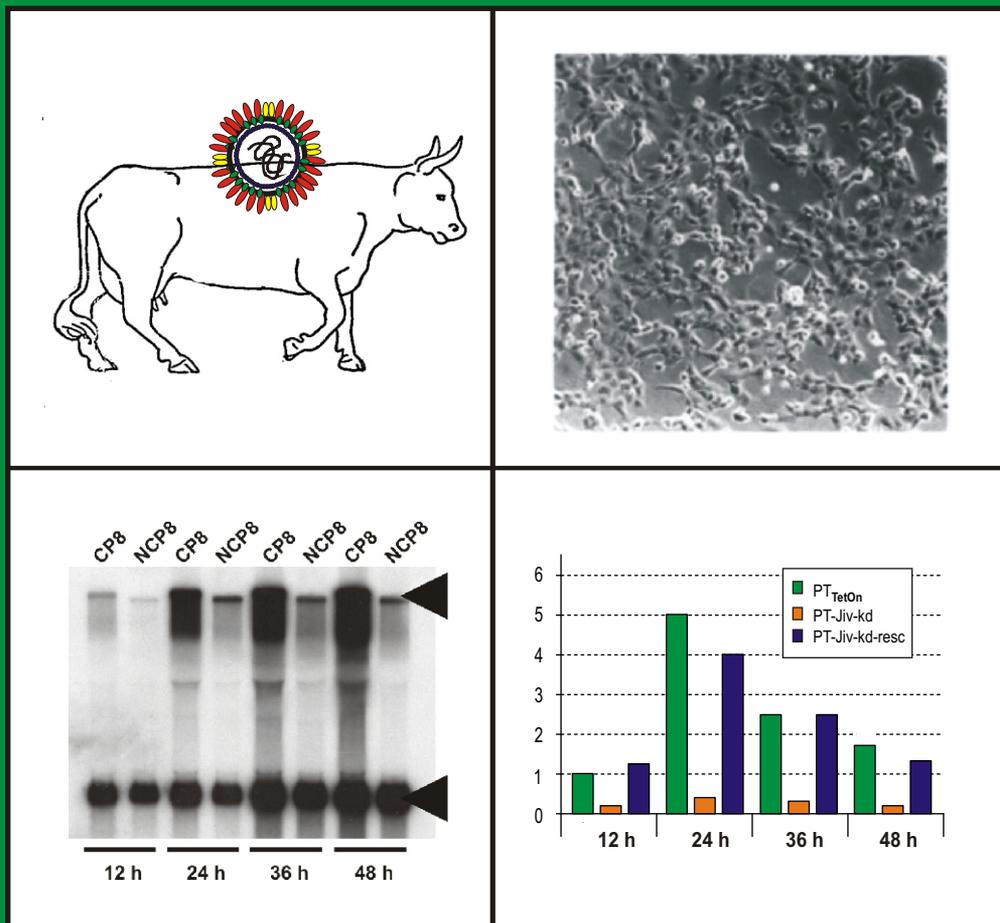


EINFLUSS DES ZELLULÄREN J-DOMÄNEN-PROTEINS JIV AUF DIE REPLIKATION VON PESTIVIREN

ALEXANDRA MÜLLER



INAUGURAL-DISSERTATION

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2005

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

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin

Betreuer: HD Dr. Norbert Tautz

**Einfluss des zellulären J-Domänen-Proteins Jiv
auf die Replikation von Pestiviren**

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

eingereicht von
Alexandra Müller
Tierärztin aus Groß-Gerau

Gießen 2005

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: HD Dr. Norbert Tautz
Prof. Dr. Joachim Roth

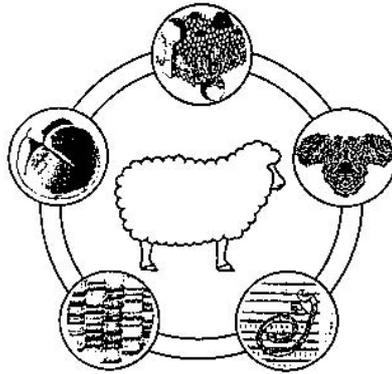
Tag der Disputation: 12.12.2005

Ich erkläre:

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

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

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



Graduiertenkolleg 455



Sonderforschungsbereich 535

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ und des Sonderforschungsbereiches 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Müller, A., Rinck, G., Thiel, H.-J. and Tautz, N. (2003) Cell-derived sequences in the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J Virol*, **77**, 10663-10669.

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

Lackner, T., Müller, A., König, M., Thiel, H.-J., and Tautz, N. (2005) Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol*, **79**, 9746-9755.

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS.....	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
3	EINLEITUNG	9
3.1	Die Familie <i>Flaviviridae</i>.....	9
3.1.1	Mitglieder der Virusfamilie.....	9
3.1.2	Allgemeine Eigenschaften	10
3.2	Pestiviren	11
3.2.1	Taxonomie und Wirtsspektrum	11
3.2.2	Eigenschaften von Pestiviren.....	12
3.2.3	Genom und Proteine.....	15
3.2.3.1	Genom und Polyprotein	15
3.2.3.2	Virale Strukturproteine	17
3.2.3.3	Virale Nichtstrukturproteine	19
3.2.4	Replikation	24
3.3	Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease (BVD/MD)	26
3.3.1	Bedeutung	26
3.3.2	Pathogenese.....	26
3.3.3	Diagnostik	30
3.3.4	Bekämpfung.....	31
3.3.5	Grundlagen der Zytopathogenität	33
3.3.5.1	Zytopathogene Pestiviren mit Insertionen zwischen NS2 und NS3	35
3.3.5.2	Zytopathogene Pestiviren mit Mutationen im NS2	39
3.3.5.3	Zytopathogene BVD-Viren mit Jiv-Insertionen	40
3.4	Das Jiv-Protein	42
3.5	Border Disease der Schafe.....	45
3.6	Europäische Schweinepest.....	45
3.7	Zielsetzung der Arbeit.....	47

4	MATERIAL UND METHODEN	48
4.1	Material.....	48
4.1.1	Geräte.....	48
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	49
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien	49
4.1.4	Enzyme	51
4.1.5	Kits.....	51
4.1.6	Basis-Plasmide	52
4.1.7	Jiv-Expressionsplasmide	53
4.1.8	PCR-Primer	53
4.1.9	Realtime-PCR-Primer	53
4.1.10	Realtime-PCR-Sonden	54
4.1.11	Eukaryontische Zellen.....	54
4.1.12	Viren	54
4.1.13	<i>E. coli</i> K12-Stämme	55
4.1.14	Antikörper und Seren	55
4.1.15	Lösungen und Puffer.....	56
4.2	Methoden	59
4.2.1	Arbeiten mit DNA	59
4.2.1.1	Präparation kompetenter Bakterien	59
4.2.1.2	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	59
4.2.1.3	Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen und Konzentrationsbestimmung	60
4.2.1.4	Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken.....	61
4.2.1.5	Agarosegel-Elektrophorese von DNA und Isolation von DNA- Fragmenten	64
4.2.1.6	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i>	65
4.2.1.7	PCR, RT-PCR und Klonierung in pGEM-T	67
4.2.1.8	Gerichtete Mutagenese	69
4.2.1.9	Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen	71
4.2.2	Arbeiten mit Zellen	73
4.2.2.1	Allgemeine Zellkultur-Techniken.....	73

4.2.2.2 T7-Vacciniavirus-Expressionssystem und radioaktive Proteinmarkierung	75
4.2.2.3 Infektion von Zellen u. Wachstumskurven („ <i>Time course</i> “).....	77
4.2.2.4 Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen	77
4.2.2.5 Immunfluoreszenz	79
4.2.2.6 Erstellung von Zelllinien durch stabile Transfektion	80
4.2.2.7 Kryokonservierung von Zellen	81
4.2.3 Arbeiten mit Proteinen	82
4.2.3.1 Radioimmunpräzipitation	82
4.2.3.2 SDS-PAGE und Autoradiographie	83
4.2.3.3 Westernblot („ <i>semi-dry</i> “-Verfahren)	84
4.2.4 Arbeiten mit RNA	86
4.2.4.1 <i>In vitro</i> -Transkription	86
4.2.4.2 RNA-Präparation und Konzentrationsbestimmung	87
4.2.4.3 Agarosegel-Elektrophorese von RNA und Northernblot	89
4.2.4.4 Phosphorimager-Auswertung von Northernblots	91
4.2.4.5 Nachweis von siRNA im Northernblot.....	92
4.2.4.6 Quantitative Realtime-RT-PCR.....	93
5 ERGEBNISSE.....	95
5.1 Proteinprozessierung von BVDV CP8	95
5.1.1 Die Genomstruktur des zp BVDV-Stammes CP8	95
5.1.2 N-terminale Polyproteinprozessierung von BVDV CP8.....	96
5.1.3 NS3-Expression bei BVDV CP8.....	101
5.2 Vergleich der Replikation von BVDV CP8 und NCP8.....	105
5.3 Einfluss des zellulären Jiv-Proteins auf die Replikation von Pestiviren .	107
5.3.1 Zelllinien mit verändertem Jiv-Spiegel	108
5.3.1.1 Erstellung der Zelllinie PT _{TetOn}	108
5.3.1.2 Unterdrückung der zellulären Jiv-Expression mittels RNA- Interferenz	110
5.3.1.3 Erstellung der Jiv-„ <i>knockdown</i> “-Zelllinie PT-Jiv-kd	110
5.3.1.4 Das Jiv-„ <i>escape</i> “-Plasmid pTRE-Jiv-esc1	113

5.3.1.5	Erstellung der Jiv-, <i>rescue</i> “-Zelllinie PT-Jiv-kd-resc.....	114
5.3.1.6	Die Zelllinien PT-Jiv-kd-GSTJiv90 und PT _{TetOn} -GSTJiv90W39A	115
5.3.2	BVDV-Replikation in Jiv-überexprimierenden Zellen	115
5.3.3	BVDV-Replikation in Zellen mit reduziertem Jiv-Spiegel.....	117
5.3.3.1	Spezifität der beobachteten Effekte	121
5.3.4	Replikation anderer Pestiviruspezies in Jiv-reduzierten Zellen	124
5.4	Versuch der Herstellung einer dominant-negativen Jiv-Mutante.....	127
5.5	Einfluss der BVDV-Infektion auf die Jiv-Expression.....	128
6	DISKUSSION.....	129
6.1	Der zytopathogene BVDV-Stamm CP8.....	129
6.2	Das zelluläre J-Domänen-Protein Jiv	132
6.3	Die NS2-Autoprotease und ihre Bedeutung für nzp BVDV.....	133
6.4	Jiv als Kofaktor der NS2-Autoprotease.....	134
6.5	Einfluss des zellulären Jiv-Proteins auf die Replikation von Pestiviren .	134
6.5.1	BVDV-Replikation in Zellen mit verändertem Jiv-Spiegel	134
6.5.2	Jiv-Abhängigkeit verschiedener Pestivirus-Spezies.....	137
6.5.3	Mechanismus der Replikationsregulation durch Jiv	139
6.5.4	Folgen der Jiv-Abhängigkeit	141
6.6	Versuch der Herstellung einer dominant-negativen Jiv-Mutante.....	143
6.7	Einfluss der BVDV-Infektion auf die Jiv-Expression.....	145
6.8	Ausblick	146
7	ZUSAMMENFASSUNG	149
8	SUMMARY.....	151
9	LITERATURVERZEICHNIS	153
10	DANKSAGUNG	167

2 Abkürzungsverzeichnis

aa	"amino acids", Aminosäuren
A	Ampere (Einheit der Stromstärke); Adenosin (nt)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BDV	Border Disease Virus
BHK	"baby hamster kidney"-Zellen, Hamsternierenfibroblasten
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhö
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (nt); Core (Kapsidprotein)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	"copy-DNA", zur RNA komplementäre DNA
cINS	zelluläre Insertion (cellular insertion); frühere Bezeichnung für Jiv
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Ci	Curie
CIP	"calf intestine phosphatase", alkalische Phosphatase
CSFV	Virus der klassischen Schweinepest
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
Cy3	Cyanogen 3
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"

Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
E	"Envelope protein"; Hüllprotein in der Virusmembran
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F	Farad, Einheit der elektrischen Kapazität
f	femto (10^{-15})
FCS	"fetal calf serum", fötales Kälberserum
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GABA(A)-RAP	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GKID ₅₀	Gewebekultur-infektiöse Dosis 50%
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
Hcc	"hepatocellular carcinoma", hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HSP	"heat shock protein", Hitzeschockprotein
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IRD800	"Infrared Dye" 800
IRES	"internal ribosome entry site", interne Ribosomeneintrittsstelle
Jiv	"J-domain protein interacting with viral protein"
Jiv90	90 Aminosäuren-Fragment des zellulären Jiv
kb	Kilobasen
kD	kDa, Kilo-Dalton, Einheit der Proteinmasse
l	Liter

LB	Luria-Bertani-Medium
LC-3	"light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B"
M	Molar
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
mAK	monoklonaler Antikörper
MD	"Mucosal Disease"
MDBK	"Madin Darby Bovine Kidney"-Zellen, Rindernierenfibroblasten
min	Minuten
MOI	"multiplicity of infection", Anzahl infektiöser Viren pro Zelle
mRNA	"messenger-RNA"
n	nano (10^{-9})
NADL	"National Animal Disease Laboratory"
NB	Northernblot
NEDD8	"neural precursor cell-expressed developmentally downregulated" 8
N ^{pro}	N-terminale Protease
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
nzp	nicht zytopathogen
OD600	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	"open reading frame", offenes Leseraster
p	pico (10^{-12})
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	"phosphate buffered saline", phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach der Infektion
PI	persistently infiziert
PNK	Polynukleotidkinase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QC	QuikChange®, Methode zur gerichteten DNA-Mutagenese
RIP	Radioimmunpräzipitation

RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SMT3B	suppressor of MIF2 mutation 3B
ssRNA	"single-stranded RNA", Einzelstrang-RNA
tRNA	"transfer-RNA"
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TRE	"tetracyclin responsive element"
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
UCH	"ubiquitin-C-terminal hydrolase"
UTR	"untranslated region", nicht-translatierte Region einer RNA
UV	ultraviolette elektromagnetische Strahlung
V	Volt (Einheit der Spannung)
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
W	Watt (Einheit der Leistung)
WB	Westernblot
w/v	Gewichtprozent
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
zp	zytopathogen
ZPE	zytopathischer Effekt

3 Einleitung

3.1 Die Familie *Flaviviridae*

Viren werden aufgrund verschiedener Hauptkriterien, die v.a. den Genomaufbau betreffen (DNA oder RNA, einzelsträngig oder doppelsträngig, positive oder negative Strangorientierung, kontinuierlich oder segmentiert, Anordnung viraler Gene), in unterschiedliche Familien eingeteilt. Weitere Kriterien für die Zuordnung sind die Form der Viruspartikel (Kapside) sowie das Vorhandensein oder Fehlen einer Hüllmembran. Innerhalb der einzelnen Familien erfolgt die Einteilung in Genera und Spezies überwiegend aufgrund der Ähnlichkeit der Genomsequenzen, teilweise auch anhand serologischer Kriterien.

Die Mitglieder der Familie *Flaviviridae* sind Einzelstrang-RNA-Viren mit positiver RNA-Polarität (Heinz et al., 2005); diese werden drei verschiedenen Genera zugeordnet: *Flavivirus*, *Hepacivirus* und *Pestivirus*.

3.1.1 Mitglieder der Virusfamilie

Zum Genus *Flavivirus* gehören unter anderem das namensgebende Gelbfiebervirus sowie das Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) - Virus und das West-Nil-Virus. Eine Gemeinsamkeit dieser Viren ist die Übertragung durch Arthropoden (Insekten und Spinnentiere); auf diese Weise übertragene Viren werden auch als Arboviren bezeichnet. Das Genus *Hepacivirus* besteht aus dem humanpathogenen Hepatitis C-Virus (HCV) und dem früher als Hepatitis G-Virus (HGV) bezeichneten GB-Virus-B (GBV-B), das als vorläufige Spezies diesem Genus zugeordnet wurde (Heinz et al., 2005). Das Genus *Pestivirus* umfasst verschiedene Tierseuchenerreger, auf die unten genauer eingegangen wird. Außerdem gehören zu dieser Virusfamilie auch die bisher noch keinem Genus zugeordneten GB-Viren GBV-A und GBV-C (Leary et al.,

1996; Muerhoff et al., 1995; Simons et al., 1995). Obwohl GBV-C-Infektionen beim Menschen häufig vorkommen, konnte bisher noch kein Zusammenhang zu einer Erkrankung hergestellt werden. Das in Lymphozyten replizierende GBV-C wird besonders oft bei HIV-infizierten Patienten nachgewiesen und ist bei diesen mit einer deutlich verlängerten Überlebenszeit verbunden (Stapleton, 2003; Williams et al., 2004).

3.1.2 Allgemeine Eigenschaften

Alle Mitglieder der *Flaviviridae* haben einige gemeinsame Eigenschaften (Meyers und Thiel, 1996):

Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA mit positiver Strangorientierung (Plusstrang-RNA) und ist in der Regel zwischen 9,1 und 12,5 kb lang. Die in ihrer Orientierung einer mRNA entsprechende genomische RNA kodiert in einem einzigen offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) ein Polyprotein; dieses Vorläuferprotein wird während und nach der Translation von zelleigenen und viralen Proteasen in die reifen Proteine gespalten. Am 5'- und am 3'-Ende des Genoms befinden sich jeweils nicht-translatierte Regionen (NTRs). Im Gegensatz zur genomischen RNA der Flaviviren, welche am 5'-Ende eine *Cap*-Struktur aufweist, fehlt diese bei Pestiviren und Hepaciviren; den Translationsstartpunkt in den Genomen dieser Viren legt stattdessen eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) fest.

Die Virionen haben einen Durchmesser von 40-60 nm. Sie enthalten neben der genomischen RNA das Nukleokapsidprotein C (Core) und sind von einer Lipidmembran umgeben, in die zwei bis drei Glykoproteine eingelagert sind.

3.2 Pestiviren

3.2.1 Taxonomie und Wirtsspektrum

Das Genus *Pestivirus* umfasst zur Zeit fünf Spezies (Avalos-Ramirez et al., 2001; Heinz et al., 2005; Heinz et al., 2000):

- das Virus der klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus*, CSFV)
- das Border Disease-Virus der Schafe (BDV)
- das Virus der bovinen Virusdiarrhö Typ 1 (*bovine viral diarrhoea virus*, BVDV-1)
- das Virus der bovinen Virusdiarrhö Typ 2 (*bovine viral diarrhoea virus*, BVDV-2)
- der Stamm *Giraffe-1* (vorläufige Spezies)

Pestiviren verursachen Krankheiten bei Schweinen und verschiedenen Hauswiederkäuerarten, sowie bei Wildwiederkäuern. Während natürliche Schweinepest-Infektionen nur in Wild- und Hausschweinen nachgewiesen werden konnten, haben BVDV und BDV ein breiteres Wirtsspektrum. Mit BVDV können neben Rindern auch Schweine, kleine Wiederkäuer wie Schaf und Ziege sowie verschiedene Wildwiederkäuer infiziert werden (Becher et al., 1997; Paton et al., 1995). BVDV-1 und BVDV-2 lassen sich serologisch unterscheiden. BDV wurde nicht nur aus Schafen, sondern auch aus Schweinen isoliert (Becher et al., 1999b; Becher et al., 1997). Noch unklar ist, ob die zwei Pestivirus-Isolate „Reindeer-1“ und „Bison“ eine weitere Untergruppe von BDV darstellen, oder jeweils eine neue Spezies bilden (Becher et al., 1999a). Neuere Sequenzvergleiche und serologische Untersuchungen sprechen eher für eine Klassifizierung als eigenständige Spezies (Avalos-Ramirez et al., 2001).

Die klassische Schweinepest (KSP) oder europäische Schweinepest (ESP), verursacht durch das CSFV (*classical swine fever virus*), trat

1833 in Amerika als erste durch Pestiviren ausgelöste Erkrankung in Erscheinung. Die durch BVDV ausgelösten Rinderkrankheiten bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease (BVD/MD) wurden dagegen erst in den 40er- und 50er-Jahren des vergangenen Jahrhunderts erstmals als Tierkrankheiten beschrieben (Baker et al., 1954; Hughes et al., 1959; Olafson et al., 1946; Ramsey und Chivers, 1953). Nur kurze Zeit später wurde auch die Border Disease der Schafe (BD) zum ersten Mal erwähnt (Hughes et al., 1959). Die serologische Verwandtschaft zwischen CSFV und BVDV wurde bereits früh festgestellt (Darbyshire, 1960).

Durch die Sequenzierung einer Reihe kompletter pestiviraler Genome und den Einsatz weiterer molekularbiologischer sowie biochemischer Methoden konnten mit der Zeit immer mehr Informationen zur Genomorganisation, Zusammensetzung der Virionen und Polyproteinprozessierung von Pestiviren gewonnen werden; auch konnten die Verwandtschaftsgrade der Virusspezies untereinander besser untersucht werden. Auf dieser Grundlage werden die Pestiviren heute der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet (Heinz et al., 2000), nachdem sie ursprünglich zu den *Togaviridae* (Westaway et al., 1985) gezählt worden waren.

Pestiviren sind die engsten Verwandten des humanen Hepatitis C-Virus (HCV) und der GB-Viren (Lindenbach und Rice, 2001). Da bisher noch kein Zellkultursystem zur Verfügung steht, welches eine effektive HCV-Vermehrung ermöglicht, werden Pestiviren häufig als Modellsystem für HCV verwendet.

3.2.2 Eigenschaften von Pestiviren

Ein Charakteristikum der Pestiviren ist das Auftreten von zwei Biotypen (Baker, 1987; Lindenbach und Rice, 2001). Aufgrund ihres Verhaltens in Rinderzellkulturen unterscheidet man zwischen nichtzytopathogenen (nzp) und zytopathogenen (zp) Pestiviren. Die Infektion mit zp Viren führt

zum Absterben infizierter Zellen durch Apoptose (Grummer et al., 2002; Hoff und Donis, 1997b; Schweizer und Peterhans, 1999; Zhang et al., 1996); es zeigt sich ein deutlicher zytopathischer Effekt (Corapi et al., 1988; Hoff und Donis, 1997a; Lambot et al., 1998; Pocock et al., 1987; Purchio et al., 1984; Schweizer und Peterhans, 2001; Vassilev und Donis, 2000; Zhang et al., 1996) mit Vakuolisierung und Abkuglung der Zellen, die sich schließlich aus dem Zellverband lösen. Im Gegensatz dazu verursachen nzp Viren in infizierten Rinderzellkulturen keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen.

Beim Eintritt des BVD-Virus in die Zelle dient das Oberflächenprotein CD46 als Rezeptor (Maurer et al., 2004); es gibt Hinweise auf die Existenz eines Co-Rezeptors, dieser konnte aber bisher nicht identifiziert werden. Mit Pestiviren infizierte Zellkulturen produzieren nur mäßige Virustiter; nicht alle neu gebildeten Virionen gelangen in den Überstand, viele bleiben mit den Zellen assoziiert. Die freigesetzten Virionen lagern sich häufig an Serumbestandteile und Zellen an, was eine Aufreinigung zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Partikel erschwert (Laude, 1977). In konzentrierten Virussuspensionen lassen sich behüllte Partikel mit Durchmessern zwischen 40 und 60 nm elektronenmikroskopisch darstellen (Horzinek et al., 1971; Moennig und Plagemann, 1992).

Die gereinigten Virionen bestehen aus RNA, dem Kapsidprotein C (Core) und einer Hüllmembran, in welche drei virale Glykoproteine eingelagert sind (Thiel et al., 1991). Die Glykoproteine E^{rns} und E2 konnten mittels Immun-Elektronenmikroskopie auf der Oberfläche der Virionen nachgewiesen werden (Weiland et al., 1992; Weiland et al., 1990).

Wird ein trächtiges Wirtstier mit Pestiviren infiziert, können diese die Plazentarschranke überwinden und den Embryo oder Fetus infizieren (Moennig und Plagemann, 1992; Thiel et al., 1996). Maternale Antikörper

können diese Barriere aufgrund des Aufbaus der Plazenta bei Wiederkäuern und Schweinen nicht überwinden. Der Zeitpunkt der diaplazentaren Infektion des Embryos oder Fetus und der Reifezustand seines Immunsystems zu diesem Zeitpunkt bestimmen daher die Folgen der Infektion.

Fruchtresorption, Aborte, Totgeburten, Missbildungen, Lebensschwäche, aber auch die Geburt gesunder Nachkommen sind möglich. Findet die Infektion des Fetus zu einem Zeitpunkt statt, an dem dessen Immunsystem schon weitgehend ausgereift ist, kann wie beim adulten Tier durch eine adäquate Immunantwort das Virus eliminiert werden. Findet die Infektion aber zu einem früheren Zeitpunkt (beim Rind bis etwa zum 120. Tag der Trächtigkeit) statt, ist das Immunsystem des Fetus noch nicht ausgereift und kann daher nicht mit einer Immunantwort auf die Infektion reagieren. Als Folge kann sich eine erworbene Immuntoleranz gegen dieses Virus entwickeln, indem im Rahmen der physiologischen Thymusreifung, während der Eliminierung der gegen körpereigene Antigene gerichteten B- und T-Lymphozyten, auch alle gegen das persistierende Virus gerichteten Lymphozyten eliminiert werden. Die viralen Antigene werden infolgedessen nicht als fremd erkannt, und das adaptive Immunsystem reagiert nicht mehr auf das persistierende Virus. Diese Immuntoleranz bildet sich sehr spezifisch nur gegenüber dem persistierenden Virus aus.

Das betroffene Tier bleibt lebenslang persistent infiziert (PI-Tier) und scheidet ständig große Mengen infektiöser Viren aus. Solche persistent infizierten Tiere spielen die entscheidende Rolle in der Epidemiologie der zugehörigen Krankheit, denn sie sind die Hauptquelle für neue Infektionen.

Bei Wiederkäuern können persistente Infektionen mit dem Kümern der Tiere einhergehen oder klinisch weitgehend unauffällig verlaufen, wobei

die PI-Tiere mehrere Jahre alt werden können. Persistente Infektionen bei Schweinen äußern sich dagegen häufig durch deutlich erkennbare klinische Symptome, und die betroffenen Tiere überleben höchstens einige Monate (Meyers und Thiel, 1996).

Im Gegensatz zu den diaplazentaren Infektionen verlaufen BVDV- oder BDV-Infektionen, die nach der Geburt stattfinden, bei Wiederkäuern meist klinisch unauffällig oder mit nur milden Symptomen (Thiel et al., 1996). Eine Ausnahme bilden dabei horizontale Infektionen mit besonders virulenten BVDV-2-Stämmen, die zum sogenannten Hämorrhagischen Syndrom (s.u.) führen können.

Horizontale Schweinepest-Infektionen verursachen meist deutliche Symptome, auch wenn sich die klinischen Verlaufsformen in neuerer Zeit immer weniger charakteristisch darstellen (Meyers und Thiel, 1996).

3.2.3 Genom und Proteine

3.2.3.1 Genom und Polyprotein

Das aus einer RNA positiver Polarität bestehende pestivirale Genom ist etwa 12,3 Kilobasen (kb) groß (Becher et al., 1998; Collett et al., 1988a; Deng und Brock, 1992; Meyers et al., 1989a; Renard et al., 1987; Ridpath und Bolin, 1995b; Ridpath und Bolin, 1997). Es besteht aus einem einzigen langen offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*), der von der 5'- und der 3'-nichttranslatierten Region (NTR) flankiert wird (Collett et al., 1988a; Meyers et al., 1989a; Moormann et al., 1990).

Das Genom einiger zp BVDV-Stämme kann aufgrund von Duplikationen viraler Sequenzen und Insertionen zellulärer Sequenzen eine Größe von bis zu 16,5 kb erreichen (Meyers und Thiel, 1996). Die virale RNA besitzt weder eine 5'-Cap-Struktur noch einen Polyadenylat-Schwanz am 3'-Ende und unterscheidet sich damit deutlich von der mRNA eukaryontischer Zellen.

Die Translation wird durch eine interne Ribosomenbindung an die 5'-NTR des viralen Genoms initiiert; dort befindet sich eine besonders gefaltete RNA-Struktur mit zahlreichen AUG-Tripletts oberhalb des eigentlichen Start-AUG, diese Struktur wird als interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) bezeichnet (Chon et al., 1998; Frolov et al., 1998; Myers et al., 2001; Poole et al., 1995; Rice, 1996; Rijnbrand et al., 1997; Tautz et al., 1999; Yu et al., 2000). Somit unterscheidet sich die genomische RNA von Pestiviren und HCV bezüglich der Translationsinitiation von der RNA der Flaviviren, deren Translation durch die *Cap*-Struktur am 5'-Ende vermittelt wird (Poole et al., 1995; Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Auch für die 3'-NTR konnte die Ausbildung einer charakteristischen RNA-Struktur nachgewiesen werden, welche eine essentielle Funktion für die Replikation besitzt (Yu et al., 1999).

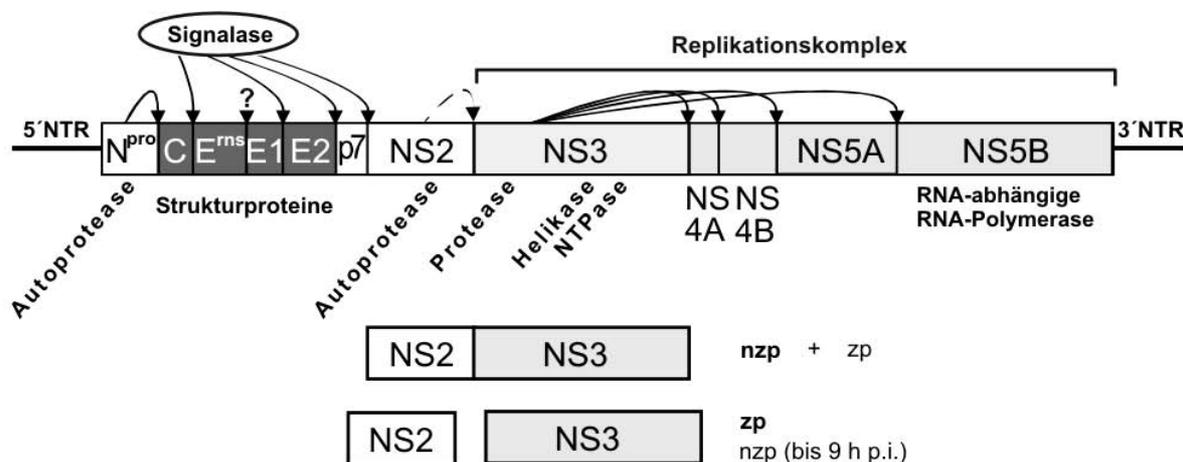


Abb. 1: Genomaufbau und Polyproteinprozessierung bei Pestiviren

Das pestivirale Genom, eine einzelsträngige RNA positiver Polarität, besteht aus einem offenen Leserahmen (ORF), der am 5'- und am 3'-Ende von einer nichttranslatierten Region (NTR) flankiert wird. Das Genom kodiert ein Polyprotein von etwa 3900 Aminosäuren, das co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen prozessiert wird (? = unbekannte Wirtszellprotease).

Zu den Strukturproteinen (dunkelgrau) gehören das Kapsidprotein C sowie die Glykoproteine E^{rns}, E1 und E2. Innerhalb der Nichtstrukturproteine (weiß und hellgrau) sind NS3, NS4A, NS4B, NS5A und die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B Bestandteile des Replikationskomplexes (hellgrau).

Abhängig vom Verhalten in der Zellkultur werden zytopathogene (zp) und nichtzytopathogene (nzp) Pestiviren unterschieden. Der zp Biotyp ist dabei im Gegensatz zum nzp Biotyp mit der Freisetzung großer Mengen NS3 verbunden.

Die gesamte virale Replikation läuft im Zytoplasma der Wirtszelle ab. Die virale RNA kann nach dem Eindringen in die Zelle direkt als Matrize für die Proteinsynthese benutzt werden. Der offene Leserahmen kodiert für ein Polyprotein mit einer Länge von etwa 3900 Aminosäuren (AS). Diese Art der Proteinexpression über ein oder mehrere Polyproteine als Vorläufer ist typisch für viele Plusstrang-RNA-Viren (Kräusslich und Wimmer, 1988). Aus dem Polyprotein entstehen durch mehrere ko- und posttranslationale, von zellulären und viralen Proteasen katalysierte Prozessierungsschritte, schließlich zwölf reife virale Proteine (Abb. 1).

