pits“ darstellen. Das Virion wird anschließend vermutlich zusammen mit diesem zellulären Faktor (Corezeptor) clathrin-abhängig endozytiert. Im Verlauf der Reifung der Endosomen wird sowohl ein reduzierendes Milieu erzeugt als auch eine sukzessive Ansäuerung des endosomalen Lumens. Im Endosom kommt es daher zunächst zu einer Aktivierung des noch im stabilen Zustand befindlichen Virions. Erst im metastabilen Zustand wird durch die endosomale Azidifizierung eine Konformationsänderung der viralen Glykoproteine induziert. Diese bewirkt eine Exposition des viralen Fusionspeptids und danach kann der Fusionsprozeß der viralen und der endosomalen Membran beginnen.

## 5.) Zusammenfassung

Der Invasionsmechanismus von BVDV wurde unter besonderer Berücksichtigung des Penetrationsmechanismus und der Charakterisierung der CRIB-Zellen untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- 1.) Mittels verschiedener biomechanischer (Dynamamin), chemischer (Chlorpromazin und  $\beta$ -Methylcyclodextrin) und biophysikalischer (intrazelluläre  $K^+$ -Depletion und Hyperosmolarität) Inhibitionsmethoden wurde die Rolle der rezeptorvermittelten Endozytose bei der Invasion von BVDV untersucht. Jede dieser Methoden führte zu einer Hemmung der BVDV Infektion. Damit wurde eindeutig gezeigt, daß BVDV mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen wird. Obwohl keine dieser Methoden spezifisch ausschließlich die Clathrin-abhängige Endozytose hemmt, spricht die Kombination dieser Ergebnisse dafür, daß es sich bei der Internalisierung von BVDV um Clathrin-abhängige Endozytose handelt.
- 2.) BVDV benötigt ein saures endosomales Milieu für eine Infektion, zeigt aber keine Empfindlichkeit gegenüber niedrigen pH-Werten, wie es für andere endosomal aufgenommene, behüllte RNA-Viren beschrieben ist. Diese pH-Stabilität war in Kombination mit einer Reduktion der viralen Disulfidbrücken deutlich abgeschwächt. Zusätzlich wurde gezeigt, daß BVD Virionen nach erfolgter Adsorption nur in Anwesenheit reduzierender Substanzen mit der Zellmembran fusionieren konnten. Damit konnte der Gegensatz von pH-Stabilität und pH-Abhängigkeit auf eine mögliche Stabilisierung des Virions durch intermolekulare Disulfidbrücken der viralen Glykoproteine zurückgeführt werden. Diese Stabilisierung stellt einen fundamentalen Unterschied zu den Invasionsmechanismen anderer behüllter RNA-Viren dar.
- 3.) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen bewiesen, daß bCD46<sub>CRIB</sub> als zellulärer Rezeptor für BVDV funktionell ist und damit als Ursache der Resistenz der CRIB-Zellen nicht in Frage kommt. Die Existenz und Funktion des LDL-Rezeptors in CRIB-Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen und damit als Ursache der Resistenz ausgeschlossen. Mittels Bindungs- und Internalisierungstests wurde gezeigt, daß CRIB-Zellen signifikant weniger BVD Virus binden können als MDBK-Zellen und kein BVDV internalisieren. MDBK-Zellen, deren Vesikelabschnürung blockiert war, zeigten ein identisches Internalisierungsprofil wie CRIB-Zellen. Die vermutliche Lokalisation der für den Phänotyp der CRIB-Zellen verantwortlichen Mutation konnte damit auf die Zellmembran eingeschränkt werden.