3.2.3.2 Virale Strukturproteine

Das Kapsidprotein C (Core) wird N-terminal durch die Autoprotease N^{pro} und C-terminal durch das zelluläre Enzym Signalase (Signalpeptidase) aus dem Polyprotein freigesetzt. Es enthält viele basische Aminosäuren, die im Kapsid für die Interaktion mit der viralen RNA verantwortlich sind. Die Signalase ist eine an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisierte Protease, deren Funktion im zellulären Stoffwechsel die Entfernung der Signalpeptide von den N-terminalen Enden der in das ER translatierten Proteine ist. Eine Signalsequenz direkt vor E^{ms} führt zur Translokation des folgenden Proteinabschnittes in das ER-Lumen. Die viralen Struktur-Glykoproteine E^{ms}, E1 und E2, sowie das hydrophobe Protein p7 werden ebenfalls durch die Signalase freigesetzt, wobei die Spaltung zwischen E^{ms} und E1 durch eine unbekannte zelluläre Protease vermittelt wird (Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000; Lin et al., 1994; Rümenapf et al., 1993). Das E in der Bezeichnung der Strukturproteine steht für Hülle (*envelope*). Bisher wurde p7 nicht in Virionen gefunden (Harada et al., 2000), weshalb es zu den Nichtstrukturproteinen gezählt wird. Die Spaltung zwischen E2 und p7 ist unvollständig; daher lässt sich in infizierten Zellen auch ein E2/p7-Fusionsprotein nachweisen; es handelt sich hierbei um ein stabiles

Protein und nicht um ein ungespaltenes Vorläuferprotein von E2 und p7 (Harada et al., 2000). Wird die Spaltung zwischen E2 und p7 unterbunden, werden keine infektiösen Virionen gebildet; RNA-Replikation ist jedoch weiterhin möglich. Ungespaltene E2/p7 ist hingegen nicht essentiell. (Harada et al., 2000).

In E1 und E2 konnten Strukturen identifiziert werden, welche für die Membranverankerung dieser Proteine verantwortlich sind (Rümenapf et al., 1993; van Zijl et al., 1991). Der Mechanismus der Membranbindung von E^{rns} war lange unklar; kürzlich wurde jedoch eine ungewöhnliche Membranankerstruktur in der C-terminalen Region des E^{rns} festgestellt (Fetzer et al., 2005). Alle drei Glykoproteine können über Disulfidbrücken miteinander interagieren. In infizierten Zellen und in Virionen können E^{rns}-Homodimere, E1/E2-Heterodimere und E2-Homodimere gefunden werden (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990).

Das essentielle Strukturprotein E^{rns} befindet sich an der Virionoberfläche, wird aber von infizierten Zellen auch aktiv sezerniert (Rümenapf et al., 1991; Rümenapf et al., 1993; Thiel et al., 1991). Sowohl in der membrangebundenen als auch in der freien Form besitzt E^{rns} Ribonuklease-Aktivität (Hulst et al., 1993; Schneider et al., 1993; Windisch et al., 1996). Das Kürzel „rns“ in der Bezeichnung steht daher für sezernierte Ribonuklease (*ribonuclease secreted*). E^{rns} ist vermutlich ein Virulenzfaktor, da die Inaktivierung der RNase-Funktion zur Attenuierung von CSFV und BVDV-2 führt (Meyer et al., 2002; Meyers et al., 1999). Da E^{rns} in Abhängigkeit vom zellulären Kompartiment in unterschiedlichen Glykosylierungsformen vorkommt, besitzt es verschiedene apparente Molekulargewichte von 44 kDa bis 60 kDa (Thiel et al., 1991).

E^{rns} bindet an Glykosaminoglykane, die auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen vorkommen; diese Bindung erfolgt vermutlich

aufgrund von Zellkultur-adaptiven Mutationen im E^{ms} (Hulst und Moormann, 2001; Iqbal et al., 2000). Weiterhin besitzt dieses Strukturprotein im C-terminalen Bereich eine membranaktive Sequenz, welche eine energieunabhängige Aufnahme von E^{ms} in Zellen erlaubt (Langedijk, 2002). Neueren Untersuchungen zufolge inhibiert E^{ms} von BVDV die Interferon-Antwort der Zellen, die beispielsweise durch den Kontakt mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) ausgelöst wird. Die Produktion von Interferon, induziert durch dsRNA, dient der Zelle als Abwehrmechanismus gegen Virusinfektionen, im Laufe derer als Replikationszwischenprodukt dsRNA gebildet wird. Diesen Verteidigungsmechanismus aus dem Repertoire der „angeborenen Immunität“ (*innate immunity*) kann das virale Glykoprotein E^{ms} unterdrücken, denn es hat die Fähigkeit, dsRNA zu binden und abzubauen, wodurch es die zelluläre Reaktion auf die dsRNA verhindern kann (Iqbal et al., 2004).

E2 ist bei Pestiviren für die Bindung der Virionen an den zellulären Rezeptor CD46 verantwortlich (Maurer et al., 2004). Die meisten Virus-neutralisierenden Antikörper sind gegen Epitope des E2-Proteins gerichtet.

3.2.3.3 Virale Nichtstrukturproteine

Die N-terminale Protease N^{pro} ist ein Nichtstrukturprotein, das nur bei Pestiviren und nicht bei den anderen Genera der Familie *Flaviviridae* vorkommt. Mutationsstudien weisen darauf hin, dass N^{pro} ein Vertreter der Subtilisin-ähnlichen Proteasen ist (Rümenapf et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass N^{pro} für die Replikation von CSFV im Zellkultur-System nicht benötigt wird (Tratschin et al., 1998). Durch seine autokatalytische Aktivität trennt sich N^{pro} nach der Translation vom Rest des Polyproteins ab. Dabei wird der N-Terminus des Kapsidproteins C (Core) erzeugt (Stark et al., 1993; Wiskerchen et al., 1991).

Im Anschluss an die Strukturproteine werden die übrigen sieben der insgesamt acht pestiviralen Nichtstrukturproteine kodiert. Diese machen mehr als zwei Drittel des gesamten offenen Leserahmens (ORF) aus. Das 7 kDa kleine hydrophobe Protein p7 ist für die Bildung infektiöser Virionen essentiell, obwohl es in den Virionen selbst bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Harada et al., 2000). Es zeigt strukturelle Homologien zur den Viroporinen, einer Familie kleiner virale Peptide, die eine entscheidende Rolle bei der Reifung von Virionen spielen. Viroporine bilden durch Oligomerisierung in der Membran Ionenkanäle und führen auf diese Weise zur Destabilisierung der Membran (Carrasco, 1995; Harada et al., 2000).

Das p7-Protein von HCV ist ebenfalls essentiell für die Bildung infektiöser Virionen (Sakai et al., 2003). Nach Expression dieses Proteins in eukaryontischen Zellen oder in Bakterien wurde die Bildung von Hexameren nachgewiesen, welche Kationenkanäle bilden, die mit Amantadin oder Hexamethylenamilorid blockiert werden können (Griffin et al., 2003; Pavlovic et al., 2003; Premkumar et al., 2004; Sakai et al., 2003). Beide Substanzen wirken als Ionenkanalblocker. Amantadin hemmt z.B. auch die Funktion von Ionenkanälen des Influenza-Virus (Duff und Ashley, 1992; Hay et al., 1985) und ist in Kombination mit anderen Therapeutika wirksam gegen HCV (Griffin et al., 2003).

Auf p7 folgt im Polyprotein NS2-3. Dieses Protein wird durch eine Signalase-abhängige Spaltung zwischen p7 und NS2 und eine weitere Spaltung zwischen NS3 und NS4A, die durch die Serinprotease-Aktivität des NS3 vermittelt wird, aus dem Polyprotein freigesetzt. Die anschließende Prozessierung zu NS2 und NS3 galt bei Pestiviren im Gegensatz zu den anderen Genera der *Flaviviridae* lange als nicht obligat (Collett et al., 1988a; Meyers et al., 1991b; Meyers et al., 1992); inzwischen wurde jedoch auch für Pestiviren die Notwendigkeit der

NS2-3-Spaltung gezeigt (Lackner et al., 2004). Die Effizienz der NS2-3-Spaltung ist bei verschiedenen Pestiviren sehr unterschiedlich (Meyers und Thiel, 1996; Rice, 1996). Bezüglich des ungespaltenen NS2-3 ist bekannt, dass es für die Bildung infektiöser Virionen benötigt wird (Agapov et al., 2004). Bei autonom replizierenden Virusstämmen findet nie eine vollständige NS2-3-Spaltung statt; im Falle einer vollständigen Prozessierung von NS2-3 besteht Abhängigkeit von einem Helfervirus, welches NS2-3 *in trans* bereitstellt.

Kürzlich wurde die Protease identifiziert, die für die NS2-3-Spaltung verantwortlich ist. Es handelt sich dabei um eine Cystein-Protease im NS2, die Ähnlichkeit zur NS2-3-Protease von HCV und GB-Viren aufweist. Das freigesetzte NS3 hat Funktionen im Rahmen der Virusreplikation, die nicht vom ungespaltenen NS2-3 übernommen werden können. Daher ist die Aktivität der NS2-Protease für die Replikation von Pestiviren essentiell (Lackner et al., 2004).

Durch die Effizienz der Prozessierung von NS2-3 werden die Auswirkungen der Virusinfektion auf die infizierte Zelle festgelegt. Schon seit langem ist bekannt, dass die effiziente Bildung von freiem NS3 mit der Zytotoxizität von Pestiviren korreliert (Collett et al., 1988a; Corapi et al., 1988; Pocock et al., 1987; Purchio et al., 1984). Zytotoxische (zp) BVDV-Stämme sind gekennzeichnet durch die Bildung von freiem NS3 in großen Mengen (Meyers und Thiel, 1996) und eine gesteigerte virale RNA-Synthese (Becher et al., 2001; Mendez et al., 1998; Vassilev und Donis, 2000). NS3 kann durch NS2-3-Spaltung entstehen, aber auch durch Translation von duplizierten NS3-kodierenden Genomsequenzen und damit unabhängig von einer NS2-3-Spaltung (Meyers und Thiel, 1996). Wodurch genau die Zytotoxizität ausgelöst wird, ist noch ungeklärt. Als Ursache kommt eine direkte toxische Wirkung von NS3 in Frage, aber auch die gesteigerte

Anhäufung viraler RNA in den infizierten Zellen, infolgedessen die Zellen die Apoptose einleiten. Sicher ist, dass die viralen Proteine N^{pro}, C, E^{ns}, E1, E2 und p7 für die Festlegung des viralen Biotyps nicht essentiell sind (Tautz et al., 1999).

Kürzlich wurde ausgehend von einem zp BVD-Virus experimentell ein Virus generiert, das keinen zytopathischen Effekt auslöst, obwohl große Mengen von freiem NS3 nachgewiesen werden können. Dieses Virus besitzt eine Punktmutation im NS4B, die offensichtlich einen Wechsel zum nzp Biotyp erlaubt, obwohl alle anderen zp-typischen Eigenschaften wie NS3-Freisetzung und hohe virale RNA-Syntheserate erhalten bleiben (Qu et al., 2001). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass nicht NS3 allein, sondern ein Proteinkomplex, der NS3 enthält, die Zytopathogenität verursacht. Die Mutation im NS4B könnte diesen Komplex so verändern, dass er seine zytopathogenen Eigenschaften verliert. Die NS3-Expression allein kann daher nicht für den viralen Biotyp verantwortlich sein, zumal in der Zellkultur isoliert exprimiertes NS2-3 ebenso toxisch wirkt wie freies NS3 (N.Tautz, persönliche Mitteilung).

Auch wenn die genauen molekularen Ursachen des offensichtlich komplexen Phänomens der Zytopathogenität noch nicht vollständig geklärt sind, kann man dennoch festhalten, dass im Rahmen einer natürlichen BVDV-Infektion eine gesteigerte virale RNA-Synthese und das Vorliegen großer Mengen NS3 in der Zellkultur mit Zytopathogenität und im PI-Tier mit dem Auftreten einer tödlichen Krankheit korrelieren.

Nach Infektionen mit nzp BDV-Stämmen oder nzp CSFV-Stämmen können in infizierten Zellen im Verhältnis zu NS2-3 nur geringe Mengen an NS3 nachgewiesen werden, während bei zp Stämmen eine deutlich stärkere NS3-Expression stattfindet (Becher et al., 1994; Thiel et al., 1991). In mit zp BVDV-Stämmen infizierten Zellen überwiegt in der Regel

die Menge an NS3 gegenüber der des ungespaltenen NS2-3. Bislang ging man davon aus, dass von nzp BVDV-Stämmen in infizierten Zellen nur ungespaltenes NS2-3 exprimiert wird (Donis und Dubovi, 1987; Lindenbach und Rice, 2001; Pocock et al., 1987) und kein freies NS3 auftritt. Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch in nzp BVDV-infizierten Zellen freies NS3 entsteht, allerdings nur zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion (Lackner et al., 2004). Die NS2-Protease unterliegt einer zeitlichen Regulation, die dazu führt, dass in nzp BVDV-infizierten Zellen ab etwa 9 Stunden *post infectionem* die NS2-3-Prozessierung unter die Nachweisgrenze fällt. In zp BVDV-infizierten Zellen ist die zeitliche Regulation aufgehoben, sodass hier stets NS3 freigesetzt wird. Dabei erreichen verschiedene zp BVDV-Stämme diese Deregulation auf unterschiedliche Weise.

Ein Vergleich verschiedener Pestivirus-Spezies zeigt, dass das hydrophobe NS2 eines der variabelsten pestiviralen Proteine darstellt, während das hydrophile NS3 mit über 90% Identität auf Aminosäure-Ebene eines der am stärksten konservierten Proteine ist (Becher et al., 1994; Meyers und Thiel, 1996). NS3 ist multifunktionell, es besitzt Serinprotease-, NTPase- und Helikase-Aktivität (Bazan und Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989a; Gorbalenya et al., 1989b; Grassmann et al., 1999; Gu et al., 2000; Tamura et al., 1993; Tautz et al., 2000; Warrenner und Collett, 1995; Wiskerchen und Collett, 1991).

Die drei katalytischen Aminosäuren der Chymotrypsin-ähnlichen Serinprotease befinden sich im N-terminalen Bereich von NS3; die NTPase- und Helikase-Zentren befinden sich im zentralen Teil des Proteins. Die Helikase wird wahrscheinlich für die Entwindung der RNA-Doppelstränge bei der Genomreplikation benötigt. Die NS3-Protease ist für alle Spaltungen des Polyproteins unterhalb von NS3 verantwortlich (Bazan und Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989a; Tautz et al., 1997;

Wiskerchen und Collett, 1991; Xu et al., 1997), wobei NS4A als Kofaktor für die Spaltungen zwischen NS4B/NS5A und NS5A/NS5B benötigt wird; dazu interagiert NS4A mit dem N-terminalen Bereich von NS3 (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997). Die Spaltungen durch die NS3-Protease führen zur Freisetzung von NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (Collett et al., 1988a; Collett et al., 1991; Meyers et al., 1992). Die Spaltung zwischen NS3 und NS4A erfolgt ausschließlich *in cis*, alle übrigen Prozessierungsschritte können auch *in trans* katalysiert werden.

Die Proteine von NS3 bis NS5B bilden gemeinsam den viralen RNA-Replikationskomplex (Behrens et al., 1998; Meyers et al., 1996; Tautz et al., 1994), wobei die Funktionen von NS4B und NS5A bisher noch unbekannt sind. Für alle Proteine des Replikationskomplexes wurden Mutationen beschrieben, die eine RNA-Replikation verhindern können. Daraus kann geschlossen werden, dass alle fünf Proteine zur Replikation der viralen RNA benötigt werden (Grassmann et al., 2001); NS5A nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da es als einziges Mitglied des Replikationskomplexes *in trans* komplementiert werden kann (Grassmann et al., 2001). Subgenomische pestivirale RNAs, welche die authentischen 5'- und 3'-Enden (NTRs) aufweisen und die Proteine NS3 bis NS5B kodieren, sind in der Lage, autonom zu replizieren (Behrens et al., 1998). NS5B ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp, *RNA-dependent RNA polymerase*) des Virus (Kao et al., 1999; Lohmann et al., 1999; Steffens et al., 1999; Zhong et al., 1998).

3.2.4 Replikation

Über den genauen Mechanismus der Replikation bei Pestiviren ist nur wenig bekannt; man kann jedoch davon ausgehen, dass sie ähnlich wie bei Flaviviren und bei HCV abläuft. Nach der Adsorption an die Zelloberfläche gelangt das Virus durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle (Flores et al., 1996; Grummer et al., 2004; Krey et al., 2005).

Zur Entlassung des Virus aus dem Vesikel (Endosom) wird durch eine H^+ -Ionenpumpe in der Vesikelmembran das Endosomeninnere angesäuert. Der niedrige pH-Wert ermöglicht die Verschmelzung der Virusmembran mit der Endosomenmembran, wobei wahrscheinlich auch Glykoproteine der Virushülle beteiligt sind (Garry und Dash, 2003), und das Kapsid gelangt ins Zytoplasma. Über die Freisetzung der RNA aus dem Kapsid ist wenig bekannt.

Nach Anlagerung der Ribosomenuntereinheiten an das IRES-Element in der 5'NTR (Fletcher und Jackson, 2002) beginnt die Translation des viralen Genoms (Pestova und Hellen, 1999). Signalpeptide im Bereich der Strukturproteine sorgen für den Transport des Translationskomplexes an die Membran des ER. Nach Translation in das ER finden die Signalase-katalysierten Protein-Spaltungen zwischen C/E^{ms}, (E^{ms}/E1), E1/E2, E2/p7 und p7/NS2 statt (Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000; Thiel et al., 1993). Vermutlich bleiben alle Virusproteine mit der ER-Membran assoziiert, wo auch die Genomreplikation stattfindet.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS5B) katalysiert im Zusammenspiel mit den anderen Proteinen des Replikationskomplexes das Umschreiben des Positivstrang-Genoms in Negativstrang-RNA, die wiederum als Matrize für die Synthese von neuen Virus-Genomen dient. Die Virionen reifen höchstwahrscheinlich an intrazellulären Membranen und werden über Exozytose nach außen abgegeben (Bielefeldt Ohmann, 1988a; Bielefeldt Ohmann, 1988b; Bielefeldt Ohmann et al., 1987; Gray und Nettleton, 1987). Es wird vermutet, dass sich die Virusgenome in denjenigen Membranbereichen anlagern, wo hohe Konzentrationen an Strukturproteinen vorliegen. Es kommt zur Ausstülpung und Abschnürung von Partikel-haltigen Vesikeln in das ER-Lumen; von dort werden die Vesikel wahrscheinlich zum Golgi-Apparat transportiert und fusionieren schließlich mit der Zytoplasmamembran, wodurch die

infektiösen Virionen freigesetzt werden.

3.3 Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease (BVD/MD)

3.3.1 Bedeutung

Die BVD/MD verursacht weltweit große Verluste in der Rinderhaltung und stellt derzeit eine der bedeutendsten Rinderseuchen in Westeuropa dar; in Deutschland ist sie seit 2004 anzeigepflichtig. Vor allem durch die von BVDV verursachten Reproduktionsstörungen entstehen Jahr für Jahr erhebliche wirtschaftliche Schäden für die Landwirtschaft.

Serologische Untersuchungen ergaben, dass die Mehrzahl aller untersuchten Rinder Kontakt mit BVDV hatten (Meyers und Thiel, 1996); weltweit beträgt die Seroprävalenz abhängig von der regionalen Rinderdichte 50-90% (Moennig und Greiser-Wilke, 2003). Je nach Region sind 0,1 bis 2% aller Rinder in Deutschland persistent infiziert (PI-Tiere) (Liess et al., 1987). Diese virämischen Tiere scheiden das Virus lebenslang aus und verbreiten den Erreger mit hoher Effizienz. Wenn in einem Bestand mehr als 25% der Jungtiere serologisch positiv sind, ist davon auszugehen, dass sich ein PI-Tier im Bestand befindet. In Bayern beispielsweise liegt der Anteil von auf diese Weise ermittelten PI-verdächtigen Herden zwischen 16% und 20% (Brendel et al., 2005).

BVDV konnte außer in Rindern bereits in Schafen, Ziegen, Hirschen, Giraffen, Antilopen, Rentieren, Bisons und Büffeln sowie in Schweinen nachgewiesen werden (Becher et al., 1999a; Becher et al., 1997; Hamblin und Hedger, 1979; Nettleton, 1990).

3.3.2 Pathogenese

Die Infektion mit BVDV erfolgt meist über oronasale Aufnahme von Viren, welche von infizierten Rindern über die Körpersekrete und mit dem Kot ausgeschieden wurden. Die primäre Virusvermehrung findet in den Schleimhäuten und regionalen lymphatischen Geweben, vor allem in

den Tonsillen statt. Anschließend kommt es zur Virämie mit vorübergehender Immunsuppression und zur Infektion verschiedener Organe und Gewebe, v.a. des Verdauungstraktes und des Respirationstraktes sowie lymphatischer Gewebe (Bruschke et al., 1998). Die Tiere werden für mehrere Tage zu Virusausscheidern, bis das Virus durch das Immunsystem kontrolliert wird.

BVDV-Infektionen verlaufen bei erwachsenen Rindern meist ohne klinische Symptome und bleiben daher unbemerkt (Thiel et al., 1996). Natürliche horizontale Infektionen mit BVDV-1 können je nach Gesundheitszustand des Tieres und Virulenz des Stammes subklinisch verlaufen oder mit Leukopenie, Thrombozytopenie, Fieber, leichtem Durchfall, Atembeschwerden und/oder Immunsuppression einhergehen (Baker, 1987; Liess, 1967; Potgieter et al., 1985). Für die größten wirtschaftlichen Verluste sorgt die Infektion trächtiger Tiere, die Fruchtresorption, Aborte, Missbildungen oder die Geburt persistent infizierter Nachkommen zur Folge haben kann. Eher selten kommt es zu Infektionen mit hochvirulenten Stämmen, die zu Erkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität vor allem bei Kälbern führen. Solche Infektionen gehen mit schweren Thrombozytopenien einher, die sich durch Blutungen in Schleimhäuten und diversen inneren Organen bemerkbar machen (Rebhuhn et al., 1989). Das Krankheitsbild zeigt Ähnlichkeiten zu den bei Schweinen nach CSFV-Infektion beobachteten Symptomen (Carman et al., 1998; Corapi et al., 1990b; Corapi et al., 1989; Pellerin et al., 1995; Pellerin et al., 1994; Rebhuhn et al., 1989; Ridpath et al., 1994). Diese als Hämorrhagisches Syndrom bezeichnete Erkrankung tritt fast ausschließlich infolge von BVDV-2-Infektionen auf und wurde innerhalb der letzten Jahre auch vereinzelt in Deutschland beobachtet.

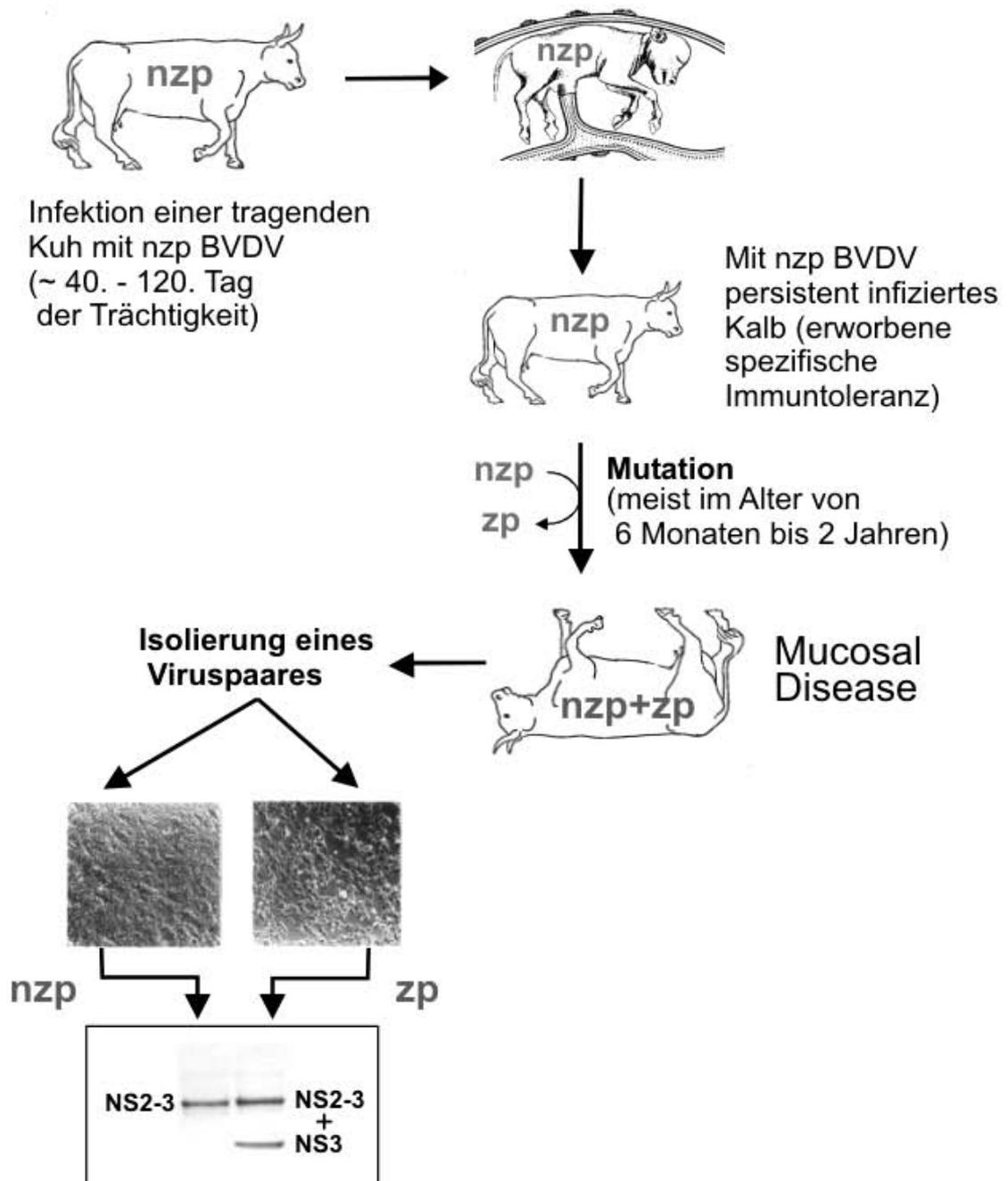


Abb. 2: Pathogenese der Mucosal Disease

Nach Infektion eines Rinderfetus mit einem nichtzytopathogenen (nzp) BVDV entwickelt das Tier unter bestimmten Voraussetzungen eine spezifische Immuntoleranz gegen das infizierende Virus. Durch Mutation entsteht im Verlauf der ersten beiden Lebensjahre aus dem persistierenden nzp Virus ein eng verwandtes zytopathogenes (zp) Virus, das die tödliche Krankheit Mucosal Disease (MD) verursacht. Aus MD-Tieren kann ein Viruspaar isoliert werden, das aus einem nzp und einem zp Virus besteht. Auf Proteinebene unterscheiden sich die beiden Biotypen durch die Spaltung von NS2-3. In zp BVDV-infizierten Zellen kann neben ungespaltenem NS2-3 auch freies NS3 in großen Mengen gefunden werden.

Die Mucosal Disease (MD) der Rinder ist eine sporadisch auftretende Erkrankung, die meist im Alter zwischen sechs Monaten und zwei Jahren auftritt und in jedem Fall, meist innerhalb von 2 Wochen nach dem Auftreten der ersten Symptome, tödlich endet (Baker, 1987). Typisch für diese Erkrankung sind Geschwüre im Verdauungstrakt (Baker, 1987; Moennig und Plagemann, 1992), die zu starkem blutigem Durchfall und zur Zerstörung des lymphatischen Gewebes, u.a. der Peyerschen Platten führen. Auffällige Läsionen zeigen sich außerdem an den sichtbaren Schleimhäuten des Kopfes sowie an der Haut des Zwischenklauenbereiches und des Kronsaumes.

Die Pathogenese der MD ist komplex. Eine persistente Infektion mit einem nzp BVDV-Stamm ist Voraussetzung für die Entstehung der MD (Liess et al., 1974); nur nzp Stämme können persistente Infektionen etablieren. Auffällig ist, dass aus an MD verendeten Tieren immer zwei Virustypen, ein so genanntes Viruspaar, isoliert werden können (Brownlie et al., 1984; McClurkin et al., 1985; McKercher et al., 1968; Wilhelmsen et al., 1991). Zusätzlich zum persistierenden nzp Virus findet sich ein antigenetisch eng verwandtes zp Virus (Corapi et al., 1988; Pocock et al., 1987). Diese Verwandtschaft steht in deutlichem Gegensatz zu der großen Variabilität der vielen bekannten BVDV-Isolate; daher ging man schon früh davon aus, dass das zp Virus durch Mutationen im infizierten Tier aus dem nzp Virus entsteht (Bolin et al., 1988; Brownlie et al., 1984; Corapi et al., 1988; Howard et al., 1987). Durch gezielte Überinfektion eines persistent infizierten Tieres mit einem zp BVDV-Isolat kann die MD auch experimentell ausgelöst werden, falls die antigenetische Verwandtschaft des zp Stammes zu dem persistierenden nzp Virus eng genug ist, um vom Immunsystem toleriert zu werden (Bolin et al., 1985; Brownlie et al., 1984; Moennig et al., 1990). Auffälligerweise replizieren die zp BVD-Viren besonders gut in

denjenigen Geweben, die bei der MD am stärksten geschädigt werden, z.B. im lymphatischen Gewebe des Magen-Darm-Traktes (Liebler et al., 1991), während die nzp Viren praktisch überall nachweisbar sind.

Eine Variante der MD ist die so genannte „*late onset*“-Form. Die betroffenen Tiere sterben nicht innerhalb von 2 Wochen nach dem Auftreten der ersten Symptome, sondern es folgt eine mehrere Monate andauernde symptomarme Phase; die massiven Symptome, die schließlich zum Tod führen, treten erst spät auf. Ursache der „*late onset*“-MD ist die Überinfektion persistent infizierter Tiere mit einem zp BVDV-Stamm, der antigenetisch weniger eng mit dem persistierenden nzp Stamm verwandt ist und daher vom Immunsystem nicht vollständig toleriert wird. Durch die nur begrenzte antigenetische Homologie der beiden Viren kann das Immunsystem des Tieres in geringem Maße auf den zp Stamm reagieren und so den Verlauf der Erkrankung hinauszögern (Fritzemeier et al., 1995; Moennig et al., 1993; Ridpath und Bolin, 1995a). Durch RNA-Rekombination zwischen dem zp Stamm und dem persistierenden nzp Stamm entstehen jedoch nach einer gewissen Zeit neue zp Viren, die vom Immunsystem vollständig toleriert werden. Daher endet auch die „*late onset*“-Form schließlich mit den massiven MD-Symptomen, die zum Tod des betroffenen Tieres führen.

3.3.3 Diagnostik

Die Diagnose einer BVDV-Infektion kann direkt über den Nachweis des infektiösen Virus bzw. den Nachweis von Virusbestandteilen wie RNA oder Protein sowie indirekt über den Nachweis antiviraler Antikörper erfolgen.

Die beste indirekte Methode ist der Serumneutralisationstest, seine extrem hohe Sensitivität und Spezifität wird von anderen Methoden zum Antikörpernachweis nicht erreicht (Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Für die Routinediagnostik besser geeignet, da einfacher und mit

verschiedenen Probenmaterialien durchführbar, ist allerdings der Antikörpernachweis mittels ELISA (*enzyme-linked immuno-sorbent assay*); er kann auch zur Untersuchung von Sammelmilchproben eingesetzt werden und ist damit ein gutes Werkzeug zur Bestandsuntersuchung (Avalos-Ramirez et al., 2001; Schelp und Greiser-Wilke, 2003).

Der direkte Virusnachweis gelingt am besten durch Anzucht in der Zellkultur und anschließenden Nachweis von Virusantigen mittels Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidase-Methoden (Thiel et al., 1996). Außerdem ist der Nachweis von viralem Antigen mit ELISA-Verfahren möglich (Schelp und Greiser-Wilke, 2003) oder es kann die virale RNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die RT-PCR ist extrem sensitiv und kann auch zur Untersuchung von Proben benutzt werden, die für eine Virusanzucht nicht geeignet sind (Horner et al., 1995; Ridpath et al., 2002). Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die quantitative Realtime-RT-PCR, mit der die Amplifikation von bestimmten viralen Genomfragmenten in Echtzeit durch computergestützte Messung von Fluoreszenz-Signalen verfolgt werden kann (Bhudevi und Weinstock, 2001; McGoldrick et al., 1998).

3.3.4 Bekämpfung

Während die Bekämpfung von BVDV und Schweinepest innerhalb der EU schon länger geregelt ist, sind staatliche Bekämpfungsmaßnahmen gegen BVDV in Deutschland noch in der Vorbereitung. Im November 2004 wurde die Neufassung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen bekannt gemacht; seitdem gehört die vorher nur meldepflichtige bovine Virusdiarrhö zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Bereits 1998 wurden vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft „Leitlinien für den Schutz von Rinderbeständen vor einer Infektion mit dem Virus der

BVD/MD und die Sanierung infizierter Bestände“ erlassen, die als Basis für freiwillige Bekämpfungsprogramme dienen.

Aufgrund ihrer enormen Bedeutung für die Virusverbreitung sind die persistent infizierten Kälber (PI-Tiere), die über ihre Körpersekrete das Virus lebenslang in großen Mengen ausscheiden, der wichtigste Angriffspunkt im Rahmen der Tierseuchenkämpfung. Etwa 1 bis 2% der Rinderpopulation in Deutschland sind PI-Tiere (Avalos-Ramirez et al., 2001; Moennig und Greiser-Wilke, 2003). Leider können diese Tiere in den ersten Wochen und Monaten nach der Aufnahme von BVD-Antikörper-haltigem Kolostrum aufgrund der verringerten Viruslast im Blut nicht mit allen Tests sicher diagnostiziert werden. Durch diese diagnostische Lücke erhöht sich, ebenso wie durch den Zukauf trächtiger Kühe, die ein PI-Tier austragen, das Risiko für Tierbestände.

Ziel jeder BVD/MD-Bekämpfung sollte daher die Verhinderung persistenter Infektionen und die Reduktion der Zahl der PI-Tiere sein. Auf der einen Seite wird versucht, durch Impfung der weiblichen Zuchttiere diaplazentare Infektionen und damit die Geburt persistent infizierter Kälber zu verhindern (van Oirschot et al., 1999). Andererseits wird versucht, durch verbesserte diagnostische Methoden PI-Tiere zu identifizieren und durch Schlachtung zu eliminieren (Gaede et al., 2003; Rossmanith et al., 2001). Häufig werden beide Maßnahmen in den Bekämpfungskonzepten kombiniert, die genauen Vorgehensweisen zum Erreichen bzw. zum Erhalt eines bestimmten Status sind in Deutschland bislang durch die Leitlinien geregelt.

Sind alle PI-Tiere eines Bestandes identifiziert und eliminiert („BVD-unverdächtiger“ Bestand), kann dieser Status durch Impfung der weiblichen Zuchttiere gut aufrechterhalten werden. Durch ein Impfprogramm allein (Bestände „ohne BVD-Status“) können zwar klinische Erkrankungen und diaplazentare Infektionen weitgehend

verhindert werden, aber es kommt auf lange Sicht zu keiner Verbesserung der Seuchensituation. Unter der Voraussetzung, dass ein Bestand nachweislich frei ist von PI-Tieren und dass die erneute Viruseinschleppung durch hygienische und organisatorische Maßnahmen effektiv verhindert werden kann („BVD-freie“ Bestände), kann auf Impfungen verzichtet werden. In diesem Fall sind regelmäßige Nachkontrollen zur Aufrechterhaltung des Status notwendig. Diese Populationen sind hochempfindlich, und im Fall einer erneuten Viruseinschleppung ist mit hohen Schäden zu rechnen.

3.3.5 Grundlagen der Zytopathogenität

In persistent infizierten Rindern entstehen die zp Viren, und damit das typische Viruspaar, oft erst Monate oder Jahre nach Infektion mit dem persistierenden nzp Stamm. Das persistierende Virus kann in vielen unterschiedlichen Organen und Geweben gefunden werden, unter anderem in Leukozyten (Bielefeldt Ohmann et al., 1987), im Verdauungstrakt (Liebler et al., 1991; McClurkin et al., 1985) und im ZNS (Fernandez et al., 1989), jedoch scheint immer nur eine begrenzte Anzahl von Zellen infiziert zu sein. Mit dem Auftreten des zp Virus ändert sich diese Situation, die Zahl der infizierten Zellen steigt mit dem Vorhandensein des zp Virus dramatisch an (Liebler et al., 1991). Das betroffene Tier erkrankt an MD und stirbt innerhalb von zwei Wochen nach dem Einsetzen der ersten Symptome. Inzwischen wurden zahlreiche Viruspaare aus an MD gestorbenen Tieren isoliert und zum Teil komplett sequenziert. Die in Verbindung mit dem zp Biotyp gefundenen Veränderungen im Genom dieser Viren beruhen meist auf RNA-Rekombinationen und erscheinen in einer Vielzahl von Variationen. Die Folge ist jedoch immer die Bildung von freiem NS3 in großer Menge (Kümmerer et al., 2000; Lindenbach und Rice, 2001; Meyers und Thiel, 1996). Die Rekombinations-Ereignisse finden wahrscheinlich in großer

Zahl und zufällig statt; es treten aber nur solche Ereignisse in Erscheinung, die zur Zytopathogenität des Virus und damit zur Erkrankung des Tieres führen.

Da die effektive Generierung von freiem NS3 eine Voraussetzung für die Zytopathogenität ist, die Rekombinationsereignisse aber rein zufällig sind, kann man in MD-Tieren verschiedenste Arten von Genomvarianten finden, die mit der effektiven Bildung von NS3 verbunden sind. Wie vielfältig die Möglichkeiten dabei sind, soll im Folgenden anhand einiger Beispiele gezeigt werden (Abb. 3).

Allgemein lässt sich zwischen zp BVDV-Stämmen mit integrierten zellulären Sequenzen und zp BVDV Stämmen ohne integrierte zelluläre Sequenzen unterscheiden (Meyers und Thiel, 1996). Die bisher am häufigsten gefundenen zellulären Sequenzen sind Ubiquitin-kodierende Sequenzen und Sequenzen, welche für das Jiv-Protein (J-domain-protein interacting with viral protein, ehemals cINS) kodieren. Wenn keine zellulären Sequenzen beteiligt sind, bestehen die Veränderungen im viralen Genom aus Deletionen, Duplikationen oder Punktmutationen (Meyers und Thiel, 1996).

Durch den speziellen Aufbau des Polyproteins der verschiedenen zp Viren wird auf verschiedenen Wegen die Freisetzung von NS3 erreicht:

- durch eine zelluläre oder virale Insertion direkt oberhalb von NS3, die zur Generierung des N-Terminus und der Freisetzung von NS3 führt;
- durch Integration eines Teils des zellulären Proteins Jiv in das Polyprotein wird die NS2-3-Spaltung und damit die Freisetzung von NS3 induziert (Aktivierung der NS2-Protease);
- kleine Insertionen oder Punktmutationen im NS2 führen zur effektiven Spaltung von NS2-3 in NS2 und NS3 (Aktivierung der NS2-Protease).

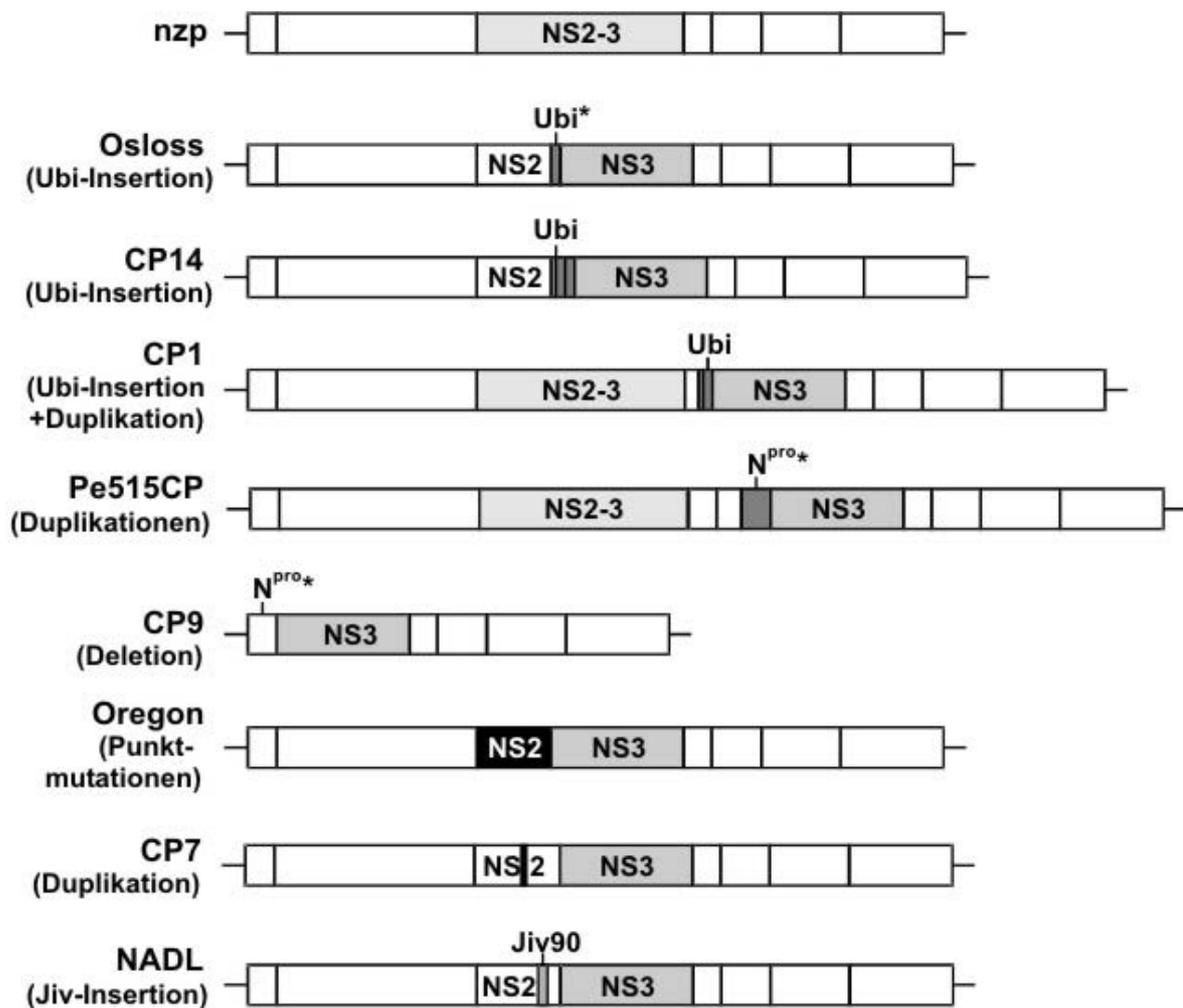


Abb. 3: Zytopathogene BVDV-Stämme und die NS3-Generierung

Aus dem persistierenden nzp Virus entstehen infolge von RNA-Rekombination oder Mutation zytopathogene Viren. Mittels verschiedener Mechanismen erlangen sie die Eigenschaft, in infizierten Zellen große Mengen freies NS3 zu exprimieren.

3.3.5.1 Zytopathogene Pestiviren mit Insertionen zwischen NS2 und NS3

Häufig gefundene Insertionstypen sind Ubiquitin und ubiquitin-ähnliche Sequenzen (Meyers und Thiel, 1996). Ubiquitin ist ein bei Eukaryonten hochkonserviertes, 76 AS großes Protein, das zur Markierung von Proteinen im Zellstoffwechsel dient (Hershko und Ciechanover, 1992). Es wird in der Zelle stets als N-terminaler Anteil von Fusionsproteinen exprimiert (Finley et al., 1989; Finley et al., 1987; Redmann und Rechsteiner, 1989). Durch die Katalyse Ubiquitin-C-terminaler

Hydrolasen (UCH), welche den C-Terminus des Ubiquitins generieren, werden die Ubiquitin-Monomere von den Fusionsproteinen abgespalten (Baker et al., 1992; Jentsch, 1992; Jonnalagadda et al., 1989; Mayer und Wilkinson, 1989; Rechsteiner, 1987).

Die Ubiquitin-Insertion im viralen Polyprotein stellt also ein zusätzliches Prozessierungssignal dar, welches von zelleigenen Proteasen erkannt wird (Tautz et al., 1993). Die Ubiquitin-Insertionen in den Genomen von *zp* Pestiviren umfassen jeweils mindestens ein Ubiquitin-Monomer und befinden sich immer direkt oberhalb der NS3-kodierenden Region. Im *zp* BVDV-Stamm Osloss wurde zum ersten Mal eine Ubiquitin-Insertion beschrieben (de Moerlooze et al., 1993; Meyers et al., 1989b; Renard et al., 1987). Die Insertion von 228 Basen Ubiquitin-kodierender Sequenz im Virusgenom führt dazu, dass im Polyprotein des Virus zwischen AS 1589 und 1590 ein einzelnes Ubiquitin-Monomer eingebaut ist, das im Vergleich zum zellulären Ubiquitin zwei AS-Austausche trägt (Meyers et al., 1989b). Durch diese Insertion kommt es im Polyprotein zu einer Prozessierung durch die UCH. Die Generierung des C-Terminus von Ubiquitin führt gleichzeitig zur Entstehung des N-Terminus von NS3 und damit zu dessen Freisetzung, während das Ubiquitin-Monomer als C-terminale Fusion am NS2 verbleibt.

Ubiquitin-Insertionen können auch in Verbindung mit Duplikationen viraler Sequenzen auftreten, wie beim BVDV-Stamm CP1 (Meyers et al., 1991b). Das Genom des CP1 entspricht bis in den NS4B-kodierenden Bereich dem eines *nzp* Pestivirus. Allerdings ist der für NS4B kodierende Sequenzabschnitt verkürzt (NS4B*) und ihm folgt eine Ubiquitin-kodierende Sequenz, die sich aus einem verkürzten und einem vollständigen Ubiquitin-Monomer zusammensetzt. Auf dieses Polyubiquitin-Genfragment folgt das Codon für den N-Terminus von NS3 (AS 1590) und die daran anschließende pestivirale Sequenz bis zum

Ende von NS5B. Im Stamm CP1 sind also NS3, NS4A und Teile von NS4B doppelt vorhanden; die Gesamtlänge des Genoms steigt dadurch auf etwa 15 kb. Im Polyprotein von CP1 wird ebenso wie beim Stamm Osloss durch Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen der N-Terminus von NS3 generiert; aus der NS2-3-kodierenden Region des vorderen Abschnitts des Genoms entsteht zusätzlich ungespaltenes NS2-3.

Kombiniert mit der Duplikation viraler Sequenzen wurden in weiteren Stämmen auch andere zelluläre Insertionen direkt oberhalb von NS3 gefunden. Die entsprechenden Proteine haben als gemeinsame Eigenschaft, dass sie im viralen Polyprotein ein Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen darstellen, über die der N-Terminus von NS3 generiert wird. Beispiele für solche Sequenzen sind SMT3B (Qi et al., 1998) und NEDD8 (Baroth et al., 2000) sowie Fragmente des Mikrotubuli-assoziierten Proteins LC-3 (Meyers et al., 1998), des GABA-RAP und GATE-16 (Becher et al., 2002). SMT3B und NEDD8 haben in der Zelle ähnliche Funktionen wie Ubiquitin (Hochstrasser, 2000; Jentsch und Pyrowolakis, 2000; Yeh et al., 2000); für NEDD8 wurde sogar eine Spaltung durch Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen nachgewiesen (Wada et al., 1998).

Duplikationen im viralen Genom können auch ohne Insertion zellulärer Sequenzen zur Freisetzung von NS3 und damit zur Zytotoxizität führen. Der Mechanismus der NS3-Generierung ist bei den im Folgenden beschriebenen Stämmen ähnlich wie im Falle der bereits beschriebenen Ubiquitin-Insertionen, nur erfolgt die Spaltung durch die virale Autoprotease N^{pro} anstatt durch zelluläre Proteasen; in beiden Fällen folgt jedoch auf die insertierte Sequenz direkt der Anfang von NS3.

Der BVDV-Stamm Pe515CP besitzt zum Beispiel eine komplexe doppelte Duplikation (Meyers et al., 1992); dabei liegen sowohl der

Bereich NS3-4B* als auch die AS 15 bis 168 von N^{pro} dupliziert vor. Die duplizierte N^{pro*}-Sequenz (N^{pro*}) endet mit der letzten AS von N^{pro}, direkt gefolgt von NS3 (AS 1590). Indem N^{pro*} sich autokatalytisch abspaltet, generiert es den N-Terminus von NS3 (Meyers et al., 1992). Andere zp BVDV-Stämme, wie CP4 oder CP6, zeigen einen dem Pe515CP sehr ähnlichen Aufbau. Alle derartigen Stämme haben einen direkten Übergang von der letzten AS der N^{pro*}-Sequenz zum Anfang der NS3-Sequenz, sodass auch hier der korrekte N-Terminus von NS3 generiert werden kann.

Auch Deletionen im pestiviralen Genom können zur Generierung von NS3 und damit zur Zytopathogenität führen. Die Deletionen führen allerdings dazu, dass die entsprechenden Viren abhängig von einem Helfervirus werden, das die fehlenden Proteine *in trans* bereitstellt. Solche helferabhängigen Viren werden „Defekte interferierende Partikel“, oder kurz „DI“ genannt (Roux et al., 1991), da sie nicht nur auf ein Helfervirus angewiesen und damit defekt sind, sondern auch die Replikation des Helfervirus negativ, d.h. interferierend, beeinflussen.

Die Deletion von BVDV CP9 umfasst den gesamten Bereich der Strukturproteine, sowie p7 und NS2 (Tautz et al., 1994). Dadurch folgt auf das letzte Codon der Autoprotease N^{pro} das erste Codon von NS3, und so wird der N-Terminus von NS3 durch die autokatalytische Abspaltung von N^{pro} generiert (Tautz et al., 1994). Die Ausbreitung dieses DI ist abhängig vom Helfervirus, da NS2-3, p7 und alle Strukturproteine nicht vom eigenen Genom kodiert werden. Die Replikation der RNA erfolgt allerdings Helfervirus-unabhängig (Behrens et al., 1998). Das bedeutet, dass die Nichtstrukturproteine N^{pro}, NS2, NS2-3 und p7 zur Replikation viraler RNA nicht benötigt werden.

3.3.5.2 Zytopathogene Pestiviren mit Mutationen im NS2

Der zp BVDV-Stamm Oregon besitzt weder Insertionen noch Deletionen, aber im Vergleich mit nzp Stämmen mehrere AS-Austausche innerhalb von NS2, die für eine partielle Spaltung von NS2-3 verantwortlich sind (Kümmerer et al., 1998). Der wichtigste AS-Austausch scheint dabei derjenige an Position 1555 zu sein, denn eine Rückmutation an dieser Stelle führt zum Verlust der Zytopathogenität (Kümmerer und Meyers, 2000). Wie es beim Stamm Oregon ohne Insertion oder Deletion zur Prozessierung von NS2-3 kommt, ist bisher ungeklärt. Möglicherweise führen die Punktmutationen zu einer Konformationsänderung der NS2-Autoprotease, die dadurch aktiviert wird.

Die Hypothese, dass die NS2-Autoprotease durch eine Konformationsänderung aktiviert wird, wurde bereits für BVDV CP7 aufgestellt (Tautz et al., 1996). Dieser zp Stamm trägt eine 27 Basen lange Insertion etwa in der Mitte des NS2-kodierenden Bereiches. Es handelt sich dabei um die Duplikation einer viralen Sequenz, die etwa 300 Basen unterhalb ihres Ursprungsbereiches in einem anderen Leserahmen eingebaut wurde. Es konnte gezeigt werden, dass diese 9 AS-Insertion im NS2 nicht nur essentiell für die NS2-3-Spaltung bei CP7, sondern auch ausreichend für eine NS2-3-Spaltung auf der Basis eines nzp Virus ist. Die NS3-Serinprotease ist an dieser Prozessierung nachweislich nicht beteiligt (Tautz et al., 1996).

Die Existenz des Stammes CP7 unterstützt damit, ebenso wie die des Stammes Oregon, die Theorie einer kryptischen Autoprotease im NS2, die unter bestimmten Voraussetzungen aktivierbar ist. Auf solche Stämme wird bei der Entstehung der Mucosal Disease selektiert, da nur zytopathogene Stämme MD auslösen und nur diejenigen Stämme zytopathogen sind, die freies NS3 in großen Mengen exprimieren. Somit gibt es neben der Insertion zellulärer Prozessierungssignale, wie z.B.

Ubiquitin, oder der Deletion oder Duplikation viraler Sequenzen über die Aktivierung einer viralen Protease im NS2 einen weiteren Weg, der zur Freisetzung von NS3 und damit zur Zytopathogenität führt.

3.3.5.3 Zytopathogene BVD-Viren mit Jiv-Insertionen

In den Genomen einiger zp Pestiviren wurden RNA-Abschnitte einer zellulären mRNA gefunden, die für das Protein Jiv (*J-domain-protein interacting with viral protein*) kodiert. Jiv-Insertionen, die man früher als cINS (*cellular insertion*) bezeichnete (Meyers et al., 1991a; Rinck et al., 2001), wurden in vielen zp BVDV- und zp BDV-Stämmen nachgewiesen (Becher et al., 1996; Meyers und Thiel, 1996; Ridpath und Neill, 2000; Vilcek et al., 2000).

Im Gegensatz zu allen anderen bisher gefundenen zellulären Insertionen befinden sich die Jiv-Insertionen nicht direkt oberhalb von NS3. In den meisten Fällen liegt die Jiv-Insertion innerhalb des NS2 an verschiedenen Positionen zwischen AS 1529 (BVDV 5912c; (Ridpath und Neill, 2000) und AS 1544 (BVDV 6082c, GenBank AF28180; abweichende Angaben in (Ridpath und Neill, 2000). Die Insertion liegt damit unterhalb einer putativen Zink-bindenden Struktur des NS2 (de Moerlooze et al., 1990) und 47 bis 61 AS oberhalb des konservierten C-Terminus von NS2 (Tautz und Thiel, 2003). Durch die Positionierung dieser zellulären Insertion weit entfernt von der NS2-3-Spaltstelle ist unwahrscheinlich, dass es sich um ein Prozessierungssignal für zelluläre Proteasen handelt; in diesem Fall würde sich die Insertion entweder direkt an der Spaltstelle oder zumindest an einer bestimmten Position befinden.

Außerdem sind die Insertionen in ihrer Größe sehr variabel (Abb. 4b). Bei zp BVDV NADL (Collett et al., 1988b), dem Prototyp eines BVDV-Stammes mit Jiv-Insertion, werden nur 90 AS kodiert; dies ist die kürzeste bisher gefundene Jiv-Insertion. Bei diesem Stamm wurde

gezeigt, dass die 90 AS-Insertion notwendig und hinreichend für NS2-3-Spaltung und Zytotoxigenität ist (Mendez et al., 1998; Vassilev et al., 1997). Diese 90 AS sind auch fast immer in den größeren Jiv-Insertionen anderer zp Pestiviren enthalten; es handelt sich um ein Minimalfragment, welches daher auch als Jiv90 bezeichnet wird (Rinck et al., 2001).

Nur bei BVDV 869 (Vilcek et al., 2000) fehlt die erste Aminosäure, bei BVDV ND 8799c (Ridpath und Neill, 2000) fehlen die zwei letzten Aminosäuren von Jiv90. Der Stamm BVDV C86 trägt die mit 177 AS größte Jiv-Insertion im NS2 (Meyers, persönliche Mitteilung). Meist umfassen die Insertionen ausschließlich Jiv-Sequenzen; bei 5 bisher untersuchten Pestivirus-Stämmen grenzen an die Jiv-Sequenz N-terminal (BVDV 5569, OkSt 94-050-297c/6082c) oder C-terminal (BVDV 5.19516, ND 8799c) maximal 29 AS lange Sequenzen unbekannter Herkunft.

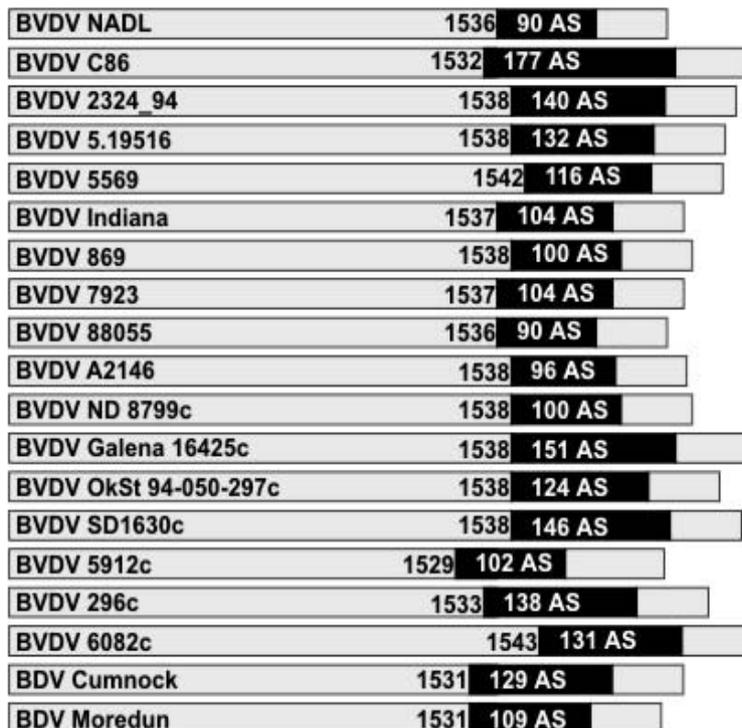


Abb. 4a: Zytotoxigene Pestivirus-Stämme mit Jiv-Insertionen im NS2

Im C-terminalen Bereich von NS2 (grau) befinden sich Jiv-Insertionen unterschiedlicher Größe (schwarz). Die Länge der Jiv-Insertion variiert innerhalb der verschiedenen Stämme zwischen 90 und 177 Aminosäuren (AS); die Insertionsstelle befindet sich im Bereich zwischen AS 1529 und AS 1543 des NS2.

Bisher wurden zwei BVDV-Stämme identifiziert, bei denen die Jiv-Sequenzen nicht im Bereich des NS2 zu finden sind. Die zp BVDV-Stämme KS86-1cp, Nose (Nagai et al., 2003) und CP8 (Müller et al., 2003) besitzen Jiv-Insertionen in der Region der Strukturproteine (Abb. 4b). Die Analyse des Stamms CP8, insbesondere seiner Polyproteinprozessierung, ist Gegenstand dieser Arbeit.



Abb. 4b: Zytopathogene BVDV-Stämme mit Jiv-Insertionen außerhalb von NS2

Die Jiv-Insertionen befinden sich in der N-terminalen Region des Polyproteins im Bereich der Strukturproteine und umfassen 110 AS (KS86-1cp, Nose) bzw. 242/243 AS (CP8).

Zusätzlich sind Teile des Kapsidproteins und der N-terminalen Protease dupliziert (C* und N^{pro*}), beim Stamm CP8 außerdem ein Abschnitt von E^{rms} (E^{rms*}). Im Polyprotein von CP8 folgt auf die Jiv-Insertion ein Peptid, das eine starke Homologie zum humanen Kernprotein Hcc-1 besitzt. Insgesamt sind im Vergleich zu nzp BVDV 513 AS (CP8) bzw. 287 AS (KS86-1cp, Nose) inseriert.

3.4 Das Jiv-Protein

Sowohl zelluläres Jiv als auch Jiv90 können mit NS2 stabil interagieren und die NS2-3-Spaltung *in trans* induzieren. In Jiv-überexprimierenden Zellen werden BVD-Viren, die sonst in Gewebekulturzellen nzp sind, zytopathogen (Rinck et al., 2001). Das überexprimierte Jiv induziert die NS2-3-Spaltung und infolge der erhöhten NS3-Freisetzung wechselt der Biotyp des Virus von nzp zu zp. Die Tatsache, dass ein zelluläres Protein *in trans* die virale Polyproteinprozessierung beeinflusst und gleichzeitig den Biotyp des Virus verändert, ist äußerst ungewöhnlich. Wie dieser Prozess auf molekularer Ebene abläuft, ist noch weitgehend ungeklärt. Da bekannt ist, dass ein Zusammenhang zwischen Biotyp und der

viralen RNA-Menge in der infizierten Zelle besteht, stellt sich die Frage, welche Rolle Jiv in der Regulation der pestiviralen Replikation spielt.

In natürlichen Wirtszellen, wie z.B. in MDBK-Zellen, werden unter normalen Bedingungen nur sehr geringe Mengen des Jiv-Proteins exprimiert (Rinck et al., 2001). Die exprimierten Mengen sind so gering, dass ein direkter Proteinnachweis bislang nicht gelungen ist; die Jiv-mRNA ist jedoch stets nachweisbar. Es ist noch unklar, ob Jiv einen für die pestivirale Replikation essentiellen Wirtsfaktor darstellt. Diese Frage ist ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Denkbar wäre, dass geringe Mengen Jiv in infizierten Zellen benötigt werden, um zumindest in geringem Umfang eine NS2-3-Spaltung zu induzieren. Da gezeigt wurde, dass auch nzp BVDV von dieser Spaltung abhängig ist (Lackner et al., 2004), wäre in diesem Fall eine Replikation in Jiv-freien Zellen nicht möglich.

Aus der Gesamt-RNA aus MDBK-Zellen gelang der Nachweis von zwei Jiv-kodierenden mRNAs. Die beiden mRNAs wurden als cDNAs kloniert und sequenziert (Rinck et al., 2001); sie unterscheiden sich nur in der Länge der 3'NTR und entstehen offensichtlich durch die Nutzung zweier unterschiedlicher Polyadenylierungssignale. Die Leserahmen der beiden mRNA-Spezies sind gleich und kodieren beim Rind für ein Protein von 699 AS (Rinck et al., 2001).

Das homologe Protein des Menschen wird auch als HDJ3 (humanes DnaJ3) bezeichnet. Das entsprechende Gen befindet sich auf Chromosom 12 und besteht aus sieben Exons (Chen et al., 2003). Durch bioinformatische Analysen wurden beim bovinen und beim humanen Protein eine Transmembrandomäne und eine J-Domäne identifiziert. J-Domänen sind charakteristisch für die J-Domänen-Proteine, eine Familie zellulärer Chaperone. Die am besten untersuchten Vertreter dieser Familie sind das DnaJ-Protein aus *E. coli* und das eukaryontische

Hsp40 (Agashe und Hartl, 2000; Cheetham und Caplan, 1998; Kelley, 1998). Diese Gruppe von Chaperonen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinfaltungsprozessen; über die J-Domäne interagieren sie mit Chaperonen aus der Hsp70-Familie und vermitteln Substrate an diese Chaperone. Von J-Domänen-Proteinen ist bekannt, dass sie häufig zwei Zink-Ionen binden; ein solches Motiv für die Bindung eines Zink-Ions befindet sich auch im Jiv-Protein.

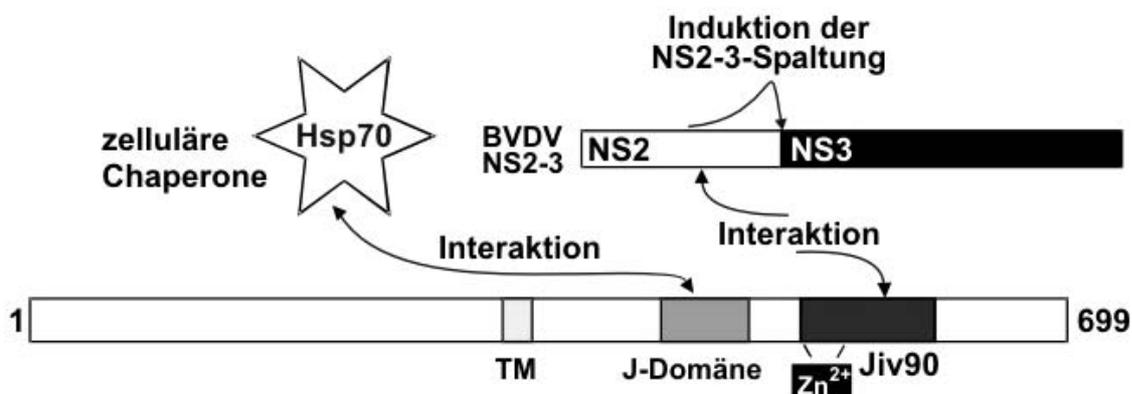


Abb. 5: Das zelluläre Jiv-Protein und seine Eigenschaften

Das 699 AS große Jiv-Protein ist vermutlich über die Transmembrandomäne (TM) in der ER-Membran verankert. Mit Chaperonen aus der Hsp70-Familie interagiert es über die J-Domäne und vermittelt Substrate an diese Chaperone. Die Jiv90-Domäne, die ein putatives Zink-Bindemotiv enthält, besitzt die Fähigkeit, durch Interaktion mit pestiviralem NS2 die NS2-Autoprotease zu aktivieren, was zur Spaltung von NS2-3 führt.