## 6.) Summary

The invasion of BVDV was analysed with focus on the mechanism of penetration and the characterization of CRIB-cells. The following results were obtained:

- 1.) The role of receptor-mediated endocytosis in BVDV invasion was determined by different biomechanical (dynamin), chemical (chlorpromazine and  $\beta$ -methyl-cyclodextrin) and biophysical (intracellular potassium depletion and hyperosmolarity) inhibition methods. Each method resulted in an inhibition of BVDV infection of MDBK cells, which clearly shows, that BVDV is internalized into host cell by receptor-mediated endocytosis. Although none of these methods exclusively affect clathrin-dependent endocytosis, in combination these data strongly suggest that internalization of BVDV into host cell is a clathrin-dependent process.
- 2.) BVDV requires an acidic endosomal environment to infect host cells, but at the same time BVDV exhibits no sensitivity to low pH-exposure. This sensitivity is typical for other enveloped RNA-viruses using receptor-mediated endocytosis. The pH-stability of BVDV was decreased by reducing agents. Adsorbed BVD virions can fuse pH-dependently with the cellular membrane only in the presence of reducing agents. Likely the virion is stabilized by intermolecular disulfide bridges of the viral glycoproteins. This stabilization constitutes a fundamental difference to the invasion mechanisms of other enveloped RNA-viruses.
- 3.) Molecular and biochemical analysis of bCD46<sub>CRIB</sub> revealed, that the molecule can act as a functional cellular receptor for BVDV and thus can be ruled out as the causal mutation of the resistance of the CRIB-cells. The presence and function of the LDL-receptor in CRIB-cells was demonstrated, indicating that the LDL-receptor is not the reason for the resistance as well. By the use of binding and internalization assays CRIB-cells were shown to bind significantly lower amounts of BVD virus than MDBK-cells and to be unable to internalize BVDV. MDBK-cells, in which endosome formation is blocked, with respect to BVDV internalization behave like CRIB-cells. The mutation responsible for the phenotype of CRIB-cells is likely localized at the plasma membrane.

## 7.) Literatur

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22), 12766-71.
- Arunachalam, B., Phan, U. T., Geuze, H. J., and Cresswell, P. (2000). Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2), 745-50.
- Asanaka, M., and Lai, M. M. (1993). Cell fusion studies identified multiple cellular factors involved in mouse hepatitis virus entry. *Virology* **197**(2), 732-41.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H. J., and Becher, P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* **286**(2), 456-65.
- Barlow, R. M., Rennie, J. C., Gardiner, A. C., and Vantsis, J. T. (1980). Infection of pregnant sheep with the NADL strain of bovine virus diarrhoea virus and their subsequent challenge with Border disease IIB pool. *J Comp Pathol* **90**(1), 67-72.
- Bayer, N., Schober, D., Huttinger, M., Blaas, D., and Fuchs, R. (2001). Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. *J Biol Chem* **276**(6), 3952-62.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., Konig, M., Baroth, M., and Thiel, H. J. (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* **262**(1), 64-71.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., Konig, M., and Thiel, H. J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* **78** ( Pt 6), 1357-66.
- Becher, P., Orlich, M., and Thiel, H. J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* **72**(6), 5165-73.

- Becher, P., Shannon, A., Tautz, N., and Thiel, H. J. (1994). Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology* **198**(2), 542-51.
- Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700.
- Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., and Driscoll, P. C. (1999). Endocytosis: How dynamin sets vesicles PHree! *Curr Biol* **9**(8), R301-4.
- Cassell, S., Edwards, J., and Brown, D. T. (1984). Effects of lysosomotropic weak bases on infection of BHK-21 cells by Sindbis virus. *J Virol* **52**(3), 857-64.
- Chan, D. C., and Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**(5), 681-4.
- Collett, M. S., Anderson, D. K., and Retzel, E. (1988a). Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol* **69** ( Pt 10), 2637-43.
- Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K., and Retzel, E. (1988b). Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**(1), 200-8.
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K., and Purchio, A. F. (1988c). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* **165**(1), 191-9.
- Collett, M. S., Wiskerchen, M., Welniak, E., and Belzer, S. K. (1991). Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch Virol Suppl* **3**, 19-27.
- Corapi, W. V., Donis, R. O., and Dubovi, E. J. (1990). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* **51**(9), 1388-94.
- Corver, J., Ortiz, A., Allison, S., Schalich, J., Heinz, F., and Wilschut, J. (2000). Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology* **269**(1), 37-46.

- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., and Schmid, S. L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**(4), 915-34.
- Damke, H., Binns, D. D., Ueda, H., Schmid, S. L., and Baba, T. (2001). Dynamin gtpase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *Mol Biol Cell* **12**(9), 2578-89.
- Day, P. M., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**(1), 1-11.
- Depner, K., Bauer, T., and Liess, B. (1992). Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev Sci Tech* **11**(3), 885-93.
- DeTulleo, L., and Kirchhausen, T. (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. *Embo J* **17**(16), 4585-93.
- Dunne, H. W. (1973). Hog cholera (European swine fever). *Adv Vet Sci Comp Med* **17**, 315-59.
- Edwards, S., Fukusho, A., Lefevre, P. C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehe, P., and Westergaard, J. (2000). Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol* **73**(2-3), 103-19.
- Enzmann, P. J., and Weiland, F. (1978). Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses. *Arch Virol* **57**(4), 339-48.
- Flores, E. F., and Donis, R. O. (1995). Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology* **208**(2), 565-75.
- Flores, E. F., Kreutz, L. C., and Donis, R. O. (1996). Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. *J Gen Virol* **77**(Pt 6), 1295-303.
- Garry, R. F., and Dash, S. (2003). Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* **307**(2), 255-65.
- Gaudin, Y. (2000). Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J Cell Biol* **150**(3), 601-12.

- Gripon, P., Diot, C., and Guguen-Guillouzo, C. (1993). Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* **192**(2), 534-40.
- Hansen, G. H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L. K., Laude, H., Sjostrom, H., and Noren, O. (1998). The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol* **72**(1), 527-34.
- Hansen, S. H., Sandvig, K., and van Deurs, B. (1993). Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* **121**(1), 61-72.
- Heinz, F. X., and Allison, S. L. (2000). Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res* **55**, 231-69.
- Heinz, F. X., and Allison, S. L. (2001). The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol* **4**(4), 450-5.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K., and Fries, E. (1980). On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* **84**(2), 404-20.
- Herrmann, A., Clague, M. J., and Blumenthal, R. (1993). Enhancement of viral fusion by nonadsorbing polymers. *Biophys J* **65**(1), 528-34.
- Heuser, J., and Anderson, R. (1989). Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* **108**(2), 389-400.
- Hilgard, P., and Stockert, R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* **32**(5), 1069-77.
- Himmelreich, A. (2003). Justus-Liebig-Universität, Giessen. Molekulare Charakterisierung der Interaktion zwischen dem zellulären Rezeptor CD46 und dem viralen Liganden von BVDV

- Hoekstra, D., Klappe, K., Hoff, H., and Nir, S. (1989). Mechanism of fusion of Sendai virus: role of hydrophobic interactions and mobility constraints of viral membrane proteins. Effects of polyethylene glycol. *J Biol Chem* **264**(12), 6786-92.
- Holland, J. J. (1961). Receptor affinities as major determinants of enterovirus tissue tropisms in humans. *Virology* **15**, 312-26.
- Horzinek, M., Maess, J., and Laufs, R. (1971). Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* **33**(3), 306-18.
- Horzinek, M., Reczko, E., and Petzoldt, K. (1967). On the morphology of hog cholera virus. *Arch Gesamte Virusforsch* **21**(3), 475-8.
- Hourcade, D., Holers, V. M., and Atkinson, J. P. (1989). The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol* **45**, 381-416.
- Hulst, M. M., and Moormann, R. J. (1997). Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol* **78**(Pt 11), 2779-87.
- Hulst, M. M., van Gennip, H. G., Vlot, A. C., Schooten, E., de Smit, A. J., and Moormann, R. J. (2001). Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J Virol* **75**(20), 9585-95.
- Iqbal, M., Flick-Smith, H., and McCauley, J. W. (2000). Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol* **81**(Pt 2), 451-9.
- Kielian, M., and Jungerwirth, S. (1990). Mechanisms of enveloped virus entry into cells. *Mol Biol Med* **7**(1), 17-31.
- Konig, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R., and Thiel, H. J. (1995). Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* **69**(10), 6479-86.

- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., and Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**(5), 717-25.
- Larkin, J. M., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Anderson, R. G. (1983). Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* **33**(1), 273-85.
- Liszewski, M. K., and Atkinson, J. P. (1992). Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol* **178**, 45-60.
- Lobigs, M., and Garoff, H. (1990). Fusion function of the Semliki Forest virus spike is activated by proteolytic cleavage of the envelope glycoprotein precursor p62. *J Virol* **64**(3), 1233-40.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1996). "Molekulare Zellbiologie." 2 Walter de Gruyter, Berlin
- Madhus, I., Sandvig, K., Olsnes, S., and van Deurs, B. (1987). Effect of reduced endocytosis induced by hypotonic shock and potassium depletion on the infection of Hep 2 cells by picornaviruses. *J Cell Physiol* **131**(1), 14-22.
- Maisner, A., Zimmer, G., Liszewski, M. K., Lublin, D. M., Atkinson, J. P., and Herrler, G. (1997). Membrane cofactor protein (CD46) is a basolateral protein that is not endocytosed. Importance of the tetrapeptide FTSL at the carboxyl terminus. *J Biol Chem* **272**(33), 20793-9.
- Marsh, M., and Bron, R. (1997). SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. *J Cell Sci* **110**(Pt 1), 95-103.
- Marsh, M., and Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res* **36**, 107-51.
- Martin, G., Pilon, A., Albert, C., Valle, M., Hum, D. W., Fruchart, J. C., Najib, J., Clavey, V., and Staels, B. (1999). Comparison of expression and regulation of the high-density lipoprotein receptor SR-BI and the low-density lipoprotein receptor in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells. *Eur J Biochem* **261**(2), 481-91.

- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* **91**(3 Pt 1), 601-13.
- Maurer, K. (2002). Justus-Liebig-Universität, Giessen. Identifizierung eines zellulären Rezeptors für das Virus der bovinen viralen Diarrhoe (BVDV): Reinigung, Klonierung und Expression
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H. J., and Rumenapf, T. (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J Virol* **78**(4), 1792-9.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- Meyers, G., and Thiel, H. J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res* **47**, 53-118.
- Moennig, V., and Plagemann, P. G. (1992). The pestiviruses. *Adv Virus Res* **41**, 53-98.
- Murphy, B. R., Hinshaw, V. S., Sly, D. L., London, W. T., Hosier, N. T., Wood, F. T., Webster, R. G., and Chanock, R. M. (1982). Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. *Infect Immun* **37**(3), 1119-26.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**(5), 473-83.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., and Tussen, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**(2), 260-8.
- Perez, L., and Carrasco, L. (1994). Involvement of the vacuolar H(+)-ATPase in animal virus entry. *J Gen Virol* **75**(Pt 10), 2595-606.
- Pho, M. T., Ashok, A., and Atwood, W. J. (2000). JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* **74**(5), 2288-92.
- Pillay, C. S., Elliott, E., and Dennison, C. (2002). Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* **363**(Pt 3), 417-29.

- Plowright, W. (1969). *Joint Campaign Against Rinderpest. First Technical Review Meeting, Phase IV, Mogadiscio, Kenya.*
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A., and Collett, M. S. (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**(1), 750-4.
- Post, T. W., Liszewski, M. K., Adams, E. M., Tedja, I., Miller, E. A., and Atkinson, J. P. (1991). Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med* **174**(1), 93-102.
- Purcell, D. F., Russell, S. M., Deacon, N. J., Brown, M. A., Hooker, D. J., and McKenzie, I. F. (1991). Alternatively spliced RNAs encode several isoforms of CD46 (MCP), a regulator of complement activation. *Immunogenetics* **33**(5-6), 335-44.
- Reid, K. B., Bentley, D. R., Campbell, R. D., Chung, L. P., Sim, R. B., Kristensen, T., and Tack, B. F. (1986). Structural and functional studies on C4b-binding protein, a regulatory component of the human complement system. *Immunol. Today* **7**, 230.
- Rice, C. M. (1996). Flaviviridae: The viruses and their replication. In "Fields Virology" (P. M. Howley, Ed.), Vol. 3, pp. 931-959. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Richterova, Z., Liebl, D., Horak, M., Palkova, Z., Stokrova, J., Hozak, P., Korb, J., and Forstova, J. (2001). Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol* **75**(22), 10880-91.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., and Dubovi, E. J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* **205**(1), 66-74.
- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J., and Bredenbeek, P. J. (1997). Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol* **71**(1), 451-7.
- Riley, R. C., Kemper, C., Leung, M., and Atkinson, J. P. (2002). Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **62**(4), 534-46.

- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H. J., and Tautz, N. (2001). A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J Virol* **75**(19), 9470-82.
- Rodal, S., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* **10**(4), 961-74.
- Roizman, B., and Palese, P. (1996). Multiplication of viruses. An overview. 3 ed. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. 101-112. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M., and Thiel, H. J. (1998). N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol* **72**(3), 2544-7.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H., and Thiel, H. J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* **67**(6), 3288-94.
- Saatkamp, H. W., Berentsen, P. B., and Horst, H. S. (2000). Economic aspects of the control of classical swine fever outbreaks in the European Union. *Vet Microbiol* **73**(2-3), 221-37.
- Schelp, C., Greiser-Wilke, I., Wolf, G., Beer, M., Moennig, V., and Liess, B. (1995). Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch Virol* **140**(11), 1997-2009.
- Shaw, I. G., Winkler, C. E., and Terlecki, S. (1967). Experimental reproduction of hypomyelinogenesis congenita of lambs. *Vet. Rec.* **81**, 115-116.
- Shusta, E. V., Zhu, C., Boado, R. J., and Pardridge, W. M. (2002). Subtractive expression cloning reveals high expression of CD46 at the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**(7), 597-604.
- Sieczkarski, S. B., and Whittaker, G. R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**(Pt 7), 1535-45.

- Snyers, L., Zwickl, H., and Blaas, D. (2003). Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **77**(9), 5360-9.
- Stark, R., Meyers, G., Rumenapf, T., and Thiel, H. J. (1993). Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**(12), 7088-95.
- Superti, F., Seganti, L., Ruggeri, F. M., Tinari, A., Donelli, G., and Orsi, N. (1987). Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells. *J Gen Virol* **68** ( Pt 2), 387-99.
- Tardieu, M., Epstein, R. L., and Weiner, H. L. (1982). Interaction of viruses with cell surface receptors. *Int Rev Cytol* **80**, 27-61.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E., and Thiel, H. J. (1996). Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *J Virol* **70**(11), 7851-8.
- Thiel, H., Plagemann, P., and Moennig, V. (1996). Pestiviruses. 3rd ed. In "Fields Virology", pp. 1059 -1069.
- Thiel, H. J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T., and Meyers, G. (1991). Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* **65**(9), 4705-12.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**(3), 1476-83.
- Vantsis, V. T., Linklater, K. A., Rennie, J. C., and Barlow, R. M. (1979). Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of border disease. *J. Comp. Path.* **89**, 331-339.
- Wahlberg, J. M., and Garoff, H. (1992). Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *J Cell Biol* **116**(2), 339-48.
- Wang, L. H., Rothberg, K. G., and Anderson, R. G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**(5), 1107-17.

- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., and Thiel, H. J. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* **66**(6), 3677-82.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rüménapf, T., Meyers, G., and Thiel, H. J. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* **64**(8), 3563-9.
- Wengler, G., Bradley, D. W., Collett, M. S., Heinz, F. H., Schlesinger, R. W., and Strauss, J. H. (1995). Flaviviridae. In "Virus Taxonomy" (F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers, Eds.), Vol. Sixth Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Verlag, Wien, New York.
- White, J., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (1980). Fusion of Semliki forest virus with the plasma membrane can be induced by low pH. *J Cell Biol* **87**(1), 264-72.
- White, J. M., and Littman, D. R. (1989). Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**(5), 725-8.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., and Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**(2), 309-19.
- Xue, W., and Minocha, H. C. (1993). Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J Gen Virol* **74**(Pt 1), 73-9.
- Young, J. A. T. (2000). Virus entry and uncoating. 4 ed. In "Fields Virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. 87-104. Lippincott-Raven, Philadelphia.

## **Eigene Publikationen:**

Teile der vorgelegten Arbeit wurden veröffentlicht in:

Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H. J., and Rumenapf, T. (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* **78**(4), 1792-9.