Über die Funktion von Jiv in der Zelle ist noch wenig bekannt. Das homologe Protein der Ratte ist am Export von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCRs), wie dem Dopamin D1-Rezeptor, vom ER an die Zelloberfläche beteiligt (Bermak et al., 2001a); es wird daher auch als DRiP78 (*dopamine-receptor interacting protein 78*) bezeichnet. Seine genaue Rolle beim Export der Rezeptoren ist jedoch noch unklar.

3.5 Border Disease der Schafe

Das Border Disease-Virus (BDV) ist weltweit verbreitet und hat in Ländern mit intensiver Schafhaltung wirtschaftliche Relevanz. Die Krankheitsbezeichnung ist darauf zurückzuführen, dass die durch BDV verursachte Erkrankung erstmals an der Grenze zwischen England und Wales auftrat (Hughes et al., 1959). Später traten auch Krankheitsfälle in Neuseeland, Australien und den USA auf, die als „hairy shaker disease“ bezeichnet wurden. Grundlage dieser Bezeichnung sind Symptome wie Zittern, Ataxie und Veränderungen des Haarkleides, die bei Lämmern kurz nach der Geburt infolge von diaplazentarer Infektion auftreten können.

Die Pathogenese der Border Disease ähnelt der von BVD, da auch hier die Infektion von adulten Tieren oft subklinisch verläuft oder nur milde Symptome verursacht. Diaplazentare Infektionen können dagegen zu Aborten, Missbildungen („hairy shaker“) und zur Geburt von persistent infizierten Tieren führen (Thiel et al., 1996). Auch ein MD-ähnliches Krankheitsbild wurde bei Schafen beobachtet (Barlow et al., 1983). Die meisten BDV-Isolate sind nzp, allerdings wurden auch zp Stämme isoliert (Becher et al., 1996; Nettleton et al., 1992).

3.6 Europäische Schweinepest

Die klassische oder europäische Schweinepest wird durch das CSFV (*classical swine fever virus*) verursacht. Sie unterscheidet sich klinisch kaum von der durch ein DNA-Virus aus der Familie *Asfarviridae* ausgelösten Afrikanischen Schweinepest.

Die durch das CSFV verursachte klassische Schweinepest war im 19. Jahrhundert besonders wegen ihrer perakuten Verlaufsform mit kurzer Inkubationszeit und hoher Sterblichkeitsrate gefürchtet. Heute treten praktisch keine perakuten Fälle mehr auf, und auch die akute

Form ist selten geworden. Die Symptomatik mildert sich immer mehr ab (Meyers und Thiel, 1996) und die chronische Verlaufsform dominiert (van Oirschot, 1992; Wensvoort und Terpstra, 1985). Typische Schweinepestfälle nach horizontaler Infektion sind durch Leukopenie, hohes Fieber, Durchblutungsstörungen und Blutungen der Haut und innerer Organen gekennzeichnet. Auch zentralnervöse Symptome können auftreten. Nach einer Fieberphase von 2-14 Tagen tritt entweder der Tod ein (v.a. bei jungen Tieren) oder es kommt zur Genesung (v.a. bei älteren Zuchttieren).

Je nach der Verlaufsform werden CSFV-Stämme mit hoher, mäßiger, geringer und nicht vorhandener Virulenz unterschieden (Meyers und Thiel, 1996). Persistente Infektionen können infolge diaplazentarer Infektion, aber auch infolge postnataler Infektion bis zum Absetzalter auftreten und führen meist zu chronischen Verlaufsformen. Diaplazentare Infektionen können abhängig vom Infektionszeitpunkt auch zu embryonalem oder fetalem Tod mit Aborten oder zur Geburt unterentwickelter oder Lebensschwacher Ferkel führen; daher kann sich eine Schweinepest-Infektion unter Umständen ausschließlich in Form massiver Fruchtbarkeitsstörungen zeigen, was die Diagnose und somit die Bekämpfung erschwert. Aufgrund der hohen Kontagiosität des Virus kann sich die Seuche schnell ausbreiten, wenn nicht rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergriffen werden. Da es sich um eine anzeigepflichtige Tierseuche handelt, muss auch der Verdacht auf Schweinepest sofort gemeldet werden. Die Bekämpfung wird in Deutschland durch die Schweinepest-Verordnung geregelt.

Infolge der EU-weiten Bekämpfungsmaßnahmen können die Kosten infolge von Schweinepestepidemien in Milliardenhöhe liegen. Die Epidemie der Jahre 1994/1995 führte zur Tötung von 1,5 Mio Schweinen und verursachte einen volkswirtschaftlichen Schaden von 1,5 Mrd DM.

3.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit dem Einfluss des Jiv-Proteins, eines zellulären Proteins aus der Familie der J-Domänen-Chaperone, auf die Replikation von Pestiviren.

Einige zp Pestivirus-Stämme tragen Jiv-kodierende Sequenzen als Bestandteil ihres Virusgenoms im Bereich des NS2-Gens; dies hat eine verstärkte NS2-3-Prozessierung, die Freisetzung großer Mengen von NS3 und die Ausbildung des zp Biotyps zur Folge. Zunächst wurden die Eigenschaften des zp BVD-Stammes CP8 untersucht, der eine Jiv-Insertion nicht im NS2-Gen, sondern in einer völlig anderen Region des Genoms aufweist. Zwei Fragmente des zellulären Jiv-Gens sind bei diesem Virus innerhalb einer komplexen Insertion im N-terminalen Bereich des Polyproteins eingefügt. Schwerpunkt der Analyse des Stammes CP8 im Rahmen dieser Arbeit waren detaillierte Untersuchungen zur Prozessierung des viralen Polyproteins.

Im Weiteren wurde der Einfluss des zellulären Jiv-Spiegels auf die Replikation von Pestiviren untersucht. Es stellte sich die Frage, welche Bedeutung Jiv für die pestivirale Replikation hat, und ob Jiv möglicherweise einen essentiellen Wirtsfaktor für Pestiviren darstellt. Durch vergleichende Replikationsstudien in Wildtyp-Wirtszellen sowie in Jiv-überexprimierenden Zellen und in Zellen mit reduziertem Jiv-Spiegel (Jiv-„*knockdown*“-Zellen), sollte untersucht werden, welchen Einfluss die in der Wirtszelle vorhandene Jiv-Menge auf die Replikation verschiedener Pestiviren hat.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Absaugeinrichtung	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Forma Scientific; Labotec
Digitalkamera FView®	Soft Imaging System (SIS)
DNA-Sequenzierer: LI-COR 4000 L	LI-COR
Elektroblot-Apparatur (Semi-dry)	BioRad
Elektroporationsgerät: GenePulserII	BioRad
Fluoreszenz-Mikroskop: Axiovert 35	Zeiss
Gel-Dokumentationssystem	MWG
Glaswaren	Schott
Heizblöcke	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Hybridisieröfen	Hybaid, Bachofer
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
Lichtmikroskop: Wilovert S	Will
Magnetrührer	IKA-Werke
Phosphorimager: Typhoon 9200	Amersham Biosciences
Phosphorimager imaging plates BAS III	Fuji
Photometer: GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe PipetBoy Acu	Integra Biosciences
Proteingel-Elektrophoresekammern	Hoefer; Werkstatt des MZI, JLU Gießen
RealtimePCR-Gerät: AbiPrism7000	Applied Biosystems
Reinstwasseranlage: Purelab UF Plus	USF
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Protec
Schüttler	Janken und Kunkel
Spannungsquellen	Biometra
Sterilbank	Kendro
Thermocycler	Techne
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge: Biofuge Pico	Heraeus
Tischzentrifuge: Biofuge primo	Heraeus
Tischzentrifuge, gekühlt: Biofuge fresco	Heraeus
UV-Crosslinker: UV Stratalinker 2400	Stratagene
Vortex	IKA
Waagen	Mettler-Toledo
Wasserbad	H. Kretschmer, Gießen

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Nylon-Membran Duralon-UV™	Stratagene
Elektroporationsküvetten (2 mm Spaltbreite)	Molecular BioProducts
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturgefäße und -platten	Falcon
Handschuhe rotiprotect® LATEX und rotiprotect® NITRIL	Roth
Kryoröhrchen	Nalge
Mikrotiterplatten	Nunc
Nitrozellulose-Membran Bio Trace NT	Pall Gelman Laboratory
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Reaktionsgefäße für Realtime-PCR	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Biozym
Pipettenspitzen, nukleasefrei	Nerbe plus
Plastikspritzen, steril	Braun
Röntgenfilme Biomax™	Kodak

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

0,24-9,5 kb RNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
[¹⁴ C]-methylierte Protein-Leiter	Amersham, Freiburg
[³⁵ S]-Methionin und -Cystein (ProMix)	Amersham, Freiburg
Acridinorange	Fluka, Schweiz
Acrylamid:N,N'-Methylen-bisacrylamid 29:1, 40%	AppliChem, Darmstadt
Agarose ultraPURE™	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	BioRad, München
BSA (Bovines Serum-Albumin)	NEB, Schwalbach
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
DMEM ohne Methionin, Cystein und Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Serva, Heidelberg
dNTPs	Roche, Mannheim
EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraacetat)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Fluka, Schweiz
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS (fötales Kälberserum)	PAA, Österreich
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluorographie-Lösung „Amplify“	Amersham, Freiburg

Formaldehyd	Merck, Darmstadt
100xGlutamax-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
G418-Sulfat (Neomycin)	Calbiochem, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyoxal	Fluka, Schweiz
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefe-tRNA	Ambion, USA
HPR I (Human Placenta Ribonuclease Inhibitor)	TaKaRa, Frankreich
Hygromycin B	PAA Laboratories , Linz
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	DE-VAU-GE Gesundkostwerk
Metafectene™ Transfektions-Reagenz	Biontex, München
Methanol	Fluka, Schweiz
Minimum Essential Medium Eagle, phosphatfrei	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt
N-octyl-β-D-glucopyranosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
Orange-G	Fluka, Schweiz
Paraformaldehyd	Fluka, Schweiz
Pefablock SC	Merck, Darmstadt
Penicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyvinylpyrrolidon (PVP) K90	Fluka, Schweiz
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinmarker (Prestained Broad Range) P7708L	NEB, Schwalbach
Puromycin	Alexis Biochemicals
Roti-Blot® A und Roti-Blot® K Blotting-Puffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol®	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	ICN, Eschwege
Sephadex® G15, Sephadex® G50	Pharmacia, Schweden
SequaGel® Complete Buffer für Sequenzgele	National diagnostics, USA
SequaGel® XR Monomer Solution für Sequenzgele	National diagnostics, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Superfect Transfektions-Reagenz	Qiagen, Hilden
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tricin	ICN, Eschwege
Tris	Roth, Karlsruhe
tRNA aus E.coli MRE 600	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Fluka, Schweiz
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser, doppelt destilliert	Roth, Karlsruhe

X-Gal (Galactopyranosid)	ICN, Eschwege
α [³² P]dCTP	Amersham Pharmacia, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
γ [³² P]ATP	Amersham Pharmacia, USA

Die hier nicht im Einzelnen aufgeführten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Roth (Mannheim) bezogen.

4.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Biotherm (Taq-Polymerase)	Natu-Tec, Frankfurt
DNase I (RNase-frei)	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment	NEB, Schwalbach
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
PNK (Polynukleotidkinase)	NEB, Schwalbach
Proofstart DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; NEB, Schwalbach; Promega, Mannheim; TaKaRa, Frankreich
RNase A	Roche, Mannheim
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	TaKaRa, Frankreich
T4-Polynukleotid-Kinase	NEB, Schwalbach

4.1.5 Kits

MAXIscript™ SP6 und T7-Kits zur <i>in vitro</i> -Transkription von Plasmid-DNA in RNA	Ambion, USA
Montage™ DNA Gel Extraction-Kit zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Millipore, USA
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices zur Aufreinigung von PCR-Produkten und zur DNA-Konzentration und Entfernung von Salzen aus Reaktionsansätzen	Millipore, USA
mirVana™ miRNA Isolation Kit zur selektiven Präparation kleiner RNAs aus eukaryontischen Zellen	Ambion, USA
Nick Translation Kit zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	Amersham, Freiburg

Nucleobond® AX100™ Säulen zur DNA-Präparation aus Bakterien	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® RNA II-Kit zur RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	Macherey-Nagel, Düren
NucleoTrap® Extraction Kit zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Macherey-Nagel, Düren
p-GEM®-T Vektor System I zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, USA
QIAmp DNA Mini Kit zur DNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	Qiagen, Hilden
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus zur Auswertung von Westernblots	PerkinElmer Life Sciences, USA

4.1.6 Basis-Plasmide

pCITE-2A	Enthält die IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) nach einem T7 RNA-Polymerase-Promotor; die IRES verstärkt die <i>cap</i> -unabhängige Transkription im MVA-T7pol-Vacciniavirus-Expressionssystem (Novagen, USA)
pCITE-GST	Basiert auf pCITE-2A und codiert zwischen EMCV-IRES und Polylinker zusätzlich für Glutathion-S-Transferase (Tautz et al., 2000)
pEF-PAC	Resistenzplasmid, vermittelt Puromycin-Resistenz, verwendet zur Erstellung von Zelllinien (T. Harada, Institut für Virologie, Gießen)
pGEM-T	Zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen (Promega, USA)
pC/E2-NS4A	Basiert auf pCITE-2A und codiert nach einer fremden Signalsequenz (Harada et al., 2000) für die Aminosäuren 693 bis 2343 des Polyproteins von zp BVDV CP7 (NS2-NS4A i+) (Rinck et al., 2001)
pN/E2-NS4A	Basiert auf pCITE-2A und codiert nach einer fremden Signalsequenz (Harada et al., 2000) für die Aminosäuren 693 bis 2334 des Polyproteins von nzp BVDV NCP7 (NS2-NS4A i-) (Rinck et al., 2001)
pNCP7-5A	Zur Herstellung von infektiöser RNA genomischer Länge von nzp BVDV NCP7 (Becher et al., 2000)
pSUPER	Basiert auf pBlueSkript-KS und dient der konstitutiven Expression von siRNAs (Brummelkamp et al., 2002)
pTK-Hyg	Resistenzplasmid, vermittelt Hygromycin-Resistenz, verwendet zur Erstellung von Zelllinien (Clontech, USA)
pTRE	Expressionsvektor des TetOn-Systems, der in Anwesenheit von Tetrazyklin oder Doxyzyklin die regulierte Expression eines Proteins vermittelt (Clontech, USA)

4.1.7 Jiv-Expressionsplasmide

Name	Kodierender Bereich		
	N-terminal	Jiv-Protein (AS), neue Schnittstellen [Sequenz mit Mutation (nt), Nukleotidaustausche in Großbuchstaben]	C-terminal
pGSTJiv90	GST	533-622	-
pTRE Σ Jiv	-	1-699	-
pTRE Σ Jiv esc1	-	1-699, <i>BssHII</i> [1475 gcTcgActC 1483]	-
pGSTJiv90W39A	GST	533-622 [1896 tttGCggca 1904]	-

4.1.8 PCR-Primer

Name	Sequenz
AgerevCP8	GCCCAACCGGTTTCCAGTCCCCTCC
C8Nprostprev	CGCGCCTGCAGCTAGCAGCTTGAAACCCAAAGGGGG
cins2080hind	AAGCTTACTCCAGATGCCCTCCTGCTG
cins2400bamrev	GGATCCGTAAGTGAACAATTTGAGC
cins2509bamrev	GGATCCCCTACTTCTTTGGTATTG
Jivsi1+	AAGTGGCTCGACTCTTGACCA
p7NsiCP8	ATGCATCCACTGAAATCGGTGACGG
QCcINSBssHII	CAGCCTGAAGAGGAAGTGGCGCGCCTGTTGACCATG
QCcINSrev	GAACCCAGCCATGGTCAACAGGCGCGCCACTTCCT
si1rev	TGGTCAAGAGTCGAGCCACTT

4.1.9 Realtime-PCR-Primer

Name	Sequenz
Jiv01	GGCGGTTTCTGGTAGGATTG
Jiv02R	GCCAAGAGAAGATCCAGGTGG
pv02	GTGGACGAGGGCATGCC
pv03R	TCCATGTGCCATGTACAGCAG

4.1.10 Realtime-PCR-Sonden

Name	Sequenz
JivTaq01	VIC-tgaccggctaggctggagggataaa-TAMRA
pvtAQ01	fam-acagtctgataggatgctgcagaggccc-tamra
pvtAQ02	VIC-caggctctgctacaccctatcaggctgtg-tamra

4.1.11 Eukaryontische Zellen

BHK	"Baby Hamster Kidney"-Zellen, Klon BSR, von J. Cox, Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tübingen
MDBK	"Madin Darby Bovine Kidney"-Zellen, von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
PT	Rinder-Nierenfibroblasten, von R. Riebe, Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald / Insel Riems

4.1.12 Viren

BDV nzp Moredun	Nzp BDV Stamm Moredun, von P.F. Nettleton, Moredun-Institute (Vantsis et al., 1976)
BVDV-2 #890	Nzp BVDV-2 Stamm #890, von J.F. Ridpath, National Animal Disease Center, Ames, USA (Ridpath und Bolin, 1995b)
BVDV-2 Gi1, Gi4	Nzp BVDV-2-Stämme, isoliert aus kontaminiertem FCS am Institut für Virologie, Gießen durch M.König
CP7	Zp BVDV-1 Stamm CP7, von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA; (Corapi et al., 1988)
CP8	Zp BVDV-1 Stamm CP8, von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA; (Corapi et al., 1988)
NCP7	Nzp BVDV-1 Stamm NCP7, von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA; (Corapi et al., 1988)
NCP8	Nzp BVDV-1 Stamm NCP8, von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA; (Corapi et al., 1988)
NADL	Zp BVDV-1 Stamm NADL (National Animal Disease Laboratory), von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Collett et al., 1988b)
MVA	Rekombinantes Vacciniavirus MVA (Modified Virus Ankara)-T7pol, von G. Sutter, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Oberschleißheim (Sutter et al., 1995); Vermehrung am Institut für Virologie, Gießen durch K. Müller

4.1.13 *E. coli* K12-Stämme

DH5 α	für Klonierungen in den Vektor pGEM-T; dieser Stamm erlaubt eine β -Galaktosidase-blau/weiß-Selektion
GM33	Dam- und Dcm-methylierungs-negativ
HB101	für Standard-Klonierungen

4.1.14 Antikörper und Seren

Name	Eigenschaften	Verdünnung	
		IF	WB
Code 4 (mAK 8.12.7)	monoklonaler Antikörper gegen NS3; erkennt ein Epitop im viralen NS3 und NS2-3 Protein bei allen bisher untersuchten Spezies aus dem Genus Pestivirus; zur Verfügung gestellt von E. J. Dubovi (New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA), (Corapi et al., 1990a)	1:20	1:1.000
Penta-His-Antikörper	Monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus; erkennt das Penta-His-Epitop (Qiagen, Hilden)	-	1:2.000
Cy3-konjugierter Anti-Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanogen3 konjugiert (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)	1:500	-
Cy3-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG des Kaninchens, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanogen3 konjugiert (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)	1:500	-
Peroxidase-konjugierter Anti-Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova, Hamburg)	-	1:10.000
Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG des Kaninchens, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova, Hamburg)	-	1:10.000
N3-Serum	Polyklonales Kaninchen-Serum mit gegen das Jiv-Protein gerichteten Antikörpern aus einem mit rekombinantem in <i>E. coli</i> exprimiertem Jiv90 immunisierten Kaninchen	1:500	1:10.000

4.1.15 Lösungen und Puffer

Lösung	Verwendung	Zusammensetzung (Lösungsmittel ist ddH ₂ O, wenn keine anderen Angaben)
Annealingpuffer	Annealing von Oligonukleotiden	100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH pH 7,4, 2 mM Mg-Acetat
Anodenpuffer	SDS-PAGE	200 mM Tris/HCl pH 8,9
Anti-RNase-Waschlösung	Behandlung von Plastikmaterialien	0,1 M NaOH, 1 mM EDTA
CCM-34	Zellkultur	4,5 g/l DMEM-Pulver, 200 µM L-Alanin, 225 µM L-Aspartat, 933 µM Glycin, 510 µM L-Glutamat, 217 µM L-Prolin, 184 µM Hypoxantin, 0,1 mg/l Biotin, 44 mM NaHCO ₃
50x Denhardt's Lösung	Nachweis von siRNAs im Northern Blot	10 g/l Ficoll 400, 10 g/l BSA, 10 g/l PVP in RNase-freiem Wasser
dNTP-Lösung	PCR	jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Gelpuffer	SDS-PAGE	1 M Tris/HCl pH 8,45, 0,1 % (w/v) SDS
gesättigtes Phenol	Plasmid-DNA Reinigung	Roti-Phenol, gesättigt mit 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1% (w/v) Hydroxychinolin
Hungermedium	Radioimmunpräzipitation	Dulbecco's modified Eagle's medium ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure (Sigma-Aldrich); 1% (v/v) 100x Glutamax-Lösung (Invitrogen)
Hybridisierlösung	Nachweis von siRNAs im Northern Blot	30 ml 20x SSC, 10 ml 50x Denhardt's, 1 ml 20% SDS ; mit RNase-freiem Wasser auf 100 ml
Kathodenpuffer	SDS-PAGE	100 mM TrisHCl pH 8,25, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS
LB-Medium	Bakterienkultur	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl; auf pH 7,5 mit NaOH
LB ⁺⁺ -Medium	Kompetente Bakterien	20 mM MgSO ₄ und 10 mM KCl in LB-Medium
10x LongRun-Konzentrat	Sequenzierung	162 g Tris, 27,5 g Borsäure, 9,3 g EDTA-Na ₂ ; mit ddH ₂ O auf 1 l
NB-Hybridisierlösung	Northern Blot	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS; auf pH 7,2 mit NaOH
NB-Waschlösung + 5% SDS	Northern Blot	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM EDTA, 5% (w/v) SDS; auf pH 7,2 mit NaOH

NB-Waschlösung + 1% SDS	Northern Blot	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM EDTA, 1% (w/v) SDS; auf pH 7,2 mit NaOH
P1	Plasmid-DNA-Präparation	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA; 100 mg/l RNase A
P2	Plasmid-DNA-Präparation	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3	Plasmid-DNA-Präparation	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
PBS	Zellkultur	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; auf pH 7,4 mit HCl
PBS ⁺⁺	Immunfluoreszenz	0,49 mM MgCl ₂ , 0,68 mM CaCl ₂ in PBS
PBS-Tween	Western-Blot	0,05% (v/v) Tween-20 in PBS
50x Phosphat-Puffer	RNA-Gele	250 mM Na ₂ HPO ₄ , 250 mM NaH ₂ PO ₄ ; auf pH 6,8 mit NaOH (entspricht 0,5 M Phosphat-Konzentration)
Prähybridisierlösung	Nachweis von siRNAs im Northern Blot	30 ml 20x SSC, 20 ml 50x Denhardt's, 1 ml 20% SDS; mit RNase-freiem Wasser auf 100 ml
Probenpuffer	Agarosegel-Elektrophorese	0,1% (w/v) Orange-G, 30% Glycerin
Protein A-Sepharose-Suspension	Radioimmunpräzipitation	25 % (v/v) gequollene Protein A-Sepharose in RIPA-Puffer, 1 mM NaN ₃
Puffer A	RT-PCR	125 mM Tris pH 8,3, 187,5 mM KCl, 7,5 mM MgCl ₂ , 25 mM DTT, 1,25 mM dNTPs
Puffer B	RT-PCR	25 mM Tris pH 8,3, 100 mM KCl, 6,5 mM MgCl ₂ , 1,25 mM dNTPs, 0,5% Triton X100; 0,1% BSA
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitation	150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Desoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,0
RNase-freies Wasser (ddH ₂ O RNase-frei)	Arbeiten mit RNA	Deionisiertes Wasser mit 0,1% (v/v) DEPC über Nacht gerührt; zweifach autoklaviert
SDS-Lysepuffer	SDS-PAGE	2% (w/v) SDS, 6 M Harnstoff, 10% (v/v) Glycerin, 0,01% (w/v) Bromphenolblau
20x SSC	Northern Blot	175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat, 800 ml RNase-freies Wasser; auf pH 7,0 mit HCl; mit RNase-freiem Wasser auf 1l
Stop-Lösung	Sequenzierung	20 mM EDTA pH 8,0 und 300 mg/l Bromphenolblau in deionisiertem Formamid

TAE-Puffer	Agarosegel-Elektrophorese	20 ml 50x Modified Tris-Acetate-EDTA buffer (Millipore) mit ddH ₂ O auf 1 l; 100 µg/l Ethidiumbromid
10x TBE	Nachweis von siRNAs im Northern Blot	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA in RNase-freiem Wasser
TES-Puffer	Northern Blot	1 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,5% (w/v)SDS; auf pH 7,5 mit NaOH
TfBI	Kompetente Bakterien	30 mM K-Acetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin; auf pH 5,8 mit Essigsäure; sterilfiltriert
TfBII	Kompetente Bakterien	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin; auf pH 6,5 mit KOH; sterilfiltriert
Trypsin-Lösung	Zellkultur	2,5 g/l Trypsin, 16 mg/l Phenolrot, 3,3 mM EDTA in PBS
Waschlösung	Nachweis von siRNAs im Northern Blot	300 ml 20x SSC, 10 ml 20% SDS; mit RNase-freiem Wasser auf 1 l

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit DNA

Einige Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren bereits aus vorherigen Arbeiten von M. Zies, Dr. C. Birghan und Dr. G. Rinck vorhanden. Manche Plasmide wurden in Zusammenarbeit mit der Medizinisch-Technischen Assistentin unserer Arbeitsgruppe, Sylvaine Jacobi, hergestellt.

4.2.1.1 Präparation kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Bakterien der Stämme HB101, GM33 und DH5 α erfolgte nach der Hanahan-Methode (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie des jeweiligen Stammes angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB⁺⁺-Medium mit 1 ml der Bakteriensuspension beimpft. Die anschließende Inkubation unter Schütteln bei 37°C erfolgte solange bis die optische Dichte OD₆₀₀ einen Wert zwischen 0,4 und 0,55 erreichte. Die Bakteriensuspension wurde dann unter gelegentlichem Schwenken etwa 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 3.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml kaltem TfBI resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet in 4 ml TfBII aufgenommen. Die Suspension der kompetenten Bakterien wurde in 50 μ l- und 200 μ l-Aliquots bei -70°C gelagert.

4.2.1.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab zu analytischen Zwecken erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim und Doly, 1979) und anschließender Präzipitation der Plasmid-DNA. Alle Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, vermitteln eine Resistenz gegen das

Antibiotikum Ampicillin. Mit einer Einzelkolonie von einer Ampicillin-haltigen Agarplatte (1,5% Agar-Agar in LB-Medium; 50 mg/l Ampicillin) wurden 3 ml eines Ampicillin-haltigen (100 mg/l) LB-Mediums beimpft. Es folgte die Inkubation der Flüssigkultur unter Schütteln bei 37°C für mindestens 6 h oder über Nacht. 1,5 ml dieser Kultur wurden bei 13.000 g für 2 min abzentrifugiert und das Pellet danach in 200 µl eiskaltem P1 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 200 µl P2 vermischt und unter Schütteln 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl P3 folgte die Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C für 10 min. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt und bei 16.000 g und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 100 µl 70% (v/v) Ethanol auf dem Heizblock bei 50°C getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

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

Zur Isolation von größeren Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurden die Anionen-Austauscher-Säulen Nucleobond® AX 100 und die mitgelieferten Puffer (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die DNA-Präparation erfolgte in der Regel ausgehend von einem Flüssigkulturvolumen von 50 ml; bei der Präparation von Gesamtklon-DNA wurde das Volumen der Flüssigkultur und aller Pufferlösungen verdoppelt.

Die Bakterien wurden in 4 ml S1 resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml S2 und vorsichtigem Mischen für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 4 ml S3, vorsichtigem Mischen und 5 min Inkubation auf Eis ließ man die filtrierte Lösung über eine mit 2,5 ml N2 äquilibrierte Säule laufen. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 5 ml N3 gewaschen und schließlich die Plasmid-DNA mit 2,7 ml N5 eluiert. Die

Fällung erfolgte durch Zugabe von 2,3 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C für mindestens 30 min. Nach dem Waschen mit 200 µl 70% (v/v) Ethanol und Trocknen der Pellets auf dem Heizblock bei 50°C wurde die DNA in 210 µl ddH₂O aufgenommen.

Um den DNA-Gehalt einer Plasmid-Präparation zu bestimmen, wurde die UV-Licht-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia-Biotech) gemessen. Hierzu wurden 1 µl der DNA-Lösung mit 99 µl ddH₂O verdünnt und die Absorption dieser Lösung gemessen. Die Absorption von reinem ddH₂O diente dabei als Referenz. Doppelsträngige DNA in einer Konzentration von 50 µg/ml ergibt bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Absorptionswert von 1. Ausgehend von diesen Werten und des Verdünnungsfaktors von 100 ergab sich die DNA-Konzentration in µg/µl durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 5.

4.2.1.4 Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken

Die für die spezifische Spaltung von DNA-Molekülen eingesetzten Restriktionsendonukleasen der Klasse II dienen der bakteriellen Zelle *in vivo* zum Schutz vor fremder DNA. Unerwünschte Fremd-DNA wird durch die Restriktionsenzyme fragmentiert und dadurch unschädlich gemacht; zelleigene DNA ist durch entsprechende DNA-Modifikationen (Methylierungen) vor dem Abbau geschützt.

Zur Analyse von DNA und für Klonierungen wurden in dieser Arbeit Restriktionsenzym-Verdaue durchgeführt. Die hierfür verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsschnitte richteten sich bezüglich der Auswahl des Puffers und der Inkubationstemperatur nach den Empfehlungen des jeweiligen

Herstellers und eigenen Erfahrungen. Die Inkubationsdauer betrug für analytische Restriktionsenzym-Verdaue 30 bis 60 min, für Klonierungen oder Linearisierungen im Allgemeinen 1 bis 2 h. Der Enzymanteil im Ansatz sollte 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Enzyme in glycerolhaltigen Puffern aufbewahrt werden und zu hohe Glycerolkonzentrationen die Reaktion negativ beeinflussen können; in einigen Fällen führen zu hohe Enzym-Konzentrationen oder ungeeignete Puffer auch zu einem teilweisen Verlust der Spezifität des Enzyms (Stern-Aktivität).

Zur Analyse von Plasmid-DNA (analytischer Verdau) wurden 100-200 ng DNA aus Midi-Präparation oder 1 µl der Lösung aus Mini-Präparationen mit ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut. Die Auswahl des Enzyms oder der Enzyme richtete sich nach dem analytischen Zweck (z.B. Überprüfen der Intaktheit von Schnittstellen nach Klonierung über diese Schnittstellen; Überprüfen auf Vorhandensein einer Marker-Schnittstelle nach Mutagenese usw.). Die analytischen Verdaue wurden im 10 µl-Maßstab durchgeführt; hierzu wurde die DNA unter Zugabe von 1 µl eines passenden Puffers (meist NEB 10xPuffer #1, #2, #3 oder #4) und gegebenenfalls 1% (v/v) BSA (NEB) durch Zugabe von 0,05 bis 0,25 µl Restriktionsenzym (je nach Konzentration und Restriktionsaktivität des Enzyms) für etwa 30 min bei der für die verwendeten Enzyme optimalen Temperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte im 0,8%igen bzw. 1,5%igen Agarosegel (je nach erwarteten Fragmentgrößen) unter UV-Durchleuchtung (s.u.).

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur weiteren Klonierung (präparativer Verdau) wurde mit 3 bis 5 µg Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen in 50 µl-Ansätzen nach dem gleichen Schema verfahren. Wenn möglich wurden Klonierungstechniken mit Restriktionsenzymen angewandt, bei denen auf beiden Seiten der DNA-Fragmente kompatible

5'- oder 3'-Überhänge bestehen blieben (Sticky-sticky-Klonierungen). Auf diese Weise konnten intramolekulare Rück-Ligationen der Vektor-DNA reduziert und der erfolgreiche Einbau des Fragmentes in der gewünschten Orientierung mit intakten Übergängen sichergestellt werden. In einigen Fällen, z.B. wenn kompatible Schnittstellen der beiden Klonierungspartner fehlten, wurde auch mit glatten DNA-Enden (*blunt-ends*) gearbeitet. Hierzu wurden Enzyme verwendet, die selbsttätig ein solches Ende ohne Überhang erzeugen (z.B. *EcoRV*) oder der Überhang wurden mittels Zugabe von 0,5 µl Klenow-Fragment (DNA Polymerase I, großes Fragment; 50 U/µl; NEB) nach dem Verdau mit dem ersten Enzym abgebaut; hierzu wurde die Reaktion 5 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM) für weitere 10 min stehen gelassen. Alternativ wurde das Klenow-Fragment auch dazu genutzt, 5' Überhänge der geschnittenen DNA in 5'→3'-Richtung aufzufüllen, um auf diese Weise ein glattes DNA-Ende zu erhalten; in dem Fall wurde die Reaktion nach gleichzeitiger Zugabe von 0,5 µl Klenow-Fragment und 1 µl dNTPs für 15 min bei 37°C inkubiert.

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

das Pellet getrocknet und in ddH₂O resuspendiert. Mit diesem Verfahren wurde auch die zur stabilen Transfektion von eukaryontischen Zellen (s.u.) bestimmte Plasmid-DNA, anschließend an die Linearisierung mittels Restriktionsenzym-Verdau, aufgereinigt.

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

Die geschnittene DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese im 0,8%igen bzw. 1,5%igen Agarosegel (je nach Fragmentgrößen) aufgetrennt und die entsprechende Bande unter UV-Durchleuchtung (312 nm) aus dem Gel ausgeschnitten (s.u.)

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

Zur Herstellung von TAE-Puffer diente das modifizierte TAE-Puffer-Konzentrat (50x Modified Tris-Acetate-EDTA buffer, Millipore), das mit Wasser auf einfache Konzentration verdünnt und mit 100 μg/l Ethidiumbromid versetzt wurde. Das enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert dann bei Anregung durch UV-Licht (254 oder 312 nm Wellenlänge). Meist wurden Gele mit 0,8% (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet; bei kleinen DNA-Fragmenten (<500 bp) lag die Agarosekonzentration bei 1,5% (w/v); die Agaroselösung wurde nach dem Aufkochen in der Mikrowelle bei 60°C im Wasserbad gelagert. Vor dem Auftrag der DNA-Proben auf das Gel wurden diese im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer (0,1% (w/v) Orange-G;

30% Glycerin) vermischt. Parallel zu den Proben wurde auf jedem Gel auch die 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen) als Größenstandard aufgetragen. Die Gel-Apparaturen aus der Werkstatt des Mehrzweckinstitutes (MZI) Gießen hatten einen Elektrodenabstand von 15 cm. Die Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer elektrischen Gleichspannung von 120 V für etwa 25 min. Die Fluoreszenz der Proben auf analytischen Gelen wurde im UV-Durchlicht (254 nm Wellenlänge) betrachtet und computergestützt mittels des Systems GelPrint 2000i (MWG) durch Thermodruck dokumentiert.

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

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

4.2.1.6 Ligation und Transformation in *E. coli*

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

Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch.

In der Regel wurden 3 µl Vektor-DNA-Lösung und 5,5 µl Fragment-DNA-Lösung zusammen mit 1 µl 10xLigase-Puffer (TaKaRa) und 0,5 µl T4-DNA-Ligase (TaKaRa) vermischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Im Falle einer Ligation eines Vektors mit zwei Fragmenten („Drei-Fragment-Ligation“) wurden 1,5 µl Vektor- und jeweils 3,5 µl Fragment-DNA-Lösung eingesetzt. Zu jeder Ligation wurde parallel auch eine Religationskontrolle angesetzt; diese bestand aus den gleichen Komponenten wie der Ligationsansatz, jedoch wurde anstelle der Fragment-DNA-Lösung ddH₂O zugegeben. Diese Kontrolle diente später zur Abschätzung der Effizienz des Fragment-Einbaus im Vergleich zur intramolekularen Rückligation des Vektors.

Zur Transformation wurden jeweils 50 µl transformationskompetenter *E.coli* K12 HB101-Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend zum Ligations- und Religationsansatz pipettiert. Nach 25 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Die Bakterienzellen wurden danach 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 200 µl LB-Medium für unter Schütteln 25 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Bakterien auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte (50 mg/l Ampicillin) ausplattiert, wo man nach Inkubation bei 37°C über Nacht die herangewachsenen Kolonien beurteilen konnte.

Die Retransformation bereits isolierter Plasmide (z.B. zur Vermehrung der DNA aus einer Mini-Präparation im Midi-Maßstab) erfolgte nach dem gleichen Prinzip, allerdings genügten hierfür 1 µl Plasmid-Lösung bzw. 100 ng DNA; die (re)transformierten Bakterien dienten dann sowohl zur direkten Animpfung einer Flüssigkultur als auch dem Ausplattieren auf einer Agarplatte.

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

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA, bei der sehr geringe DNA-Mengen stark vervielfältigt werden können. Die Selektivität beruht auf der Bindung zweier Oligonukleotide, die zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNA komplementär sind, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen. Das als Vorwärts-Primer bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNA, während das als Revers-Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach der Auftrennung des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen (Denaturierung, „Schmelzen“) lagern sich beide Primer bei Absenken der Temperatur an die komplementäre DNA-Sequenz an (Annealing, Hybridisierung). Im nächsten Schritt dienen sie der hitzebeständigen Taq-DNA-Polymerase als Startmoleküle für die DNA-Synthese (Elongation, Synthese). Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird etwa 30 mal wiederholt, was zur exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Abschnittes in der Reaktion führt. Durch Verlängerungen an den 5'-Enden der verwendeten Primer können an den Enden des PCR-Produktes auch kurze Sequenzen eingebaut werden, die nicht zur Matrize homolog sind; meist handelt es sich dabei um Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die zur späteren Klonierung des DNA-Abschnittes benötigt werden.

Im Allgemeinen wurden PCRs zur späteren Klonierung der Produkte im 50 µl-Maßstab durchgeführt. 30-50 ng des als Matrize (Template) dienenden Ausgangs-Plasmides wurden hierzu mit jeweils 2 µl beider Primerlösungen (10 pmol/µl), 1 µl dNTP-Lösung (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 µl Puffer (10x Biotherm™-Puffer), ddH₂O und 0,5 µl Biotherm™-DNA-Polymerase (5 U/µl) gemischt und im Thermocycler inkubiert: Eine zweiminütige Inkubation bei 40°C vermied

Kondensationen am Deckel der PCR Gefäße während der Aufheizphase der oberen Heizplatte. Anschließend erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 2 min und dann 30 Zyklen aus Denaturierung (94°C, 30 sec), Hybridisierung (50-56°C, 45 sec) und Synthese (72°C, 1 min je kb). Es folgte eine abschließende Elongation von 5 min und die Abkühlung der Reaktion auf 4°C.

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

Zur Durchführung einer RT-PCR wurde zunächst ein Startmix (20 pmol Revers-Primer; 1 µg Gesamtzell-RNA; ad 11 µl mit RNase-freiem ddH₂O) für 2 min auf 92°C erhitzt und anschließend wieder auf 4°C gekühlt, um die Bindung des ersten Primers an die RNA zu erreichen. Nach Zugabe des RT-Mixes aus 8 µl Puffer A, 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor (HPR I) und 0,5 µl reverser Transkriptase (Superscript II RT; 200 U/µl) wurde die reverse Transkription 45 min bei 37°C durchgeführt, dann 2 min bei 80°C denaturiert und wieder auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe des PCR-Mixes aus 10 µl Puffer B, 20 pmol des zweiten Primers, 1 µl Biotherm Polymerase und 18,5 µl ddH₂O wurde ein normales PCR-Programm mit 30 Zyklen gestartet (s.o.).

Jeder (RT-)PCR-Ansatz wurde durch Agarosegel-Elektrophorese auf Größe und Reinheit des Produktes hin untersucht. Die amplifizierte DNA wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Durchlicht-Kontrolle (312 nm Wellenlänge) aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des DNA Agarose Gel Extraction Kit

(Ultrafree DA) isoliert (s.o.). 3 μ l dieser DNA-Lösung wurden mit 1 μ l pGEM-T-Vektor (54 ng/ μ l), 5 μ l des mitgelieferten 2x Ligase-Puffers und 1 μ l (35 U) der mitgelieferten T4-DNA-Ligase gemischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde zur Transformation von 50 μ l einer Suspension kompetenter *E. coli* DH5 α -Bakterien verwendet, die eine β -Galaktosidase-vermittelte Blau-weiß-Selektion erlauben. Das Gemisch aus Bakterien und Ligations-Ansatz wurde 25 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (2 min bei 42°C), dem anschließenden Abkühlen auf Eis (2 min) und der Zugabe von 200 μ l LB-Medium wurden die Zellen für 25 min bei 37°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren auf einer Ampicillin-haltigen (50 mg/l) Agarplatte erfolgte die Zugabe von 20 μ l einer 4%igen (w/v) X-Gal-Lösung.

4.2.1.8 Gerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden über die QuikChange®-Methode (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers in die entsprechenden Plasmide eingeführt. Zur Generierung einer Mutation werden zwei Oligonukleotide benutzt, die im identischen Bereich an beide Stränge der DNA-Matrize binden und die gewünschte Mutation tragen. Diese Primer sind in der Regel 30-40 bp lang, da sich zu beiden Seiten der Mutation noch etwa 15 Basen Matrizen-homologe Sequenz befinden sollte; der GC-Gehalt sollte über 40% und die Schmelztemperatur (T_m) oberhalb von 78°C liegen. Zusätzlich zur eigentlichen Mutation enthielten die Primer noch eine zusätzliche Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, deren Einbau keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins hatte (stille Mutation); diese Schnittstelle erleichterte später die Analyse auf das Vorhandensein der Mutation vor der Durchführung weiterer Klonierungsschritte.

Die beiden Primer wurden in einer PCR-Reaktion mit dem wt-Plasmid als Matrize eingesetzt, in deren Verlauf das gesamte Plasmid mit der

gewünschten Mutation amplifiziert werden konnte. Hierzu wurden im 50 µl-Ansatz 10-50 ng wt-Plasmid, 100 pmol von beiden Primern, 1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM), 5 µl 10xPuffer (für Pfu-Polymerase) und 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl; Promega) gegeben. Im Thermocycler erfolgten 20 Zyklen mit 30 sec Denaturierung (95°C), 1 min Hybridisierung (55°C) und 2 min Synthese (68°C) je kb Plasmidlänge. Nach der Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes zur späteren Analyse abgenommen und der Rest nach Zugabe von 1 µl *Dpn I* (10 U/µl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur methylierte, d.h. aus Bakterien (*E. coli*) stammende DNA, nicht aber die während der PCR *in vitro* entstandene unmethylierte DNA; auf diese Weise wird die Wildtyp-Matrize zerstört. Nach dem Verdau mit *DpnI* wurde erneut eine 5 µl-Probe aus dem Reaktionsansatz entnommen und zusammen mit der ersten Probe über Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Eine nicht sichtbare oder nur schwache Reduktion der Signalstärke durch den *DpnI*-Verdau war ein Hinweis auf eine erfolgte DNA-Synthese. Die neu synthetisierte DNA ist wie die Ausgangs-DNA doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche an den Enden der jeweiligen eingebauten Primer auf. Erst nach Transformation der neu synthetisierten DNA in Bakterien erfolgt die „Reparatur“ dieser Brüche durch zelleigene Ligations-Mechanismen, was zur Entstehung eines intakten Plasmids führt.

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

4.2.1.9 Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen

Die enzymatische Methode zur Ermittlung von DNA-Sequenzen durch Kettenabbruch wurde 1977 entwickelt (Sanger et al., 1977). Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wird hierbei, ausgehend von einem Oligonukleotid als Primer, durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase in vier getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert. Jeder dieser Reaktionsansätze enthält sowohl ddH₂O, Puffer, DNA-Polymerase, den Sequenzier-Primer sowie alle vier dNTPs. In jedem der vier Reaktionsansätze befindet sich neben diesen regulären dNTPs auch jeweils eine Sorte deren 2'3'-Dideoxy-Derivate (ddCTP, ddATP, ddTTP oder ddGTP) in einem bestimmten Verhältnis zu den regulären dNTPs. Die ddNTPs werden im Laufe der Reaktion von der Polymerase ebenso in die entstehende DNA eingebaut wie die dNTPs, allerdings bricht die Kettenverlängerung nach einem ddNTP ab, da keine 3' OH-Gruppe mehr zur Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbindung vorhanden ist. Da diese Kettenabbrüche statistisch verteilt erfolgen, werden DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge synthetisiert; im ersten Reaktionsansatz sammeln sich alle Fragmente, die mit einem C enden, im zweiten diejenigen mit A, im dritten diejenigen mit T und im letzten Reaktionsansatz alle Fragmente mit einem G am Ende. Die Auftrennung der DNA aus den einzelnen Ansätzen in vier benachbarten Spuren eines hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgels erlaubt einen Nachweis der entstandenen Fragmente, auch wenn der Größenunterschied nur ein Nukleotid beträgt. Da der Sequenzier-Primer an einen Fluoreszenzfarbstoff (IRD-800, MWG-Biotech) gekoppelt ist, können die Fragmente durch Anregung über einen Laser und Detektion des emittierten Lichtes sichtbar gemacht und die Sequenzen computergestützt ausgelesen werden.

Für Sequenzierungen wurde Plasmid-DNA aus Mini- oder

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

Das Auftrennen der Proben in 0,2 mm dicken Polyacrylamidgelen und die Detektion der Sequenzmuster erfolgte mit dem LI-COR 4000 L™ DNA-Sequenzierer (LI-COR). Lange Gele (66 cm) wurden für das Lesen von bis zu 1.200 Basen verwendet; kurze Gele (40 cm) für die Sequenzierung von Fragmenten bis zu 800 Basen Länge. Nach Reinigung, Entfettung und Zusammenbau der Glasplatten wurde die Polyacrylamid-Lösung mittels 50 ml-Spritze durch einen 0,45 µm-Filter zwischen die Platten gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente eine 1:10-Verdünnung des 10x LongRun-Konzentrates. Die Polyacrylamid-Lösung für lange Gele (4 %) bestand aus 32 ml Sequagel® XR (National diagnostics), 8 ml Sequagel-Puffer, 2 ml 10x LongRun-Puffer, 15 ml H₂O, 8 g Harnstoff, 400 µl 10%igem APS und 20 µl TEMED; für ein kurzes Gel kamen 30 ml Sequagel® XR, 7,5 ml Sequagel-Puffer, 300 µl 10%iges APS und 400 µl DMSO zum Einsatz. Die Gelsubstanz polymerisierte nach dem Gießen mindestens 1 h lang; danach wurden die Glasplatten von außen erneut gereinigt und zwischen die Elektroden des Sequenzierers montiert. Dem Auffüllen der Puffer-Tanks mit LongRun-

Puffer folgte ein 30minütiger Vorlauf (lange Gele: 2000 V, 37 mA, 50 W, 45°C; kurze Gele: 1500 V, 37 mA, 50 W, 50°C). Anschließend wurde der 48er-Haifischzahn-Kamm eingesteckt, in jede Aussparung 1 µl der entsprechenden Proben aufgetragen und die Hochspannung mit den gleichen Bedingungen wie beim Vorlauf wieder eingeschaltet. Durch die Software-Funktionen des Programms DataCollection „Autofocus“ und „Autogain“ wurde eine korrekte Justierung der Optik von Laser und Scanner, sowie eine optimale Signal-Verstärkung sichergestellt und anschließend der Scanner eingeschaltet. Das virtuelle Gelbild konnte schon während des Laufes betrachtet und später mittels der zugehörigen Software (Programm ImageAnalysis) automatisch oder manuell ausgewertet werden.

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

4.2.2 Arbeiten mit Zellen

4.2.2.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken

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

Streptomycin zugesetzt wurden.

Die Zellen wurden im Abstand von drei bis vier Tagen passagiert; hierzu wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit 2 ml Trypsin-Lösung kurz abgespült; nach Inkubation mit 1 ml Trypsin für 1-2 min konnten die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Schale gelöst und vereinzelt werden. Die Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert, dann wurde $\frac{1}{30}$ dieser Suspension in einer neuen Schale mit 10 ml Medium gemischt und wieder unter den oben genannten Bedingungen inkubiert.

Um Zellen der gewünschten Konfluenz für Experimente zur Verfügung zu haben, wurden diese nach der Trypsinbehandlung dichter ausgesät. Wurden für bestimmte Experimente exakte Zellmengen benötigt, wurden die Zellen nach der Trypsinierung in 20 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 90 μ l 0,025% (w/v) Trypanblau (in 0,15 M NaCl) gemischt und mit der Mischung eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Kleinquadrat-Fläche = 0,0625 mm²; Höhe = 0,2 mm) befüllt. Nach Auszählung der Zellen in vier Großquadraten (n = Gesamtzahl der Zellen in 4 Großquadraten) konnte die Zellzahl mit der Formel

$$\text{Zellen/ml} = n \times 4 \times 0,31 \ 1000 \times V$$

(V=Verdünnungsfaktor=10)

berechnet werden. Die benötigte Menge Zellen wurde mit 2 ml Medium in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte (3,5 cm Durchmesser) ausgesät. Alternativ wurde in jede Vertiefung der 6-Well-Platte etwa $\frac{1}{25}$ der Zellsuspension einer dicht bewachsenen 10 cm-Schale in 2 ml Medium übertragen.

4.2.2.2 T7-Vacciniavirus-Expressionssystem und radioaktive Proteinmarkierung

Nach Infektion von BHK-Zellen mit rekombinantem Vacciniavirus MVA-T7pol kommt es im Zytoplasma der Zellen zur Expression der T7-DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Nach anschließender Transfektion entsprechender Plasmide werden mRNAs transkribiert, die unter Kontrolle des T7-Polymerase-Promotors stehen (Sutter et al., 1995). Da die entstehenden Transkripte durch die T7-Polymerase des Vacciniavirus an den 5'-Enden nur uneffizient mit *Cap*-Strukturen versehen werden, wurden in dieser Arbeit zur T7-Vaccinia-Expression Plasmide verwendet, die auf dem Vektor pCITE basieren; dessen IRES verbessert die Effizienz der Translation der entstehenden mRNAs deutlich, da die Initiation der Translation *cap*-unabhängig erfolgt.

Die zur Expression eingesetzten BHK-Zellen wurden am Vortag im 6-Well-Format so ausgesät, dass am nächsten Tag ein optisch lückenloser Zellrasen vorlag (s.o.). Die Infektion mit dem Vacciniavirus MVA-T7pol erfolgte in 1 ml serumfreiem Medium für 1 h im Brutschrank mit einer MOI von 3. Zur Transfektion der Expressionsplasmide wurde das Transfektions-Reagenz Superfect® nach der Vorschrift des Herstellers (Qiagen) verwendet. Bei dieser Transfektionsmethode handelt es sich um eine Lipofektion (Felgner et al., 1987) mit einer kationischen Trägersubstanz, die eine endosomale Aufnahme von DNA ermöglicht und den pH-Wert im Lysosom abpuffert, sobald die Fusion von Endosom und Lysosom stattgefunden hat, wodurch ein Transport der auf diese Weise stabilisierten DNA in die Zelle ermöglicht wird. Zur Transfektion wurden 2 µg Plasmid-DNA (bei Doppeltransfektionen pro Plasmid 1,5 µg DNA) mit 70 µl Medium ohne FCS und Antibiotika vermischt; diese Lösung wurde mit 10 µl Superfect® versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Vacciniavirus-Infektion

wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und nach Waschen mit PBS durch 1 ml Zellkulturmedium mit FCS und Penicillin/Streptomycin ersetzt. Die Transfektionsansätze wurden dazugegeben und durch Schwenken der Platte auf den Zellen verteilt.

Zur weiteren Analyse mittels Westernblot wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in jeweils 600 µl SDS-Lysepuffer unter Zusatz von 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol lysiert und das Lysat bei -20°C gelagert.

Zur radioaktiven Proteinmarkierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Überstand durch 1 ml Methionin- und Cystein-freies DMEM-Hungermedium ersetzt (Dulbecco's modified Eagle's Medium ohne Methionin, Cystein und Glutaminsäure mit Zusatz von 1% (v/v) Glutamax-Lösung). Die Inkubation in diesem Medium für 1 h führt zur Entleerung der intrazellulären Speicher dieser schwefelhaltigen Aminosäuren und erhöht die Effizienz der nachfolgenden metabolischen Markierung der Proteine. Nach erneutem Austausch des Mediums mit Methionin- und Cystein-freiem Hungermedium erfolgte die Zugabe von 50 µCi [³⁵S]-markiertem Methionin und Cystein (ProMix, Amersham). Die radioaktiv markierten Aminosäuren wurden durch Schwenken der Platte verteilt, die Zellen für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 600 µl RIPA-Puffer unter Zusatz von 0,5% (v/v) des Proteinase-Inhibitors Pefabloc-SC (Merck) unter Schwenken lysiert. Die Lysate wurden für 30 min bei 4°C auf einem vertikalen Drehrad inkubiert, um eine vollständige Lyse zu erreichen. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C, um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren; der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert bis er zur Immunpräzipitation eingesetzt wurde.

4.2.2.3 Infektion von Zellen u. Wachstumskurven („*Time course*“)

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden die Zellen gezählt und 4×10^5 Zellen pro 6-Well-Vertiefung ausgesät. Zum Zeitpunkt der Infektion wiesen die Zellen eine Konfluenz von etwa 80% auf. Nach Abnehmen des Überstandes und Waschen mit PBS wurden die Zellen bei einer MOI von 5 infiziert. Die Infektion erfolgte in serumfreiem Medium. Nach einer Stunde wurde der Überstand nach dreimaligem Waschen mit PBS wieder durch 2 ml FCS-haltiges Medium ersetzt. Zur weiteren Analyse mittels Westernblot wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in jeweils 600 μ l SDS-Lysepuffer unter Zusatz von 5% (v/v) β -Mercaptoethanol lysiert und das Lysat bei -20°C gelagert.

Zur Erstellung von Wachstumskurven und zur Untersuchung der viralen RNA-Akkumulation in der Zelle („*Time course*“-Experimente) wurden die Infektionen wie oben beschrieben angesetzt, allerdings wurde jede Infektion im 12fach-Ansatz durchgeführt, dies entspricht 4 Zeitwerten jeweils im Dreifachansatz. Zum Zeitpunkt 12 h, 24 h, 36 h und 48 h *post infectionem* wurden Proben der Zellkulturüberstände abgenommen und bis zur Titerbestimmung bei -20°C gelagert. Die infizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 350 μ l Puffer RA1 (Nucleospin® RNA II-Kit, Macherey-Nagel) lysiert. Das Lysat wurde maximal 5 Tage bis zur RNA-Präparation bei -20°C gelagert.

4.2.2.4 Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen

Titerbestimmungen erfolgten nach dem Verfahren der Endpunktverdünnung. Um den Virustiter von Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurden MDBK-Zellen mit seriellen Verdünnungen des virushaltigen Überstandes in 96-Well-Mikrotiterplatten inkubiert und die Etablierung einer Infektion später in der Immunfluoreszenz beurteilt.

Beginnend mit einer Vorverdünnung des Überstandes in

Zellkulturmedium von 1:10 oder 1:100 wurde der Verdünnungsfaktor in 12 Stufen von Well zu Well jeweils um den Faktor 3 erhöht. Hierzu wurden in alle Wells der 96-Well-Mikrotiterplatten 100 µl Zellkulturmedium vorgelegt und jeweils 50 µl von einer Stufe zur nächsten übertragen; 50 µl aus der letzten Stufe wurden verworfen. Für jede Titerbestimmung wurde diese Verdünnungsreihe im Vierfachansatz durchgeführt.

Anschließend wurden MDBK-Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm-Zellkulturschale durch Trypsinbehandlung vereinzelt und in 30 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 10 µl dieser Suspension mit 90 µl einer 0,025 % (w/v) Trypanblau-Lösung vermischt und in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellzahl bestimmt (siehe Kap. 4.2.2.1). Die Suspension wurde anschließend durch entsprechende Verdünnung mit Medium auf eine Zellkonzentration von 2×10^5 Zellen je ml eingestellt.

100 µl der verdünnten Zellen (2×10^4 Zellen) wurden in jedes Well der Virus-Verdünnungsreihe zugegeben. Nach Inkubation im Brutschrank (37°C; 5% CO₂; 96 % relative Luftfeuchtigkeit) für drei Tage wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz-Analyse (s.u.) auf das Vorhandensein des viralen Proteins NS3 und damit auf Virusinfektion untersucht. Dazu wurde als Primärantikörper der monoklonale Antikörper „Code 4“ in der Verdünnung 1:20 in PBS⁺⁺ eingesetzt, als Sekundärantikörper diente Cy3-konjugierter Anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:500 in PBS⁺⁺. Titerberechnungen bei Endpunktverdünnungsverfahren erfolgen stets mit Hilfe statistischer Schätzverfahren. Hier wurde die Formel nach

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

m = negativer dekadischer Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen, d.h. der Titer des Testvolumens ergibt sich aus 10^{-m} .

Da als Testvolumen 50 μ l eingesetzt wurden, muss dieser Wert mit 20 multipliziert werden, um die Anzahl gewebekultur-infektiöser Viren je ml zu erhalten (GKID₅₀/ml).

x_i = Logarithmus der kleinsten Verdünnung, die zur Infektion aller vier Replikate einer Verdünnungsstufe führt (z.B. wäre in Stufe 6: $x_i = \lg(1/72.900) = -4,86$)

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

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

4.2.2.5 Immunfluoreszenz

Zum Zwecke der indirekten immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Zellen wurden diese nach dem Waschen mit PBS⁺⁺ (0,49 mM MgCl₂; 0,68 mM CaCl₂ in PBS) zunächst durch Zugabe von 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS⁺⁺ und Inkubation bei 4°C für 20 min fixiert. Nach dem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellmembranen durch Zugabe von 0,5% (w/v) N-octyl- β -D-Glucopyranosid in PBS⁺⁺ und anschließende Inkubation bei 4°C für 5 min permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die Primärantikörper, monoklonale Antikörper aus Maus-Hybridomen oder polyklonale Kaninchenserum, wurden mit PBS⁺⁺ in einem vom Antikörper abhängigen Mischungsverhältnis verdünnt; diese Lösung wurde für 1 h bei 37°C auf den Zellen belassen, bevor diese zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen wurden. Um einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe zu ermöglichen, wurden als Sekundärantikörper Cy3-konjugierte Anti-Maus-IgG bzw. Anti-Kaninchen-IgG verwendet. Diese

Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:500 in PBS⁺⁺ verwendet und ebenfalls für 1 h bei 37°C auf den Zellen belassen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ konnten die Präparate im Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 35 der Firma Zeiss (Filtersatz für Cy3: BP 546 / FT 580 / LP 590) betrachtet werden.

4.2.2.6 Erstellung von Zelllinien durch stabile Transfektion

Die Ausgangszellen (PT-Zellen) wurden im 6-Well-Format ausgesät, sodass die Zellen am folgenden Tag zur Transfektion eine Konfluenz von etwa 60-80% aufwiesen. Damit möglichst viele Zellen stabil transfiziert werden können, darf der Zellrasen nicht zu dicht sein.

2-3 µg des zu transfizierenden Plasmids wurden durch Restriktionsenzymverdau mit einem in diesem Plasmid nur einmal schneidenden Enzym linearisiert und nach Phenol-Chloroform-Extraktion mit 4 M Lithiumchlorid gefällt. Falls dieses Plasmid keinen Selektionsmarker kodierte, wurden zusätzlich Resistenzplasmide verwendet, welche nach stabiler Transfektion den Zellen eine Antibiotikaresistenz vermittelten. Diese wurden ebenfalls linearisiert, allerdings wurden nur 100-200 ng des linearisierten Resistenzplasmids kotransfiziert. Die Linearisierung der Plasmid-DNA soll die Integration in das zelluläre Genom fördern und die Häufigkeit stabil transfizierter Zellen erhöhen. Die Zellen wurden mit 2 µg des linearisierten Plasmids unter Verwendung von 10 µl des Transfektionsreagenz MetafecteneTM (Biontex) nach der Vorschrift des Herstellers transfiziert. Die erreichbare Transfektionsrate beträgt mit der beschriebenen Methode 10-20%; bis zu 2% der Zellen werden stabil transfiziert. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt, und nach 2 Tagen wurde die Selektion auf stabil transfizierte Zellen begonnen. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:10 bis 1:1000, entsprechend etwa 10⁵ bis 10³ Zellen) mit Selektionsmedium in 10 cm -

Kulturschalen ausgesät.

Nach 10 bis 14 Tagen, innerhalb dieser Zeit waren die stabil transfizierten Zellen zu Kolonien herangewachsen, wurden einzelne Zellklone mit einer stumpfen Pipettenspitze punktuell trypsiniert, vorsichtig abgelöst und in die Vertiefungen einer 48-Well-Platte mit Selektionsmedium überführt. Nach 2 Passagen konnten die Zellklone im 12-Well-Maßstab auf die Anwesenheit des transfizierten Plasmids getestet werden.

Die positiven Zellklone wurden zur Reklonierung ein weiteres Mal vereinzelt und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:10.000 bis 1:100.000, entsprechend 10 bis 100 Zellen) mit Selektionsmedium ausgesät. Nach 10 Tagen waren die Reklone zu Kolonien herangewachsen und konnten wie oben beschrieben passagiert und getestet werden. Eine Auswahl der positiven Reklone wurde zur dauerhaften Lagerung kryokonserviert.

4.2.2.7 Kryokonservierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden von jeder Zelllinie mehrere Kryokulturen angelegt, die in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut wurden. Nach dem Ablösen der Zellen einer 10 cm-Schale mittels Trypsin wurden diese mit 5 ml Medium in ein 15 ml-Gewebekulturröhrchen überführt und für 2 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1,8 ml reinem FCS resuspendiert. In 2 Kryoröhrchen wurde jeweils 100 µl DMSO vorgelegt und 900 µl der Zellsuspension zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Kryoröhrchen in eine nach Vorschrift des Herstellers mit Isopropanol befüllte Kryobox (Nalgene) gestellt und diese bei -70°C eingefroren. In dieser Box werden die Zellen schonend um 1°C pro Minute bis auf -70°C abgekühlt, bevor sie schließlich in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden können.

4.2.3 Arbeiten mit Proteinen

4.2.3.1 Radioimmunpräzipitation

Grundlage der Radioimmunpräzipitation (RIP) ist die metabolische Markierung synthetisierter Proteine durch Zugabe radioaktiver Aminosäuren (hier [³⁵S]-Methionin und -Cystein). Durch Inkubation des Zell-Lysates mit einem spezifischen Antikörper entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe, die durch Zugabe einer Affinitätsmatrix (z.B. Protein A - Sepharose) aus der Lösung durch Zentrifugation gereinigt werden können (Harlow und Lane, 1998). Nach Denaturierung und Auftrennung über SDS-PAGE können die präzipitierten Proteine in einem Autoradiogramm nachgewiesen werden. Falls während der Zell-Lyse, der Präzipitation und des Waschens des Präzipitats keine denaturierenden Bedingungen vorliegen, werden nicht nur die direkt mit dem Antikörper reagierenden Proteine, sondern auch solche, die mit diesen Proteinen stabil interagieren, aufgereinigt. Diesen auf Protein-Protein-Wechselwirkung beruhenden Vorgang nennt man Kopräzipitation.

Das radioaktive, von unlöslichen Bestandteilen gereinigte Zell-Lysat (600 µl) wurde für 1 h bei 4°C auf einem vertikalen Drehrad inkubiert. In der Regel wurden 200 µl dieses Lysates für eine Präzipitation verwendet und zusammen mit dem gewünschten Antikörper für 1 h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert; zum Einsatz kamen Immunsereen aus Kaninchen gerichtet gegen das Jiv-Protein oder gegen N^{pro} sowie ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das Penta-His-Epitop (Qiagen). Nach der Bindung des Antikörpers wurden 70 µl einer Protein A-Sepharose-Suspension (25% (v/v) gequollene Protein A - Sepharose in RIPA-Puffer; 1 mM NaN₃) zugegeben, und nach einer weiteren Inkubation für 1 h auf dem Drehrad bei 4°C wurde die Suspension 5 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und das Pellet dreimal mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet nach Aufnahme in 100 µl SDS-Lysepuffer mit 5% (v/v) β-Mercaptoethanol 10 min bei 95°C inkubiert, anschließend abgekühlt und kurz zentrifugiert. Der komplette Überstand wurde zur Beladung einer Tasche eines großen Polyacrylamidgels (13 x 15 cm) verwendet.

4.2.3.2 SDS-PAGE und Autoradiographie

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

Die Proben wurden in SDS-Lysepuffer mit 5% (v/v) β-Mercaptoethanol zur Denaturierung 10 min auf 95°C erhitzt. Als Molekulargewicht-Standard diente ein auf jedes Gel aufgetragener gefärbter Protein-Marker (Prestained Protein Marker Broad Range, NEB); falls eine weitere Analyse über Autoradiographie vorgesehen war, wurden zusätzlich noch 2 µl eines durch [¹⁴C]-Methylierung radioaktiv markierten Molekulargewicht-Standards (Amersham) auf das Gel aufgetragen.

Als Laufpuffer zur Elektrophorese dienten Anoden- und Kathodenpuffer;

die angelegte elektrische Spannung betrug bei kleinen Gelen 120 V für etwa 90 min; große Gele liefen über Nacht bei Spannungen zwischen 45 und 60 V, je nach der Konzentration des Acrylamids im Trenngel und der gewünschten Laufweite. Die Elektrophorese wurde i.d.R. abgebrochen, sobald die Bromphenolblau-Front an der Anoden-Seite des Gels ausgetreten war.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel wurde abgetrennt. Das Trenngel wurde entweder zur Durchführung eines Westernblots verwendet (s.u.) oder, im Falle radioaktiver Proben, für 45 min bei Raumtemperatur in Fixierlösung (30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt, anschließend ebenso lange in Amplify®-Fluorographie-Lösung (Amersham) geschwenkt und danach auf Filterpapier unter Vakuum bei einer Temperatur von 65°C für 2 h getrocknet.

Radioaktiv markierte Proteine können nach Auftrennung in einem Elektrophoresegel durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das getrocknete Gel nachgewiesen werden; der Röntgenfilm wird an den entsprechenden Stellen durch die radioaktive Strahlung geschwärzt. Dabei entspricht die Intensität der Schwärzung der Menge des vorhandenen Proteins. Zur Herstellung dieser Autoradiogramme wurden Biomax®-Röntgenfilme (Kodak) in lichtundurchlässigen Filmkassetten direkt auf die getrockneten Gele gelegt, für mindestens einen Tag bei -70°C gelagert und anschließend entwickelt. Je nach Signalstärke wurden anschließend kürzere oder längere Expositionen durchgeführt.

4.2.3.3 Westernblot („semi-dry“-Verfahren)

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose-Membran Bio Trace NT (Pall Gelman Laboratory) im elektrischen Feld (Westernblot) wurde mit Hilfe der Elektroblot-Apparatur Trans-Blot® SD (BioRad) in einem halbtrockenen Verfahren

(„semi-dry“) durchgeführt. Die Puffer Roti-Blot® A und K (Roth) wurden dazu nach den Angaben des Herstellers eingesetzt: 10% (v/v) Pufferkonzentrat und 20% (v/v) Methanol in Wasser.

Die Gele wurden 5 min im Kathodenpuffer geschwenkt, während die Membran mit Anodenpuffer befeuchtet wurde. Anschließend wurden auf der Anode der Blot-Apparatur drei mit Anodenpuffer befeuchtete Filterpapiere (Whatman) passender Größe und die Membran übereinander platziert; auf die Membran wurde das Gel, darüber weitere drei mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. Nach dem Entfernen von Luftblasen zwischen den Schichten und dem Anbringen der Kathode wurde eine elektrische Gleichspannung (maximal 13 V) angelegt; für den Proteintransfer aus kleinen Gelen wurde der Stromfluss auf 5 mA/cm^2 , bei großen auf 3 mA/cm^2 begrenzt; die Transferdauer lag für kleine Gele bei 30 min, für große Gele bei 60 min. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach dem Proteintransfer für mindestens 1 h in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-Tween (0,05% (v/v) Tween-20 in PBS) unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert; anschließend erfolgte i.d.R. eine Inkubation im Kühlschrank über Nacht, wodurch die Hintergrundsignale deutlich verringert werden konnten. Nach kurzem Waschen der Membran mit PBS-Tween erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (monoklonaler Antikörper oder Kaninchen-Immuneserum, verdünnt mit PBS-Tween in unterschiedlichem Verhältnis abhängig vom Antikörper). Nach Inkubation für 1 h und dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit PBS-Tween wurde der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus-IgG bzw. gegen Kaninchen-IgG zugegeben (verdünnt mit PBS-Tween im Verhältnis 1:10.000) und die Membran unter Schwenken 1 h mit dieser Lösung inkubiert. Nach weiteren drei Waschvorgängen mit PBS-Tween wurde

die Membran mit frisch angesetzter Chemilumineszenz-Lösung (Perkin-Elmer) nach Vorschrift des Herstellers befeuchtet; nach einer zweiminütigen Inkubation wurde überschüssige Lösung abgetupft und die Membran mit einer Klarsichtfolie abgedeckt. Biomax®-Röntgenfilme (Kodak) passender Größe wurden durch direkte Exposition zunächst für 30 sec belichtet und sofort entwickelt; je nach Intensität des erhaltenen Signals wurden anschließend längere oder kürzere Belichtungszeiten gewählt.

4.2.4 Arbeiten mit RNA

4.2.4.1 *In vitro*-Transkription

Die *in-vitro*-Transkription von RNA auf der Grundlage von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Kits MAXIscript™ der Firma Ambion nach den Vorgaben des Herstellers unter Verwendung der SP6-DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Die doppelsträngigen DNA-Matrizen trugen hierzu einen SP6-Promotor oberhalb der zu transkribierenden Region und wurden unterhalb dieses Bereiches durch einen Restriktionsenzym-Verdau mit einem singularär schneidenden Enzym (i.d.R. *Sma*I) linearisiert. Der vollständige Ablauf des Verdauens von 3 µg Plasmid-DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese eines Aliquots der Reaktion überprüft. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 5% (v/v) 0,5 M EDTA-Lösung, 10% (v/v) 3 M Natriumacetat-Lösung und zwei Volumen Ethanol gestoppt; die Fällung der linearen DNA erfolgte bei -20°C für mindestens 30 min, bevor sie bei 16.000 g und 4°C für 30 min abzentrifugiert wurde. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde die DNA in 14 µl ddH₂O resuspendiert und in die Transkriptions-Reaktion eingesetzt; hierzu wurden 2 µl Transkriptionspuffer, jeweils 1 µl ATP, CTP, GTP und UTP (je 10 mM) und 2 µl SP6-Enzym-Mix zugemischt. Die Transkriptionsreaktion fand für 1 h bei 37°C statt.

Die Phagen-RNA-Polymerase bindet dabei zuerst an den

doppelsträngigen DNA-Promotor, entwindet dann die beiden DNA-Stränge und verwendet den 3'→5'-Strang als Matrize zur Synthese eines komplementären 5'→3'-RNA-Moleküls bis zum Ende der Matrize, welches durch die Linearisierung mittels Restriktionsenzymverdau generiert wurde („*Run off*-Transkription“). Der minimale SP6-Promotor besteht aus 18 Nukleotiden (ATTTAGGTGACACTATAGAAAGNG; unterstrichen: minimale Sequenz; **fett**: erstes transkribiertes Nukleotid).

Nach der Transkription wurde die DNA-Matrize durch einen Verdau mit DNase I (1 µl DNase I; 37°C) entfernt; diese Reaktion wurde nach 15 min durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Schließlich wurden die freien Nukleotide durch eine Natriumacetat-Ethanol-Präzipitation der RNA aus der Reaktion entfernt; hierzu wurden weitere 30 µl ddH₂O zur Reaktion gegeben und das Endvolumen damit auf 50 µl eingestellt. Durch Zugabe von 5 µl einer 5 M Natriumacetat-Lösung und 150 µl Ethanol, 30 min Inkubation bei -20°C und anschließender Zentrifugation bei 16.000 g und 4°C für 30 min, wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Die Konzentration der RNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt oder durch UV-Absorptionsmessung (s.u.) bestimmt. Die RNAs wurden bei -70°C gelagert.

4.2.4.2 RNA-Präparation und Konzentrationsbestimmung

RNA-Präparationen aus Zellen wurden mit Hilfe des Nucleospin® RNA II-Kits (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor der Präparation wurden die benötigte RNase-freie DNase-Lösung (ein Aliquot lyophilisiertes Enzym gelöst in 540 µl RNase-freiem ddH₂O) und der Puffer RA3 (Zugabe von 50 ml Ethanol zu 12,5 ml Pufferkonzentrat) angesetzt. Etwa 2×10^6 Zellen wurden nach Abnahme des Zellkulturüberstandes und Waschen mit PBS durch Zugabe von 350 µl RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol in der Zellkulturschale lysiert.

Zur Reduktion der Viskosität und Klärung des Lysates diente die Filtration durch eine Nucleospin®-Filtereinheit mittels Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min in einer Tischzentrifuge. Um in der homogenisierten Lösung die benötigten RNA-Bindungs-Konditionen einzustellen, erfolgte die Zugabe von 350 µl 70% (v/v) Ethanol bevor die Mischung auf eine Nucleospin® RNA II-Säule pipettiert und für 30 sec bei 8.000 g zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte die Entsalzung der Silikamembran durch 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) und Zentrifugation bei 11.000 g für 1 min. Zum Abbau evtl. an die Silikamembran gebundener DNA wurden 10 µl DNase-Lösung (s.o.) mit 90 µl DNase-Reaktionspuffer vermischt und auf die Membran pipettiert; nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Membran durch Zugabe von 200 µl Waschpuffer RA2 und Zentrifugation (8.000 g für 30 sec) gewaschen; der zweite Waschschrift wurde mit 600 µl Waschpuffer RA3 (8.000 g für 30 sec), der dritte mit 250 µl RA3 (11.000 g für 2 min) durchgeführt. Die gereinigte RNA konnte anschließend durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem ddH₂O und Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g eluiert werden.

Um den RNA-Gehalt der Lösungen zu bestimmen, wurde die UV-Licht-Absorption der verdünnten Lösung in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) gemessen. 1 µl der RNA-Lösung wurde hierzu mit 99 µl ddH₂O verdünnt und die Absorption durch diese Lösung, gegen reines Wasser als Referenz, bestimmt. Einzelsträngige RNA in einer Konzentration von etwa 40 µg/ml ergibt bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Absorptionswert von 1. Ausgehend von diesen Werten ergab sich mit einem Verdünnungsfaktor von 100 die RNA-Konzentration in µg/µl durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 4.

4.2.4.3 Agarosegel-Elektrophorese von RNA und Northernblot

5 µg jeder RNA wurden unter Zugabe von 6 µl 5x Phosphat-Puffer, 3,6 µl Glyoxal und ddH₂O auf 30 µl für 45 min bei 56°C glyoxyliert und mittels Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (1% (w/v) Agarose in 1x Phosphatpuffer; Zugabe von 3,7% (w/v) Formaldehyd nach dem Kochen). Der benötigte 1x und 5x Phosphat-Puffer wurde durch entsprechende Verdünnungen des 50x Konzentrats mit ddH₂O hergestellt. Nach einem Vorlauf des Gels für 15 min bei 120 V wurden die Proben nach Zugabe von 5 µl Probenpuffer aufgetragen. Nach 10 min bei einer Spannung von 120 V wurde der Elektrophoresepuffer bis zum Ende des Gel-Laufs für weitere 4 h ständig umgepumpt.

Die RNA wurde mittels Kapillarblot mit 10x SSC als Blotting-Puffer über Nacht auf eine Nylon-Membran (Duralon-UV™, Stratagene) transferiert. Es folgte ein UV-Crosslink (120mJ über 30 sec) und das Entfernen des Glyoxals durch mindestens dreistündiges „Backen“ der Membran bei 85°C. Zur Detektion der RNA wurde als Sonde ein mit α[³²P] markiertes DNA-Fragment eingesetzt. Die Markierung der Sonde erfolgte nach dem Prinzip der Nick-Translation (NT) unter Verwendung des Nick-Translations-Kits der Firma Amersham. Im 20 µl-Ansatz wurden 50 ng des Sonden-Fragmentes mit 4 µl NT-Mix (enthält jeweils 100mM dGTP, dATP, dUTP), 2 µl NT-Enzym-Mix (enthält 0,5 U/µl DNA-Polymerase I und 10 pg/µl DNase I) und 2,5 µl α[³²P]dCTP (10mCi/ml) für 1 h bei 15°C im Wasserbad inkubiert.

In der Nick-Translations-Reaktion verursacht die DNase I zufällig verteilte Einzelstrangbrüche der DNA („Nicks“), welche infolge der 3'→5'-Polymerase-Aktivität und der 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I mit Desoxynukleosidmonophosphaten wieder aufgefüllt werden. Dabei werden neben den gewöhnlichen dNTPs auch

die α [³²P]dCTPs eingebaut und die DNA somit radioaktiv markiert.

Nach Zugabe von 80 μ l TES-Puffer, um die Reaktion zu stoppen, wurde die radioaktiv markierte Sonde über eine Sephadex® G50-Säule gereinigt und anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Membran wurde inzwischen für 30 min bei 65°C in 10 ml NB-Hybridisierlösung (+ 7% SDS) prähybridisiert, dann erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde in 10 ml frischer Hybridisierlösung bei 65°C über Nacht.

Neben der spezifischen Sonde wurde jeweils auch eine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) -Sonde in der Hybridisierung eingesetzt. GAPDH wird als sogenanntes „housekeeping“-Genprodukt in konstanter Menge in den Zellen exprimiert, daher kann der Nachweis der GAPDH-RNA zur Ladekontrolle, d.h. zur Kontrolle der im Northern Blot eingesetzten Menge an Gesamtzell-RNA dienen

Nach einmaligem Waschen mit NB-Waschlösung (+ 5% SDS) für 30 min bei 65°C und zweimaligem Waschen mit NB-Waschlösung (+ 1% SDS) für 30 min bei 65°C wurde die Membran mit Klarsichtfolie abgedeckt und zur Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Biomax®-Röntgenfilm (Kodak) wurde in einer lichtundurchlässigen Filmkassette direkt auf die abgedeckte Membran gelegt, darüber wurde eine Verstärkerfolie platziert und die Kassette für mindestens einen Tag bei -70°C gelagert.

Wenn die radioaktive Sonde wie in diesem Fall mit einem sehr energiereichen Strahler wie [³²P] markiert ist, kann die Empfindlichkeit des autoradiographischen Nachweises durch den Einsatz einer Verstärkerfolie um das fünf- bis zehnfache gesteigert werden. Die energiereichen Elektronen des β -Strahlers durchdringen den Film, werden in der Folie absorbiert und regen dort die Elektronen einer fluoreszierenden Verbindung an, welche bei der anschließenden Relaxation Licht emittieren, das den Röntgenfilm schwärzt. Da die

Intensität der Fluoreszenz temperaturabhängig ist, kann die Empfindlichkeit der Methode durch die Lagerung der Kassette bei -70°C noch gesteigert werden.

Nach einer Expositionsdauer von einem Tag wurde der Film entwickelt. Je nach Signalstärke wurden danach kürzere oder längere Expositionen durchgeführt.

4.2.4.4 Phosphorimager-Auswertung von Northernblots

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

Zur Quantifizierung wurden die Membranen für mindestens 24 h auf Phosphorimager-Platten gelegt und anschließend die absorbierte β -Strahlung ausgelesen (Software „*Typhoon Scanner Control*“; beste Signalverstärkung; Auflösung = 100 microns). Die zu quantifizierenden Banden und ein Hintergrundbereich gleicher Fläche wurden für jede Spur markiert und die Signalstärke über den Befehl „*Volume-Report*“ ohne automatische Hintergrund-Korrektur ausgegeben (Software „*Typhoon Image Quant*“). Die Daten konnten anschließend in das Tabellenkalkulations-Programm Excel (Microsoft™) exportiert und weiter verarbeitet werden. Der Wert des Signals einer Bande abzüglich des

entsprechenden Hintergrund-Wertes diene zur Errechnung der einzelnen RNA-Mengen. Um exaktere Ergebnisse zu erhalten, wurden die ermittelten Werte in Relation zur Ladekontrolle GAPDH gesetzt.

4.2.4.5 Nachweis von siRNA im Northernblot

Mit Hilfe des mirVana™ miRNA Isolation Kits (Ambion) wurde nach dem Protokoll für die Anreicherung kleiner RNA-Spezies Gesamtzell-RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert. Zum Nachweis der siRNAs wurde ein denaturierendes Polyacrylamidgel mit 15% (w/v) Polyacrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 29:1) und 8 M Harnstoff in TBE eingesetzt. Die Polymerisierung wurde mit 0,05% (w/v) APS und 0,1% (v/v) TEMED ausgelöst und unter Verwendung der Gelapparatur der Firma Hoefer ein großes Gel (13x15 cm) gegossen. 1 µg der mit kleinen RNA-Spezies angereicherten Gesamtzell-RNA wurde mit einem identischen Volumen des im Kit enthaltenen Formamid-Probenpuffers (mit Bromphenolblau und Xylencyanol) gemischt, für 3 min auf 95°C erhitzt und nach Abkühlung auf Eis direkt auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker dienten 10 bis 100 fmol der 21 Basen großen siRNA1(-), welche ebenso vorbehandelt wurde. Die Elektrophorese erfolgte etwa 2 h bei 20 mA bis die Bromphenolblau-Front zur unteren Kante des Geles gewandert war; als Laufpuffer diene 1x TBE.

Das Gel wurde von den Glasplatten gelöst und für 5 min in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE) geschwenkt. Nach fünfminütigem Waschen in 1x TBE konnte die RNA mittels UV-Durchlicht (254 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht werden. Die anschließende Northernblot-Analyse erfolgte nach der leicht abgewandelten Methode von Patterson und Guthrie (Patterson und Guthrie, 1987). Dazu wurde die RNA mittels Elektroblot (siehe Kap. 4.2.3.3) auf eine Nylon-Membran (Duralon-UV™, Stratagene) transferiert. Allerdings wurde zum Blotten der RNA 0,25x TBE-Puffer

benutzt, und der Transfer erfolgte 2 h bei 100 mA. Um die RNA auf der Membran zu fixieren, wurde ein UV-Crosslink (120 mJ über 30 sec) durchgeführt.

Zur Detektion der RNA wurde als Sonde das mit $\gamma[^{32}\text{P}]$ radioaktiv markierte DNA-Oligonukleotid siRNA1(+) eingesetzt. Die 5'-Phosphorylierung (Kinasierung) der Sonde erfolgte im 30 μl -Ansatz unter Verwendung von 50 ng Sonden-DNA, 5 μl $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (10 mCi/ml), 0,5 μl Polynukleotidkinase (NEB) und 3 μl 10xPNK-Puffer für 30 min bei 37°C. Nach Zugabe von 70 μl TES-Puffer, um die Reaktion zu stoppen, wurde die kinasierte Sonde über eine Sephadex® G15-Säule gereinigt und anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach einer einstündigen Prähybridisierung der Membran mit Hybridisierlösung bei 65°C erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde in 10 ml frischer Hybridisierlösung bei 54°C (10°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Sonde) über Nacht. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit 10 ml Waschlösung bei 54°C wurde die Membran mit Klarsichtfolie abgedeckt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Biomax®-Röntgenfilm (Kodak) wurde in einer lichtundurchlässigen Filmkassette direkt auf die abgedeckte Membran gelegt, darüber wurde eine Verstärkerfolie platziert, die Kassette für mindestens einen Tag bei -70°C gelagert, und der Film anschließend entwickelt. Je nach Signalstärke wurden danach kürzere oder längere Expositionen durchgeführt.

4.2.4.6 Quantitative Realtime-RT-PCR

Zur vergleichenden Quantifizierung der zellulären Jiv-mRNA-Menge in verschiedenen Zelllinien wurden 500 ng DNA-freie Gesamtzell-RNA mittels quantitativer Realtime-RT-PCR analysiert. Nach der reversen Transkription mit dem Revers-Primer Jiv02R und der reversen Transkriptase Superscript II (Invitrogen) wurde die quantitative Realtime-PCR durchgeführt. Dazu wurde das Gerät AbiPrism7000 Sequence

Detection System (Applied Biosystems) im „*Absolute Quantification*“-Modus benutzt. Mit dem Primerpaar Jiv01/Jiv02R sowie TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) ohne MgCl und der Jiv-spezifischen TaqMan®-Sonde JivTaq01 wurde das Realtime-Programm mit einem Zyklus (2 min 50°C, 10 min 95°C) gefolgt von 40 Zyklen (15 sec 95°C, 1 min 60°C) durchgeführt.

Zur vergleichenden Quantifizierung der viralen RNA in BVDV1-infizierten Zellen wurde die BVDV1-spezifische TaqMan®-Sonde pvtaq01 und das Primerpaar pv02/pv03R unter den gleichen Bedingungen eingesetzt.

TaqMan®-Sonden sind am 5'-Ende und am 3'-Ende mit Fluorochromen (Reporter und Quencher) markiert, sodass nur die an amplifizierte DNA gebundene Sonde ein Signal erzeugt. Somit ist die gemessene Signalstärke des Reporter-Fluorochroms proportional zur Menge gebundener Sonde und zur Menge des Amplifikats. Die Auswertung erfolgt, indem derjenige PCR-Zyklus bestimmt wird, in welchem die Signalstärke einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet; dies ist der Ct-Wert (*cyclus terminalis*).

Die relativen RNA-Mengen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen wurden mit der Formel [% RNA = $1/(2^{\Delta Ct}) \times 100$] berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Proteinprozessierung von BVDV CP8

Der zp BVDV-Stamm CP8 wurde zusammen mit dem nzp Stamm NCP8 aus einem an MD erkrankten Tier isoliert (Corapi et al., 1988). Es wurde nachgewiesen, dass im CP8-Genom eine zelluläre Insertion vorhanden ist, die einen Anteil der zellulären Jiv-Sequenz enthält (Rinck et al., 2002; Müller et al., 2003).

5.1.1 Die Genomstruktur des zp BVDV-Stammes CP8

Im Gegensatz zu allen bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Stämmen mit Jiv-Insertionen befindet sich die Jiv-Insertion des Stammes CP8 nicht im Bereich des NS2-Gens. Durch Sequenzanalyse von drei CP8-spezifischen cDNA-Klonen (CP8/4, CP8/12 und CP8/22) und zwei RT-PCR-Fragmenten (Abb. 7) wurde eine komplexe Insertion im 5´Bereich des CP8-Genoms nachgewiesen (Rinck et al., 2002; Müller et al., 2003).

Im Anschluss an die 5´NTR befindet sich ein komplettes N^{pro}-Gen gefolgt von einer Core-Sequenz, die für das erste Drittel des Core-Proteins (35 AS) kodiert. Auf dieses Core-Fragment (C*) folgen mit den Kodons 204 bis 445 des CP8-Leserahmens zwei Sequenzblöcke mit zellulären Jiv-Sequenzen, die den Kodons 151-226 (Jiv I) und 527-692 (Jiv II) der bovinen Jiv-mRNA entsprechen. Darauf folgt ein Sequenzblock, der für ein stark saures Peptid kodiert, welches eine 95%ige AS-Sequenzhomologie zu dem humanen Kernprotein Hcc-1 (*hepatocellular carcinoma-1*; GenBank Accession-Nr. P82979) aufweist. Dabei handelt es sich um ein Protein, das im Proteom eines Leberzellkarzinoms entdeckt wurde und in differenzierten Leberkarzinomzellen überexprimiert wird (Choong et al., 2001). Im CP8-Genom folgt ein Fragment des pestiviralen E^{ms}-Gens, entsprechend Kodon 509 bis 533 des CP8-Leserahmens (E^{ms*}) und daran anschließend, beginnend mit

Kodon 21 von N^{pro}, ein im Weiteren reguläres Pestivirus-Genom (Abb. 6). Insgesamt umfasst die komplexe Insertion von BVDV CP8 1539 Nukleotide, wodurch die Genomlänge knapp 14 kb erreicht. Die duplizierten Sequenzbereiche von N^{pro} und Core weisen eine hohe Sequenzhomologie (99% auf Nukleotidebene) auf, was darauf schließen lässt, dass sie von der gleichen Ausgangs-RNA abstammen.

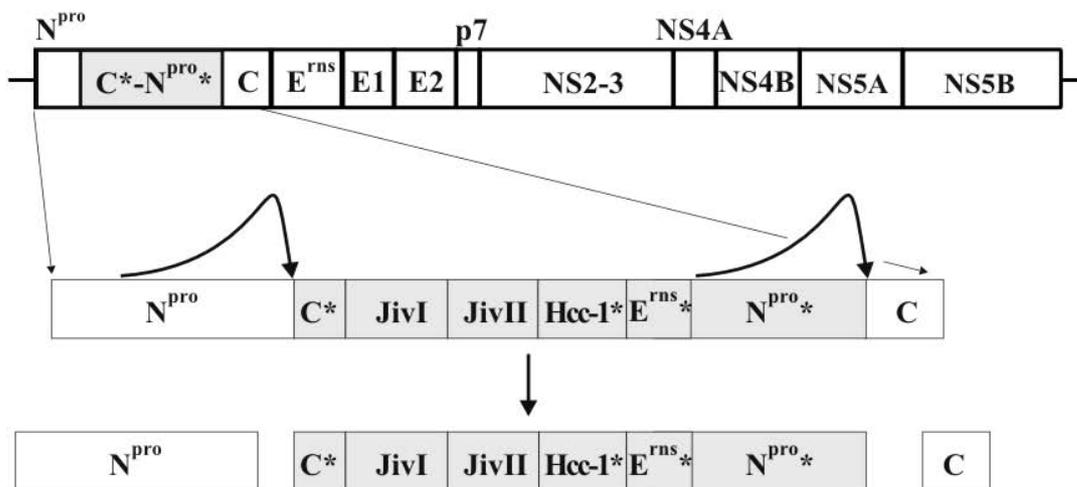


Abb. 6: Genomaufbau und N-terminale Polyproteinprozessierung bei zp BVDV CP8
Ausgehend von der Genomorganisation des zp BVDV-Stammes CP8 ist die Proteinprozessierung in der N-terminalen Region des Polyproteins dargestellt. Der Bereich der Insertion ist grau hinterlegt. Durch die beiden N^{pro}-vermittelten Spaltungen entsteht ein Jiv-Fusionsprotein, das von diesem Stamm zusätzlich zu einem kompletten Satz viraler Proteine exprimiert wird.

5.1.2 N-terminale Polyproteinprozessierung von BVDV CP8

Wie bereits beschrieben besitzt BVDV CP8 zweimal N^{pro}, nämlich ein komplettes N^{pro}, wie man es bei allen Pestiviren findet, und zusätzlich eine N-terminal um 20 AS verkürzte Version (N^{pro}*) als Bestandteil der Insertion in der N-terminalen Region des Polyproteins. Falls beide Enzyme proteolytisch aktiv sind, erfolgen zwei *cis*-Spaltungen: eine Spaltung zwischen N^{pro} und C* sowie eine Spaltung zwischen N^{pro}* und C (Abb. 6). Es zeigte sich, dass auch N^{pro}* trotz der Verkürzung und der N-terminalen Fusion proteolytisch aktiv ist. Außerdem wurde untersucht, ob im Bereich der Insertion weitere Spaltungen stattfinden. Dies ist nach

den vorliegenden Ergebnissen nicht der Fall. Daraus folgt, dass von BVDV CP8 mit C*-N^{pro*} ein zusätzliches 513 AS umfassendes Protein exprimiert wird.

Zur Untersuchung der Prozessierung des CP8-Polyproteins im N-terminalen Bereich wurden sechs verschiedene Expressionskonstrukte (Abb. 7) im T7-Vacciniavirus-Expressionssystem eingesetzt und die Proteinprozessierung mittels Radioimmunpräzipitation und Westernblot untersucht. Außerdem wurden die Proteine aus CP8-infizierten Zellen im Westernblot analysiert und die Ergebnisse mit denen der T7-Vaccinia-Expression verglichen.

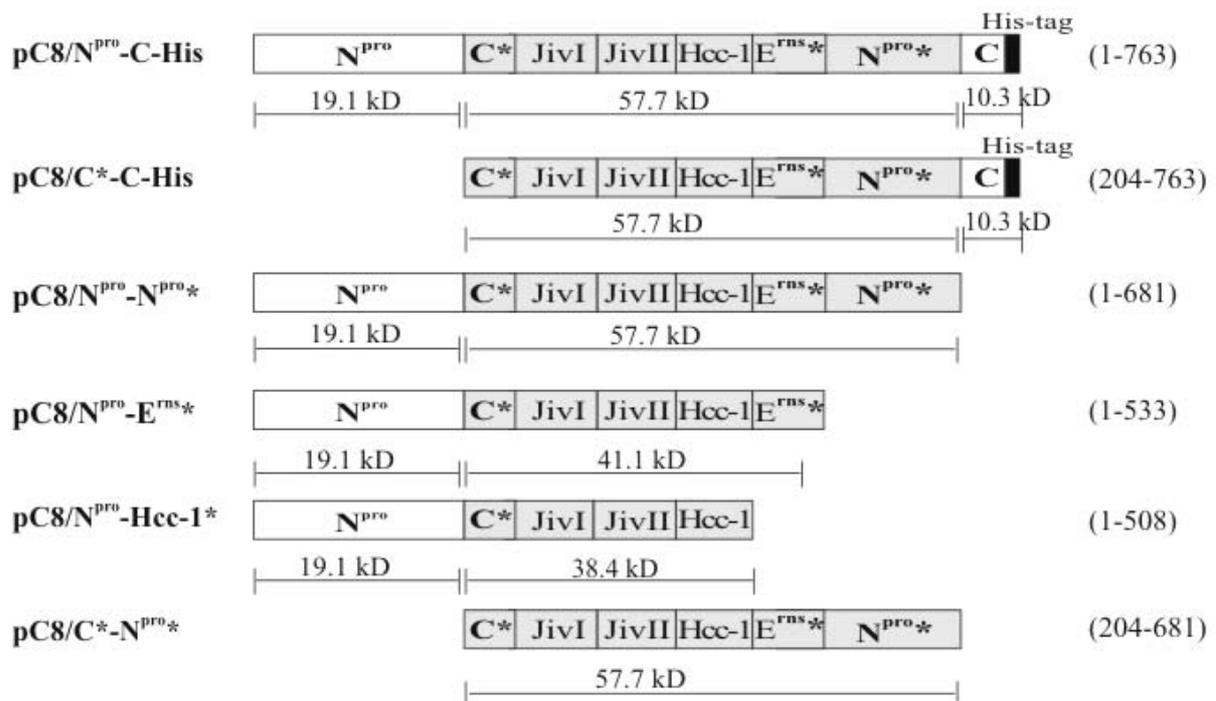
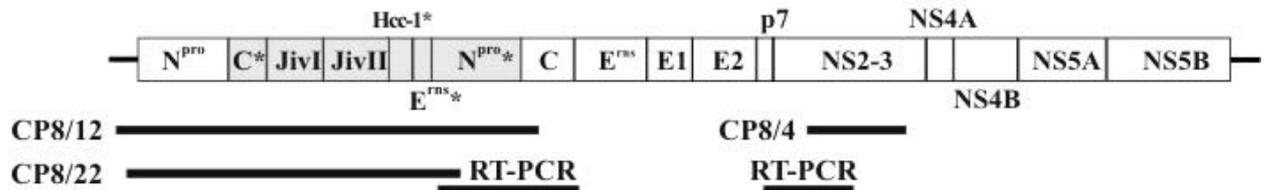


Abb. 7: Das CP8-Genom und davon abgeleitete Expressionskonstrukte

Die schwarzen Balken unterhalb des CP8-Genoms markieren die sequenzierten Bereiche. Unterhalb sind die zur Analyse der N-terminalen Polyproteinprozessierung eingesetzten Expressionskonstrukte dargestellt (in Klammern der exprimierte Proteinbereich). Die Balken unterhalb der einzelnen Konstrukte zeigen die berechneten Molekulargewichte der erwarteten Produkte an. kD=kiloDalton.

Das Konstrukt pC8/N^{pro}-C-His kodiert stromabwärts eines T7-RNA-Polymerase-Promotors die gesamte N-terminale Region des CP8-Polyproteins, beginnend mit N^{pro} bis zum kompletten C und endet mit einem C-terminalen Penta-His-tag. Die übrigen Konstrukte sind verkürzte Abkömmlinge dieses Konstruktes. In pC8/C*-C-His wurde das 5'-terminale N^{pro}-Gen deletiert. Die Polyproteine, die von pC8/N^{pro}-E^{rns*} und pC8/N^{pro}-Hcc-1* kodiert werden, enden mit E^{rns*} bzw. mit Hcc-1*. Das Konstrukt pC8/C*-N^{pro*} umfasst die komplette CP8-Insertion; das exprimierte Protein stellt gleichzeitig das CP8-spezifische 513 AS umfassende Spaltprodukt dar, welches entsteht, wenn beide N^{pro}-Varianten (N^{pro} und N^{pro*}) proteolytisch aktiv sind und darüber hinaus keine weiteren Spaltungen in diesem Bereich auftreten.

Die mittels T7-Vaccinia-Expression exprimierten Proteine wurden nach metabolischer Markierung mit ³⁵[S]-Methionin und ³⁵[S]-Cystein in der Radioimmunpräzipitation analysiert. Dazu wurde ein gegen das Jiv90-Fragment in der JivII-Domäne gerichtetes Kaninchenserum (N3) oder ein gegen das N^{pro}-Protein gerichtetes Kaninchenserum (F1) benutzt. Zusätzlich wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Penta-His-Epitop benutzt. Nach Expression von pC8/N^{pro}-C-His wurde in den Zelllysaten mit dem N^{pro}-spezifischen Serum neben dem N^{pro}-Protein (20 kDa) ein weiteres Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 64 kDa nachgewiesen (Abb. 8, Spur 7). Das 64 kDa große Protein konnte ebenfalls mit dem Jiv-spezifischen Serum nachgewiesen werden (Abb. 8, Spur 2), woraus geschlossen werden kann, dass es sich dabei um das 513 AS umfassende Protein C*-N^{pro*} handelt. Der monoklonale Antikörper gegen das His-Epitop erkannte ein 15 kDa großes Protein, welches mit dem erwarteten Spaltprodukt C-His übereinstimmt (Abb. 8, rechts). Die ungewöhnlich geringe Mobilität dieses Peptids im Gel, die zu einem sehr hohen scheinbaren

Proteingewicht im Vergleich zum rechnerischen Proteingewicht führt, ist wahrscheinlich durch seinen basischen Charakter (isoelektrischer Punkt = 10,8) bedingt. Zusätzliche Proteinbanden, bei denen es sich um Prozessierungszwischenstufen handelt, wurden besonders nach längeren Expositionszeiten sichtbar.

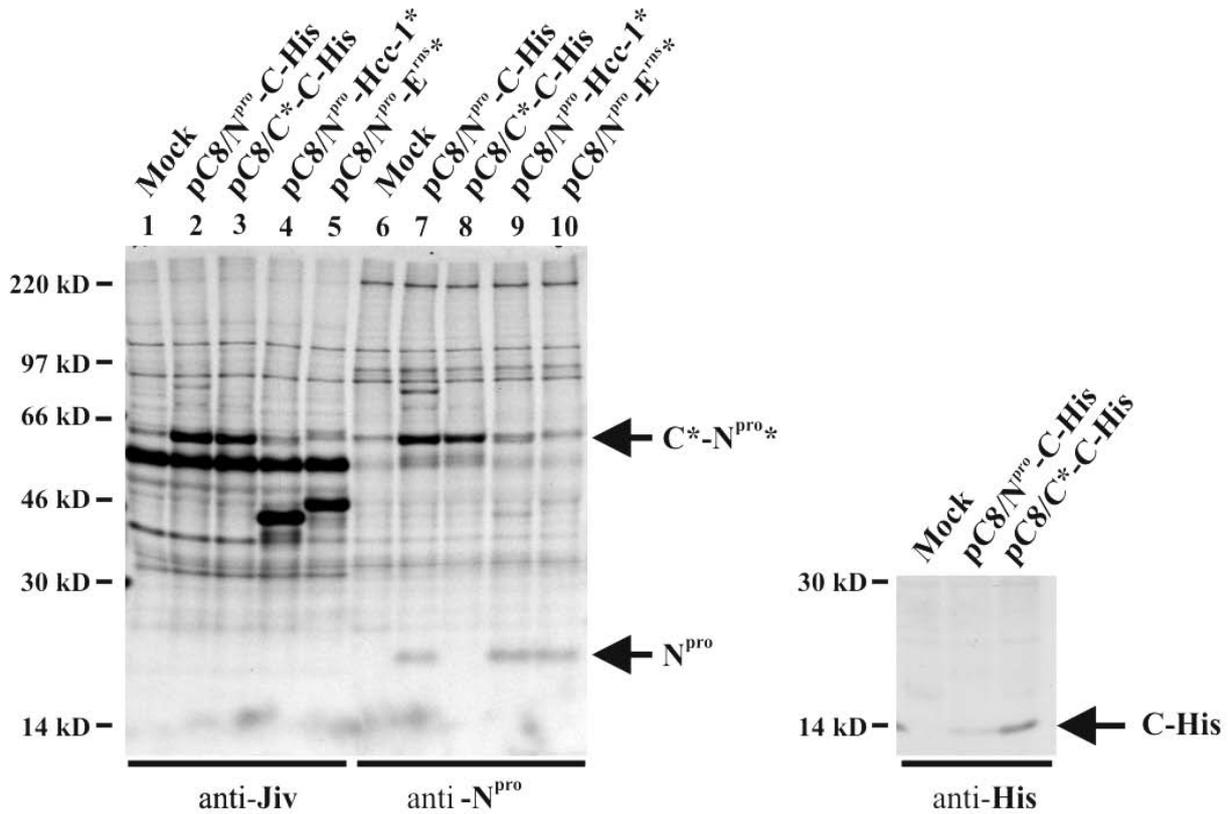


Abb. 8: Untersuchung der N-terminalen Prozessierung des CP8-Polyproteins mittels Radioimmunopräzipitation (RIP)

Die angegebenen Plasmide wurden in der T7-Vaccinia-Expression eingesetzt und die metabolisch markierten Proteine nach der Immunpräzipitation mit dem jeweiligen Antikörper über SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Pfeile kennzeichnen die verschiedenen Spaltprodukte. Bei der kräftigen Bande im Bereich von 55 kDa handelt es sich um eine unspezifische Bande. kD=kiloDalton.

Nach Expression von pC8/N^{pro}-E^{rns*} wurde vom N^{pro}-spezifischen Serum nur freies N^{pro} (Abb. 8, Spur 10) detektiert, während das Jiv-spezifische Serum ein 46 kDa großes Protein erkannte, welches das verbleibende C-terminale Spaltprodukt nach der autokatalytischen Abspaltung von N^{pro} darstellt (Abb. 8, Spur 5) Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch die

Expression von pC8/N^{pro}-Hcc-1*, wo ebenfalls freies N^{pro} sowie ein C-terminales Spaltprodukt von 44 kDa nachgewiesen wurden (Abb. 8, Spuren 4+9). Nach Expression von pC8/C*-C-His wurde mit dem Jiv-spezifischen Serum wiederum das 64 kDa große 513 AS-Protein C*-N^{pro}* (Abb. 8, Spur 3) und mit dem monoklonalen anti-His-Antikörper das Spaltprodukt C-His (Abb. 8, Spur 8) detektiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur das komplette N-terminale N^{pro} sondern auch das Fusionsprotein C*-N^{pro}* enzymatisch aktiv ist. Es gab keine Hinweise auf weitere Spaltungseignisse innerhalb des Polyprotein-Fragmentes C*-N^{pro}*.

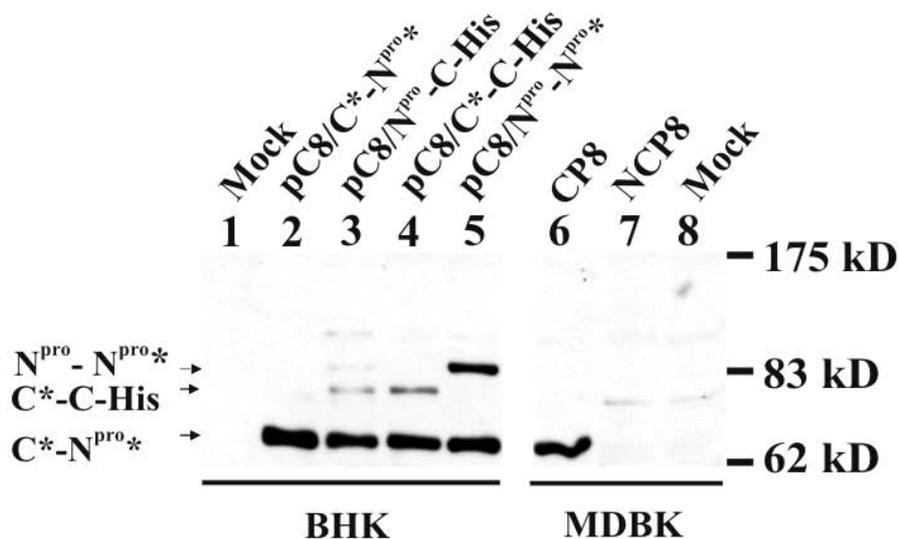


Abb 9.: Untersuchung der N-terminalen Prozessierung des CP8-Polyproteins mittels Westernblot

Links: Die angegebenen Plasmide wurden in der T7-Vaccinia-Expression eingesetzt und die Proteine im Westernblot mit dem Jiv-spezifischen Serum nachgewiesen.

Rechts: Nach Infektion von MDBK-Zellen mit BVDV CP8 oder NCP8 (MOI=2) wurde 24 h p.i. eine Westernblot-Analyse mit dem Jiv-spezifischen Serum durchgeführt.

Alle Spuren stammen vom selben Gel. Die Pfeile kennzeichnen die versch. Spaltprodukte.

Ausgehend von diesen Beobachtungen erfolgte im Westernblot mit dem Jiv-spezifischen Serum die vergleichende Analyse der Proteine aus Zellen nach Infektion mit den BVDV-Stämmen CP8 oder NCP8 (Abb. 9). Dabei konnte in den CP8-infizierten Zellen ein 64 kDa großes Protein nachgewiesen werden, das in NCP8-infizierten Zellen nicht vorhanden

war. Dieses 64 kDa große Protein komigrierte mit dem transient exprimierten C*-N^{pro*}, aber mit keiner anderen Prozessierungs-
zwischenstufe aus der N-terminalen Region des Polyproteins von CP8.
Damit wurde nachgewiesen, dass der BVDV-Stamm CP8 im Vergleich
zu nicht zytopathogenen Stämmen ein zusätzliches Protein exprimiert,
und zwar das 513 AS große Protein C*-N^{pro*}.

5.1.3 NS3-Expression bei BVDV CP8

Alle bisher untersuchten zytopathogenen Pestiviren exprimieren große
Mengen von freiem NS3. In einer Westernblot-Analyse von BVDV CP8-
infizierten Zellen konnte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3
sowohl freies NS3 als auch ungespaltenes NS2-3 nachgewiesen
werden. Im Gegensatz dazu war in NCP8-infizierten Zellen nur
ungespaltenes NS2-3, aber kein freies NS3 nachweisbar (Abb. 10).

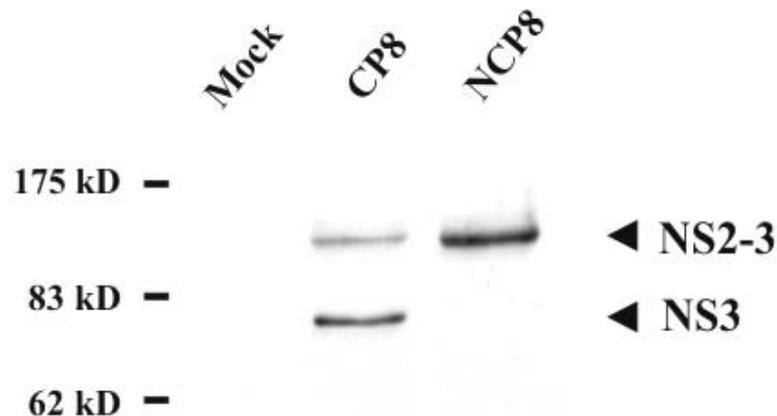


Abb. 10: Nachweis der NS2-3- und NS3-Expression in NCP8- und CP8-infizierten Zellen
Die MDBK-Zellen wurden 48h p.i. mit SDS-Lysepuffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE
aufgetrennt und im Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3 nachgewiesen.
kD=kiloDalton.

Die Genomorganisation von CP8 impliziert, dass freies NS3 durch
Spaltung von NS2-3 freigesetzt wird. Für den zp BVDV-Stamm CP7
wurde gezeigt, dass eine Insertion von 7 AS im NS2 ausreichend ist, um
eine NS2-3-Spaltung zu induzieren. Der Vergleich der NS2-Sequenzen
von NCP8 und CP8 ergab keine Deletionen oder Insertionen in CP8.

Auch ohne Insertion kann das NS2 Signale enthalten, welche zur NS2-3-Spaltung führen, wie dies beim zp BVDV-Stamm Oregon der Fall ist. Im NS2 von CP8 wurden vier AS-Austausche identifiziert: I1176T, Y1336H, H1552Y und Q1554E (GenBank Accession-Nr. AY182137 und AY182138).

Um zu überprüfen, ob das NS2 von BVDV CP8 Signale für eine NS2-3-Spaltung enthält, wurde das Plasmid pC8/E2-NS4A benutzt. Es handelt sich um ein Plasmid, in welchem das komplette NS2 und der N-terminale Anteil des NS3 (insgesamt 527 AS) von CP8 im Kontext des „E2-bis-NS4A“-Polyprotein-Fragmentes des BVDV-Stammes CP7 kodiert werden. pC8/E2-NS4A wurde konstruiert, indem ein *Nsi* // *Age* I-Fragment aus pC/E2-4A (Rinck et al., 2001) deletiert und durch das entsprechende cDNA-Fragment von CP8 ersetzt wurde. Das CP8-cDNA-Fragment wurde per RT-PCR mit dem Primerpaar p7NsiCP8/AgerevCP8 aus RNA von CP8-infizierten Zellen amplifiziert und nach Kontrolle der Sequenz unter Benutzung der *Nsi* I- und *Age* I-Schnittstellen in pC/E2-NS4A inkloniert. Es kodiert für die AS 1631 bis 2157 des CP8-Polyproteins, was den AS 1118 bis 1644 des Polyproteins von nzp BVDV entspricht.

Mit einem analogen Ansatz konnte früher bereits gezeigt werden, dass die zytopathogenen BVDV-Stämme CP7 und Oregon Signale im NS2 enthalten, welche die NS2-3-Spaltung verursachen (Kümmerer et al., 1998; Tautz et al., 1996). Die Protein-Expression erfolgte über das T7-Vacciniavirus-Expressionssystem; anschließend wurde die NS2-3-Prozessierung im Westernblot mit einem NS3-spezifischen monoklonalen Antikörper überprüft. Nach Transfektion von pC8/E2-NS4A konnte ungespaltenes NS2-3 und ein Vorläuferprotein von etwa 180 kDa, aber kein freies NS3 nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass das NS2 von BVDV CP8 kein Signal enthält, welches die

NS2-3-Spaltung induziert.

Infolgedessen erschien es naheliegend, dass der ungewöhnliche Aufbau der N-terminalen Region von CP8 eine Rolle für die NS2-3-Spaltung dieses Stammes spielen muss, insbesondere da zelluläres Jiv sowie dessen Fragment Jiv90 (AS 533 bis 622 des zellulären Jiv) in der Lage sind, *in trans* die NS2-3-Spaltung in nzp BVDV-infizierten Zellen zu induzieren (Rinck et al., 2001). Da das CP8-spezifische Protein C*-N^{pro*} das Jiv90-Fragment enthält, wurde vermutet, dass dieses Protein ebenfalls die Fähigkeit zur Induktion der NS2-3-Spaltung *in trans* besitzt.

Die Fähigkeit von C*-N^{pro*} zur NS2-3-Spaltungsinduktion *in trans* wurde durch Kotransfektion von pC8/C*-N^{pro*} und pC8/E2-NS4A geprüft. In den kotransfizierten Zellen waren große Mengen freies NS3 nachweisbar, außerdem ungespaltenes NS2-3 und ein größeres Vorläuferprotein. Diese Ergebnisse zeigen, dass das CP8-spezifische Protein C*-N^{pro*} tatsächlich die Fähigkeit besitzt, *in trans* eine effiziente NS2-3-Spaltung zu induzieren. Die Kotransfektion von pGST-Jiv90 und pC8/E2-NS4A, die als Positivkontrolle durchgeführt wurde, hatte ebenfalls eine effiziente NS2-3-Spaltung zur Folge.

Im Protein C*-N^{pro*} ist das Jiv90-Peptid als Bestandteil der JivII-Domäne enthalten. Die gewonnenen Daten ließen vermuten, dass auch in diesem ungewöhnlichen Kontext das Jiv90 für die Induktion der NS2-3-Spaltung verantwortlich ist. Um dies zu zeigen und auszuschließen, dass möglicherweise andere Abschnitte von C*-N^{pro*} die Fähigkeit zur Spaltungsinduktion besitzen, wurden zwei weitere Konstrukte eingesetzt. Diese Konstrukte kodieren entweder den N-terminalen oder den C-terminalen Abschnitt von C*-N^{pro*}; die Teilung von C*-N^{pro*} wurde in der Mitte von Jiv90 vorgenommen. Das Plasmid pC8/C*-JivII* kodiert das CP8-Polyprotein von C* bis zur Mitte von Jiv90; das Protein, welches von pC8/JivII**-N^{pro*} kodiert wird, beginnt mit der C-terminalen Hälfte von

Jiv90 und endet mit N^{pro*}. Beide Konstrukte wurden jeweils einzeln oder gemeinsam mit pC8/E2-4A kotransfiziert. Die Expression der Jiv-Bestandteile enthaltenden Proteine wurde im Westernblot mit Hilfe des Jiv-spezifischen Antiserums N3 nachgewiesen. In allen drei Fällen, das heißt bei Expression von pC8/E2-4A mit pC8/C*-JivII*, von pC8/E2-4A mit pC8/JivII**^{-N^{pro*}} und von pC8/E2-4A mit pC8/C*-JivII* plus pC8/JivII**^{-N^{pro*}} war zwar ungespaltenes NS2-3, aber kein freies NS3 detektierbar (Abb. 11).

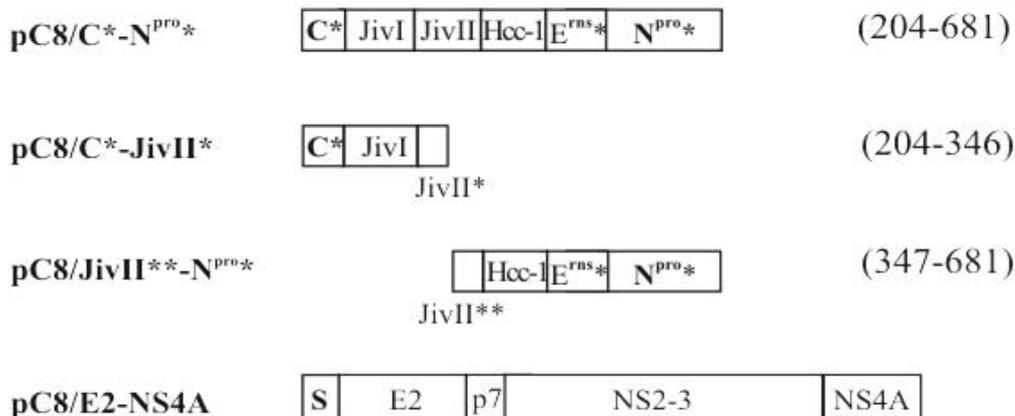
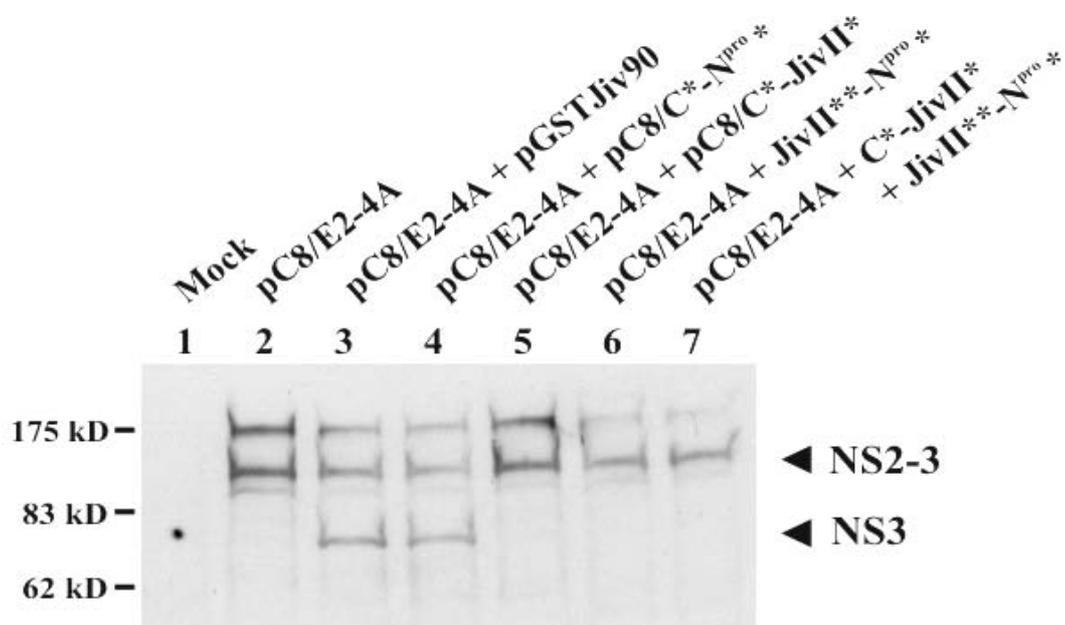


Abb. 11: Induktion der NS2-3-Spaltung *in trans*

Unten sind die zur Analyse der NS2-3-Spaltung eingesetzten Expressionskonstrukte dargestellt (in Klammern der exprimierte Proteinbereich; S=Signalsequenz). Die Konstrukte wurden per T7-Vaccinia-Expression in BHK-Zellen exprimiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen NS3 nachgewiesen. kD=kiloDalton.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ausschließlich das im CP8-spezifischen Protein C*-N^{pro}* enthaltene Jiv90-Fragment für die Induktion der NS2-3-Spaltung verantwortlich ist. Ohne das vollständige Jiv90-Peptid konnte das CP8-spezifische Protein die NS2-3-Spaltung nicht induzieren. Das N-terminale und das C-terminale Jiv90-Fragment waren auch nicht in der Lage, sich funktionell zu ergänzen.

5.2 Vergleich der Replikation von BVDV CP8 und NCP8

MDBK-Zellen wurden parallel mit BVDV NCP8 oder CP8 (MOI=2) infiziert. Jeweils 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach der Infektion wurde Gesamtzell-RNA der infizierten Zellen präpariert, anschließend wurde die virale RNA im Northernblot dargestellt.

Es zeigte sich, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten die virale RNA-Menge in den CP8-infizierten MDBK-Zellen gegenüber der viralen RNA-Menge in den NCP8-infizierten MDBK-Zellen deutlich erhöht war. Außerdem wird der Größenunterschied den RNAs von zwischen NCP8 und CP8 deutlich.

Die Quantifizierung der viralen RNA mittels Phosphorimager-Auswertung des Northernblots sowie anschließend mit Hilfe der quantitativen Realtime-RT-PCR ergab zu den verschiedenen Zeitpunkten eine Erhöhung der CP8-RNA im Vergleich zur NCP8-RNA um den Faktor 3 bis 10 (Abb. 12a). Dieses Ergebnis entspricht der auch schon von anderen zp/nzp BVDV-Viruspaaren bekannten Beobachtung, dass die virale RNA-Replikation der zp Viren im Vergleich zu den nzp Viren erhöht ist.

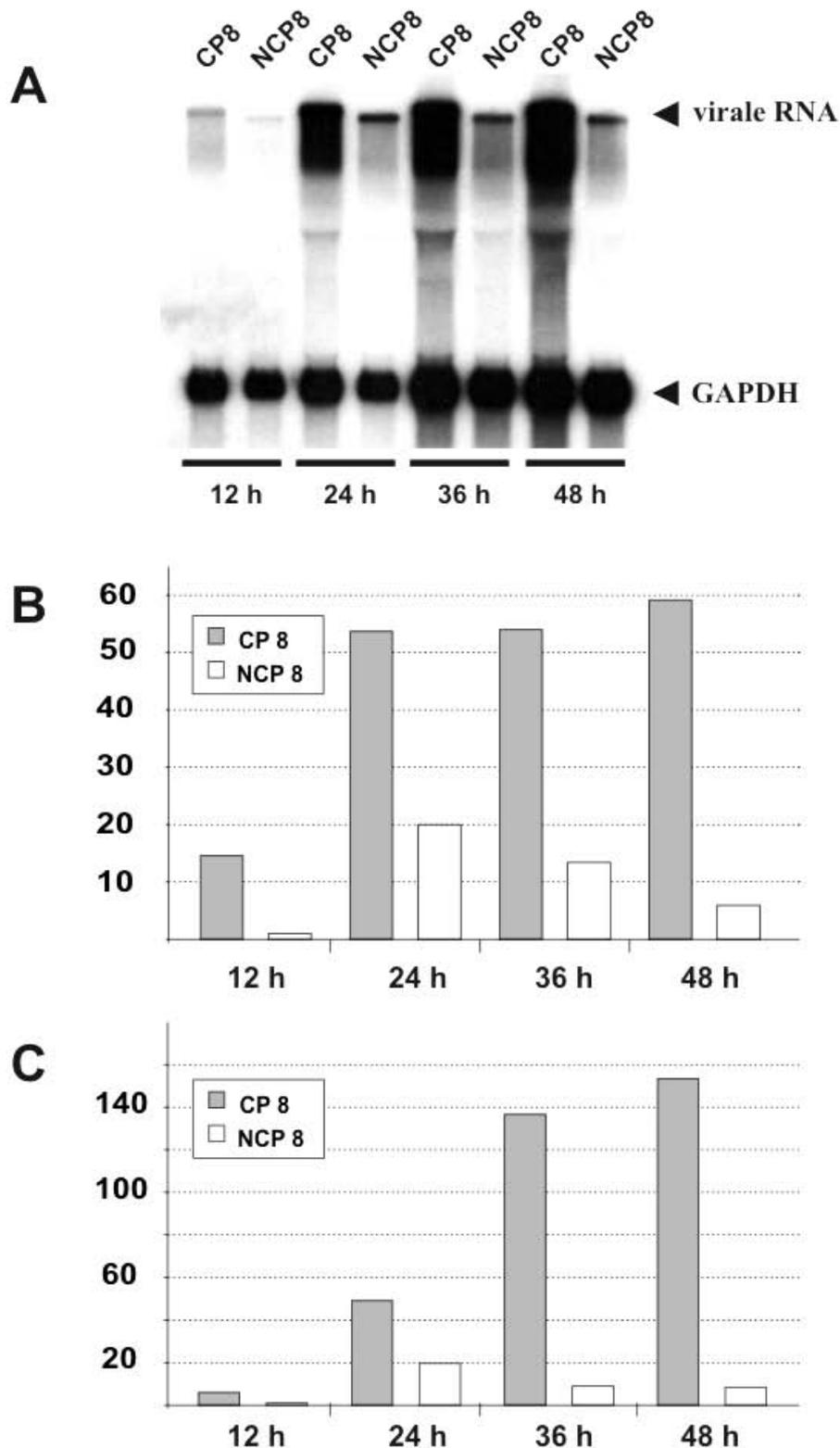


Abb. 12a: Vergleich der RNA-Replikation von BVDV CP8 und NCP8

Die Gesamtzell-RNA der mit BVDV NCP8 bzw. CP8 infizierten MDBK-Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Anschließend wurde die virale RNA mit Hilfe einer BVDV-spezifischen Sonde im Northernblot dargestellt (der Nachweis der GAPDH-RNA dient als Ladekontrolle) (A) und mittels Phosphorimager-Auswertung quantifiziert (B). Anschließend wurde die selbe RNA mittels quantitativer Realtime-RT-PCR quantifiziert (C). Die 12 h p.i. bei BVDV NCP8 gemessene virale RNA-Menge wurde als Referenzwert verwendet und auf den Wert 1 gesetzt.

Zusätzlich wurde die Menge der freigesetzten Virionen im Zellkulturüberstand zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit BVDV CP8 bzw. NCP8 durch Virustitration der Zellkulturüberstände ermittelt. Hierbei zeigte der Stamm CP8 keinen Wachstumsvorteil gegenüber NCP8, vielmehr waren die CP8-Titer zu den frühen Zeitpunkten nach Infektion gegenüber den NCP8-Titern um knapp eine \log_{10} -Stufe reduziert (Abb. 12b).

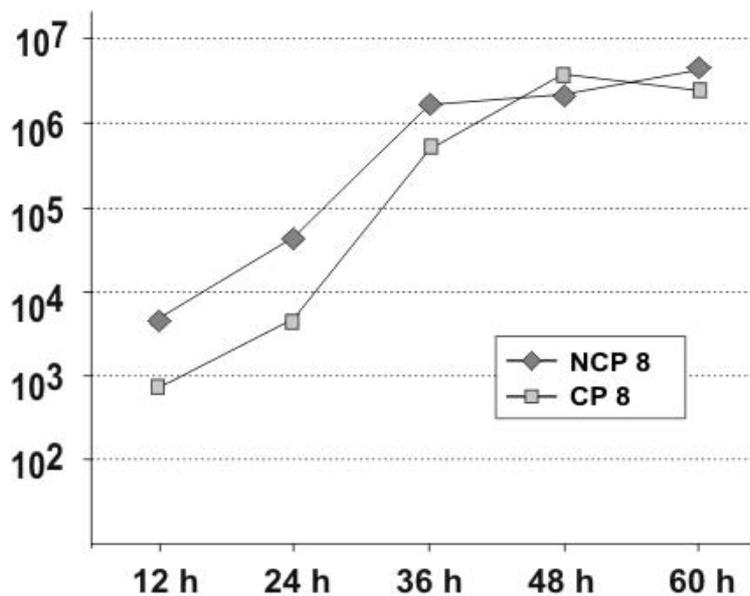


Abb. 12b: Wachstumskinetik von BVDV CP8 und NCP8

Die Zellkulturüberstände der mit BVDV NCP8 bzw. CP8 infizierten MDBK-Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Zahl der darin enthaltenen infektiösen Virionen per Virustitration bestimmt. Die Virustiter sind als GKID₅₀/ml angegeben.

5.3 Einfluss des zellulären Jiv-Proteins auf die Replikation von Pestiviren

Die effiziente Spaltung von NS2-3 und die Synthese von großen Mengen viraler RNA gehören zu den wichtigsten Merkmalen zytopathogener Pestiviren. Zeitgleich mit dieser Arbeit wurde eine Autoprotease im pestiviralen NS2 identifiziert, welche die NS2-3-Spaltung vermittelt und außerdem für die virale Replikation essentiell ist. Über die Generierung von freiem NS3 reguliert diese Protease die pestivirale RNA-Replikation (Lackner et al., 2004). Da bereits seit längerem bekannt ist, dass Jiv mit

NS2 interagiert (Rinck et al., 2001), lag die Vermutung nahe, dass die pestivirale Replikation durch das zelluläre Jiv beeinflusst wird.

5.3.1 Zelllinien mit verändertem Jiv-Spiegel

Um den Einfluss des zellulären Jiv-Spiegels auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden Zellen mit verändertem Jiv-Spiegel eingesetzt: einerseits Zellen, die vermehrt Jiv exprimieren; andererseits Zellen mit einer reduzierten intrazellulären Jiv-mRNA-Menge, bei denen von einer verminderten intrazellulären Jiv-Menge ausgegangen werden kann. Ein direkter Nachweis der Reduktion des Jiv-Proteins ist aufgrund der geringen endogenen Jiv-Mengen nicht möglich.

5.3.1.1 Erstellung der Zelllinie PT_{TetOn}

Das Tet-Expressionssystem (Gossen et al., 1995) erlaubt die kontrollierte Expression eines bestimmten Proteins in eukaryontischen Zellen. Das Tet-On-System (Clontech) besteht in der einfachsten Ausführung aus zwei Komponenten: einem Regulator-Plasmid und einem Antwort-Plasmid. Das hier verwendete Regulatorplasmid pEF-Tet-On-Neo kodiert für den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transkriptions-Aktivator (rtTA) unter der Kontrolle eines EF-Promotors (Harada et al., 2000). Der rtTA ist ein Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor des Transposons Tn10 und der Transaktivierungsdomäne des VP16 aus dem Herpes simplex-Virus. Vier Aminosäure-Austausche im Tet-Repressor bewirken, dass der rtTA des Tet-On-Systems in Anwesenheit von Tetrazyklin bzw. dessen Analog Doxyzyklin im Antwortplasmid an eine bestimmte DNA-Sequenz, den Tet-Operator, binden kann, und so zu einem „Tet-Aktivator“ wird. Im Gegensatz dazu bindet der ursprüngliche Tet-Repressor im Tetrazyklin-abhängigen Transkriptions-Aktivator (tTA) des Tet-Off-Systems nur in Abwesenheit von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin an den Tet-Operator (Hillen und Berens, 1994). Im Antwortplasmid pTRE liegt die Tet-Operator-Sequenz aus

E.coli in siebenfacher Wiederholung als TRE (*Tet-responsive element*) vor einem minimalen CMV-Promotor. Somit wird die Transkription des stromabwärts befindlichen Gens nur in Abwesenheit (Tet-Off) bzw. nur in Anwesenheit (Tet-On) von Doxyzyklin ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde nur das Tet-On-System verwendet. Auf der Basis der Rindernieren-Zelllinie PT wurde die Zelllinie PT_{TetOn} etabliert. Dazu wurde das Regulatorplasmid pEF-Tet-On-Neo mit *Acc65 I* linearisiert und mittels Metafectene™ (Biontex) in PT-Zellen transfiziert. Nach 2 Tagen wurde die Selektion auf stabil transfizierte Zellen begonnen. Die Selektion erfolgte mit 1 mg/ml Geneticin (G418), einem Neomycin-Analog, da das Plasmid pEF-Tet-On-Neo den transfizierten Zellen eine Neomycin-Resistenz vermittelt.

Nach 10 bis 14 Tagen wurden 20 einzelne Zellklone mit einer stumpfen Pipettenspitze punktuell trypsiniert, vorsichtig abgelöst und in die Vertiefungen einer 48-Well-Platte mit Selektionsmedium überführt. Nach zwei Passagen konnten die Zellklone im 12-Well-Maßstab auf die Anwesenheit des Regulatorplasmids getestet werden. Dazu wurde ein Anteil der Zellen jedes erhaltenen Zellklons mit dem Antwortplasmid pBI-GL transfiziert, welches unter der Kontrolle zweier TREs die tetrazyklin-abhängige Expression der Proteine Galaktosidase und Luciferase erlaubt. Einen Tag nach der Transfektion von 1 µg pBI-GL mit Metafectene™ und Induktion mit 10 µM Doxyzyklin wurden die Zellen fixiert und eine β-Galaktosidase-Färbung durchgeführt. Als Kontrolle dienten nicht induzierte Zellen. Nur die den Tet-Aktivator rtTA stabil exprimierenden Zellen können in Anwesenheit von Doxyzyklin Galaktosidase unter der Kontrolle des TRE synthetisieren und zeigten daher im β-Galaktosidase-Test eine Blaufärbung. Nach Reklonierung und erneutem Testen erfolgte die Passagierung der Zelllinie in Medium, welches 125 µg/ml Geneticin (G418) enthielt.

5.3.1.2 Unterdrückung der zellulären Jiv-Expression mittels RNA-Interferenz

Um die Expression bestimmter Gene spezifisch zur unterdrücken, kann das Prinzip der RNA-Interferenz genutzt werden. Dabei wird durch das Einbringen von Doppelstrang-RNA in die Zelle die Genexpression wirkungsvoll unterdrückt (Sharp, 1999). Allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass die doppelsträngige RNA in der Zelle eine starke zytotoxische Reaktion verursacht (Hunter et al., 1975). Dieser unspezifische Effekt kann vermieden werden, indem man kurze 19 bis 22 Nukleotide, in der Regel aber 21 Nukleotiden lange interferierende RNAs, sogenannte siRNAs (*small interfering RNAs*), einsetzt. Mit diesen wird die Genexpression spezifisch unterdrückt (Elbashir et al., 2001).

Die Auswahl der Zielsequenz erfolgt nach folgenden Kriterien: Die 19 nt große Zielsequenz soll in der mRNA von AA am 5'Ende und TT am 3'Ende flankiert werden; sie soll in der kodierenden Region der mRNA liegen, mit mindestens 100 nt Abstand zum Translationsstart und -ende.

Das Jiv-Protein wird in bovinen Zellen nur in sehr geringen Mengen exprimiert und ist bisher weder im Westernblot noch in der Radioimmunpräzipitation nachweisbar. Daher wurde die Wirksamkeit der siRNA1 [GTGGCTCGACTCTTGACCA] (entspricht nt 1520-1539 der Jiv-mRNA) in Jiv-überexprimierenden Zellen überprüft. Dazu wurde das synthetische siRNA1-Oligo mit dem komplementären Gegenstrang-RNA-Oligo siRNA1rev hybridisiert und in Jiv-überexprimierende Zellen elektroporiert. Mit der siRNA1 konnte die Genexpression spezifisch unterdrückt werden, allerdings nur transient, nicht dauerhaft (N.Tautz, persönliche Mitteilung).

5.3.1.3 Erstellung der Jiv-„knockdown“-Zelllinie PT-Jiv-kd

Eine dauerhafte Unterdrückung der Genexpression kann erreicht werden, indem anstelle synthetischer siRNAs ein Vektor (pSUPER) in

die Zelle eingebracht wird, der die intrazelluläre Produktion kurzer haarnadelförmiger Vorgänger-Transkripte (*hairpin RNAs*) ermöglicht, aus welchen durch zelluläre RNasen die doppelsträngige siRNA/siRNAreiv freigesetzt wird. Der Vektor pSUPER (Brummelkamp et al., 2002) basiert auf dem Vektor pBlueScript-KS und besitzt einen Polymerase III H1-RNA-Promotor; dahinter folgen Schnittstellen für *Bgl II* und *Hind III*, welche zur Klonierung benutzt werden.

Die auf den Promotor folgende DNA-Sequenz besteht aus der siRNA-Sequenz in Vorwärts- und Revers-Orientierung, einer dazwischen liegenden Schleifen-Sequenz sowie Verbindungssequenzen. Es muss darauf geachtet werden, dass in der Zielsequenz keine Folge von 4 oder mehr Adenosinen oder Thyminen vorkommt, dies würde zum vorzeitigen Schnitt der siRNA-Vorgänger-Transkripte führen. Im Falle des Vektors pSUPER-Jiv1 war die auf den Promotor folgende DNA-Sequenz: [GATCCCC**GTGGCTCGACTCTTGACCATTCAAGAGATGG TCAAGAGTCGAGCCACTTTTTGGAAA**] (siRNA-Sequenzen fett).

Zur Klonierung dieser DNA-Sequenz hinter den H1-RNA-Promotor wurden 64-mer-Oligonukleotide in Vorwärts- und Revers-Orientierung benutzt. Diese Oligonukleotide wurden zur Hybridisierung mit Annealingpuffer zunächst für 4 min bei 95°C, dann für 10 min bei 70°C inkubiert, bevor sie langsam auf 4°C abgekühlt wurden. Die nun als Doppelstrang mit *Bgl II*- und *Hind III*-Überhang vorliegenden Oligonukleotide wurden anschließend unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Durch die folgende Inkubation bei 70°C für 10 min wurde die Polynukleotidkinase inaktiviert, bevor die Ligation in den mit *Bgl II* und *Hind III* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pSUPER erfolgte. Nach Transformation in *E.coli* und anschließender DNA-Mini-Präparation entstand in einem analytischen Restriktionsenzymverdau mit *EcoR I* und *Hind III* im

positiven Fall ein Fragment von 360 bp, ein leerer Vektor ergab ein Fragment von 300 bp.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Vektor pSUPER-GFP (erhalten von N.Tautz) enthielt zusätzlich ein GFP-Gen unter der Kontrolle eines TRE (*tet-responsive element*), sodass im Rahmen des Tet-On-Systems (s.o.) die tetrazyklin-abhängige GFP-Expression in eukaryontischen Zellen möglich war.

Zur Erstellung der Zelllinie PT-Jiv-kd wurden PT_{TetOn}-Zellen im 6-Well-Format so ausgesät, dass die Zellen am folgenden Tag bei der Transfektion eine Konfluenz von etwa 60-80% aufwiesen. Das Plasmid pSUPER-GFP-Jiv1 wurde mit *Sca I* linearisiert; als Selektionsmarker wurde das Plasmid pEF-PAC (Rinck et al., 2001) benutzt, welches eine Puromycin-Resistenz vermittelt. 100 ng des mit *Hind III* linearisierten Resistenzplasmids wurden in einer Co-Transfektion zusammen mit dem linearisierten Plasmid pSUPER-GFP-Jiv1 mit Metafectene™ (Biontex) in die PT_{TetOn}-Zellen transfiziert. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt und nach 2 Tagen wurde die Selektion auf stabil transfizierte Zellen begonnen. Die Selektion und die Isolierung der stabil transfizierten Zellklone erfolgten mit 5 µg/ml Puromycin im Selektionsmedium.

Da der Vektor pSUPER-GFP-Jiv1 die Doxyzyklin-abhängige GFP-Expression ermöglicht, wurde zunächst ein Anteil der Zellen jedes Zellklones mit 10 µM Doxyzyklin induziert und die lebenden Zellen 24 h nach der Induktion im Fluoreszenz-Mikroskop auf GFP-Expression untersucht. Die positiv getesteten Zellklone wurden über mehrere Passagen vermehrt; von einem Anteil jedes Zellklons wurde Gesamtzell-RNA präpariert. Mittels quantitativer Realtime-RT-PCR wurden die relativen Jiv-mRNA-Spiegel im Vergleich zu den Ausgangszellen PT_{TetOn} gemessen. Die Zellklone mit den niedrigsten Werten wurden rekloniert,

aus den daraus resultierenden Zellklonen wurde erneut Gesamtzell-RNA präpariert und mit dieser eine quantitative Realtime-RT-PCR durchgeführt.

Auf diese Weise wurden Zellen gewonnen, die einen im Vergleich zur Ausgangszelle PT_{TetOn} um 75-85% verringerten Jiv-mRNA-Spiegel hatten, also im Vergleich zu den Ausgangszellen nur noch 15-25% der Jiv-mRNA aufwiesen. Diese werden im Folgenden als PT-Jiv-kd bezeichnet. Zum Passagieren der Zellen wurde Medium mit 2 μ g/ml Puromycin benutzt. Die Verringerung des Jiv-mRNA-Spiegels in der angegebenen Größenordnung bestätigte sich in mehreren unabhängigen Messungen, auch nach mehrfacher Passage der Zelllinie sowie nach Kryokonservierung und erneutem Auftauen.

5.3.1.4 Das Jiv-„escape“-Plasmid pTRE-Jiv-esc1

Dieses Plasmid ermöglicht aufgrund von Sequenzveränderungen in der siRNA-Bindestelle die Wiederherstellung der Jiv-Expression in den PT-Jiv-kd-Zellen in Anwesenheit der Jiv-spezifischen siRNA.

In den bereits vorhandenen Vektor pTRE-Jiv (Rinck et al., 2001) wurden stille Mutationen eingeführt, welche die transkribierte Jiv-mRNA resistent gegen die siRNA1 werden lassen. Dazu wurde zunächst ein *Nsi I* / *EcoRV*-Fragment aus pTRE-Jiv, entsprechend Position 1015-1965 der publizierten Jiv-Sequenz (Rinck et al., 2001), in den analog geschnittenen Vektor Litmus28 inkloniert. In das daraus resultierende Plasmid Lit28-NsiJivERV wurden mittels gerichteter Mutagenese (siehe Kap. 4.2.1.8) unter Verwendung des Primerpaares QCcINSBssH II / QCcINSrev drei stille Mutationen an den Positionen 1477 (T→G), 1480 (A→C) und 1483 (C→G) eingeführt. Dabei wurde eine vorher nicht vorhandene *BssH II*-Schnittstelle generiert.

Nach Transformation in *E.coli* und anschließender DNA-Mini-Präparation

wurden die so gewonnenen DNA-Klone zur Analyse mit *BssH II* geschnitten und die Sequenz ausgewählter *BssH II*-positiver Zellklone (Lit28-NsiI JivERV-mut) überprüft. Aus Lit28-NsiI JivERV-mut wurde dann das veränderte *Nsi I / EcoR V*-Fragment wieder ausgeschnitten und in den *Nsi I / EcoR V*-deletierten Vektor pTRE-Jiv einkloniert; dadurch entstand das Plasmid pTRE-Jiv-esc1.

5.3.1.5 Erstellung der Jiv-„rescue“-Zelllinie PT-Jiv-kd-resc

Zur Erstellung der Zelllinie wurde das linearisierte Plasmid pTRE-Jiv-esc1 zusammen mit 100 ng des linearisierten Resistenzplasmids pTK-Hyg, welches eine Hygromycin-Resistenz vermittelt, in einer Co-Transfektion mit Metafectene™ (Biontex) in die PT-Jiv-kd-Zellen transfiziert. Die Selektion wurde mit 0,5 mg/ml Hygromycin B im Selektionsmedium durchgeführt. Die gewonnenen Zellklone wurden nach Induktion mit Doxyzyklin mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung des polyklonalen Kaninchen-Immunsersums N3 auf Jiv-Expression getestet. Die positiven Zellklone wurden anschließend im Westernblot analysiert, da so ein besserer Vergleich der Expressionsstärken der verschiedenen Zellklone möglich war. Es wurde schließlich ein Zellklon ausgewählt, der im induzierten Zustand eine starke Jiv-Expression zeigte, aber im nicht induzierten Zustand nur eine geringe Basisexpression aufwies; dieser wird im Folgenden PT-Jiv-kd-resc genannt. Ab der zweiten Passage wurde für die Passagierung der Zelllinie Medium ohne Hygromycin eingesetzt.

Eine Analyse dieser Zelllinie in der quantitativen Realtime-RT-PCR zeigte, dass sie im nicht-induzierten Zustand bereits eine geringfügig höhere Jiv-mRNA-Menge aufwies als die Wildtyp-Zellen. Dieses nicht vollständige Unterbleiben der Expression in Abwesenheit des Induktors ist ein bekannter Mangel des Tet-On-Systems, der bei überexprimierenden Zellen in diesem System häufig auftritt.

5.3.1.6 Die Zelllinien PT-Jiv-kd-GSTJiv90 und PT_{TetOn}-GSTJiv90W39A

Zur Erstellung der Zelllinien wurde das linearisierte Plasmid pTRE-GSTJiv90 bzw. pTRE-GSTJiv90W39A zusammen mit 100 ng des linearisierten Resistenzplasmids pTK-Hyg in einer Co-Transfektion mit Metafectene™ (Biontex) in die PT-Jiv-kd-Zellen bzw. in die PT_{TetOn}-Zellen transfiziert. Die Selektion wurde wiederum mit 0,5 mg/ml Hygromycin B im Selektionsmedium durchgeführt. Die gewonnenen Zellklone wurden nach Induktion mit Doxyzyklin in der Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti-GST-Antikörpers auf GSTJiv90-Expression getestet. Nach Analyse der positiven Zellklone im Westernblot wurde schließlich jeweils ein Zellklon ausgewählt, der im induzierten Zustand eine starke Jiv-Expression zeigte, aber im nicht induzierten Zustand nur eine geringe Basisexpression aufwies. Ab der zweiten Passage wurde auch für die Passagierung dieser Zelllinien Medium ohne Hygromycin eingesetzt.

5.3.2 BVDV-Replikation in Jiv-überexprimierenden Zellen

Die Ergebnisse der vergleichenden Replikationsstudie von BVDV CP8 und NCP8 ließen bereits vermuten, dass die in der Zelle vorhandene Jiv-Menge einen Einfluss auf die virale Replikation ausübt, denn die Besonderheit des zp BVDV-Stammes CP8 besteht, wie bereits gezeigt, in der Freisetzung eines Jiv-Fusionsproteins. Die Auswirkungen einer erhöhten Jiv-Menge auf die Virusreplikation wurden mit der Zelllinie MDBK_{TetOn}Jiv (Rinck et al., 2001) untersucht. In diesen Zellen kann mit Hilfe des Tet-On-Systems durch Induktion mit Doxyzyklin Jiv überexprimiert werden. Als Vergleichszellen dienten nicht induzierte MDBK_{TetOn}Jiv-Zellen sowie normale MDBK-Zellen.

MDBK_{TetOn}Jiv-Zellen, entweder nicht induziert oder für 16 h mit Doxyzyklin induziert, wurden mit nzp BVDV (NCP8, MOI=5) infiziert. Zur

Kontrolle wurden normale MDBK-Zellen parallel infiziert. Jeweils 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach der Infektion wurde Gesamtzell-RNA der infizierten Zellen präpariert, und die virale RNA-Menge mittels quantitativer Realtime-RT-PCR bestimmt. Außerdem wurde die virale RNA im Northernblot dargestellt (Abb. 13).

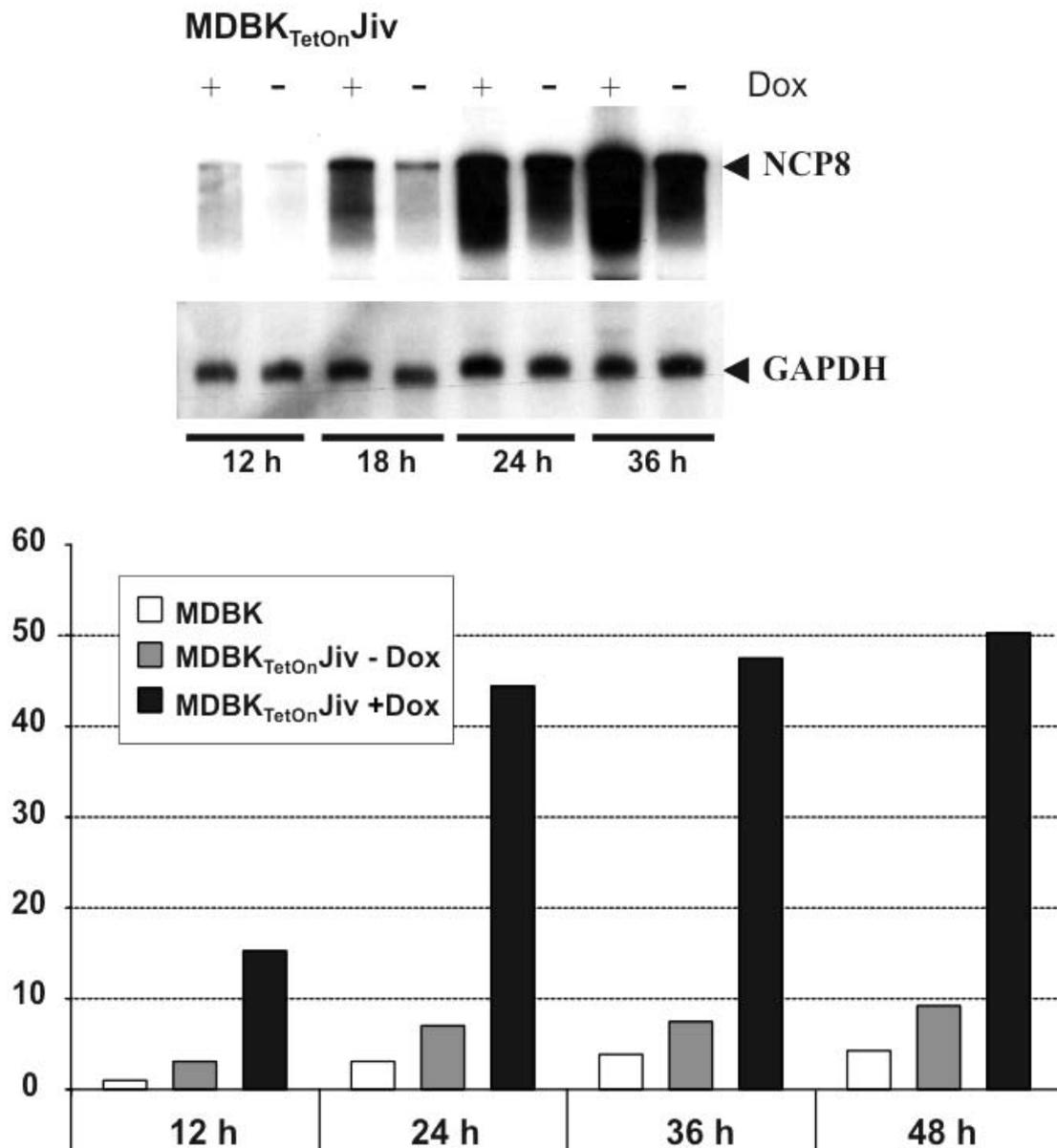


Abb. 13: BVDV-Replikation in Jiv-überexprimierenden Zellen

Die Gesamtzell-RNA der mit nzp BVDV infizierten Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Anschließend wurde die virale RNA im Northernblot dargestellt (oben, der Nachweis der GAPDH-RNA dient als Ladekontrolle) oder mit Hilfe der quantitativen Realtime-RT-PCR quantifiziert (unten). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die 12 h p.i. in den Kontrollzellen MDBK gemessene virale RNA-Menge wurde als Referenzwert verwendet und auf den Wert 1 gesetzt.

Es zeigte sich, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten in den induzierten MDBK_{TetOn}Jiv-Zellen im Vergleich zu den MDBK-Zellen die virale RNA-Menge um mindestens das Zehnfache erhöht war. Die nicht induzierten MDBK_{TetOn}Jiv-Zellen zeigten im Vergleich zu den MDBK-Zellen eine leichte Erhöhung der viralen RNA-Menge; dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass im Tet-On-System auch ohne Induktion bereits eine gewisse Menge des Proteins überexprimiert wird.

Im Gegensatz zur viralen RNA-Menge änderte sich die Menge der produzierten Virionen durch die Jiv-Überexpression kaum (nicht gezeigt). Somit wird durch die Erhöhung der intrazellulären viralen RNA-Menge um das Zehnfache in diesem System die Produktion von infektiösen Nachkommen-Viren kaum beeinflusst. Die Produktion infektiöser Virionen ist also, zumindest in diesem System, nicht durch die virale RNA-Menge limitiert.

5.3.3 BVDV-Replikation in Zellen mit reduziertem Jiv-Spiegel

Nachdem gezeigt war, dass die Erhöhung des intrazellulären Jiv-Spiegels zu einer Steigerung der viralen RNA-Replikation führt, wurde untersucht, welche Auswirkungen eine Reduktion des zellulären Jiv-Spiegels auf die Replikation von BVDV hat. Zur Untersuchung der Auswirkung eines verminderten intrazellulären Jiv-Spiegels auf die virale Replikation wurde die Jiv-„*knockdown*“-Zelllinie PT-Jiv-kd verwendet. In dieser Zelllinie ist der Jiv-Spiegel durch RNA-Interferenz (s.o.) im Vergleich zur Wildtypzelle auf 15-20% reduziert.

PT-Jiv-kd-Zellen und PT_{TetOn}-Zellen wurden parallel mit nzp BVDV (NCP8 oder NCP7, MOI=5) infiziert. Jeweils 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach der Infektion wurde Gesamtzell-RNA aus den infizierten Zellen präpariert; die virale RNA-Menge wurde im Northernblot dargestellt und mittels quantitativer Realtime-RT-PCR gemessen (Abb. 14).

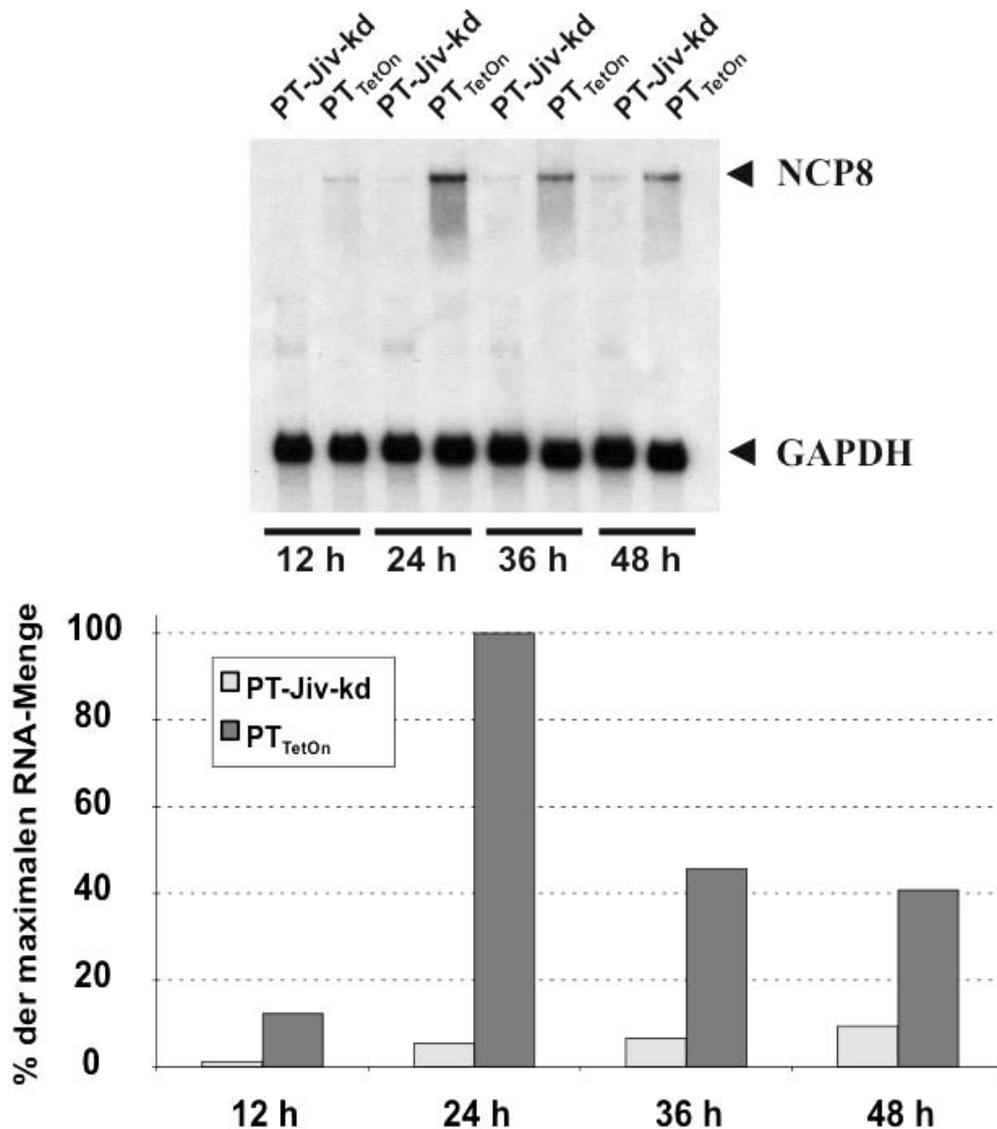


Abb. 14: RNA-Replikation von nzp BVDV in Jiv-reduzierten Zellen

Die Gesamtzell-RNA der mit BVDV NCP8 infizierten Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Anschließend wurde die virale RNA im Northernblot dargestellt (oben, der Nachweis der GAPDH-RNA dient als Ladekontrolle) oder mit Hilfe der quantitativen Realtime-RT-PCR quantifiziert (unten). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die maximal gemessene virale RNA-Menge wurde als Referenzwert verwendet und auf 100% gesetzt.

Die virale RNA-Menge war zu allen Zeitpunkten in den Jiv-„knockdown“-Zellen PT-Jiv-kd deutlich reduziert (Abb. 14). Nach 24 h wurden in den PT_{TetOn}-Zellen die höchsten viralen RNA-Mengen gemessen; zu diesem Zeitpunkt fand sich in den PT-Jiv-kd-Zellen eine Reduktion um den Faktor 12. Gleichzeitig wurde der Virustiter in den Zellkulturüberständen bestimmt (Abb. 15).

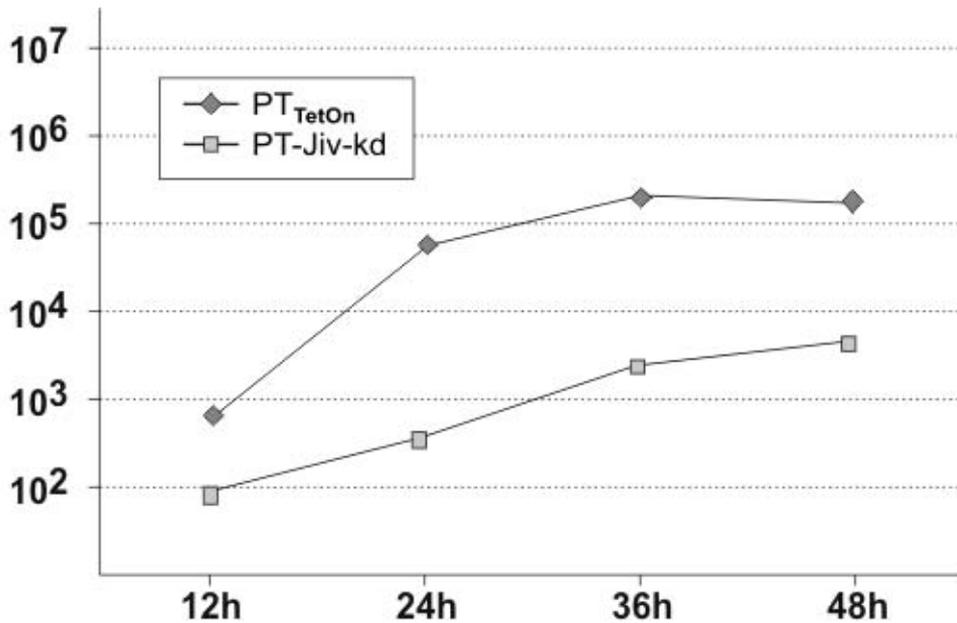


Abb. 15: Wachstumskinetik von nzp BVDV in Jiv-reduzierten Zellen

Die Zellkulturüberstände der mit BVDV NCP8 (MOI=5) infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Anzahl der darin enthaltenen infektiösen Virionen per Virustitration bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei gleichzeitig durchgeführten unabhängigen Experimenten. Die Virustiter sind als GKID₅₀/ml angegeben.

Auffälligerweise waren im Falle der Jiv-„knockdown“-Zellen auch die Virustiter um bis zu 1,5 log₁₀-Stufen, d.h. bis zu 97% verringert (Abb. 15).

Anschließend wurde die Proteinexpression in den Jiv-„knockdown“-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen untersucht. Die Zellen wurden mit nzp BVDV NCP8 oder zp BVDV CP8 infiziert und 24 h sowie 36 h p.i. die Expression von NS2-3 und NS3 im Westernblot dargestellt (Abb. 16).

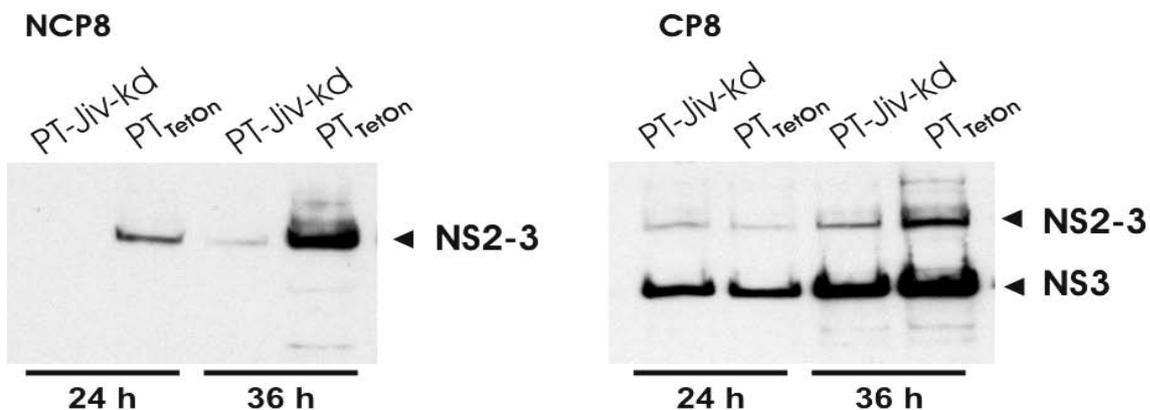


Abb. 16: Expression von NS2-3 und NS3 in Jiv-reduzierten Zellen

Nach Infektion mit nzp BVDV NCP8 bzw. mit zp BVDV CP8 wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit SDS-Lysepuffer lysiert und die Proteine im Westernblot mit Hilfe eines NS3-spezifischen Antikörpers nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass in den nzp BVDV-infizierten Jiv-„*knockdown*“-Zellen die Expression dieser Proteine deutlich reduziert ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich der zp BVDV-Stamm CP8 hinsichtlich der Proteinexpression unabhängig von zellulärem Jiv (Abb. 16). Ebenso wurde die Replikation dieses Stammes nicht durch die Reduktion des zellulären Jiv-Spiegels beeinflusst (Abb. 17).

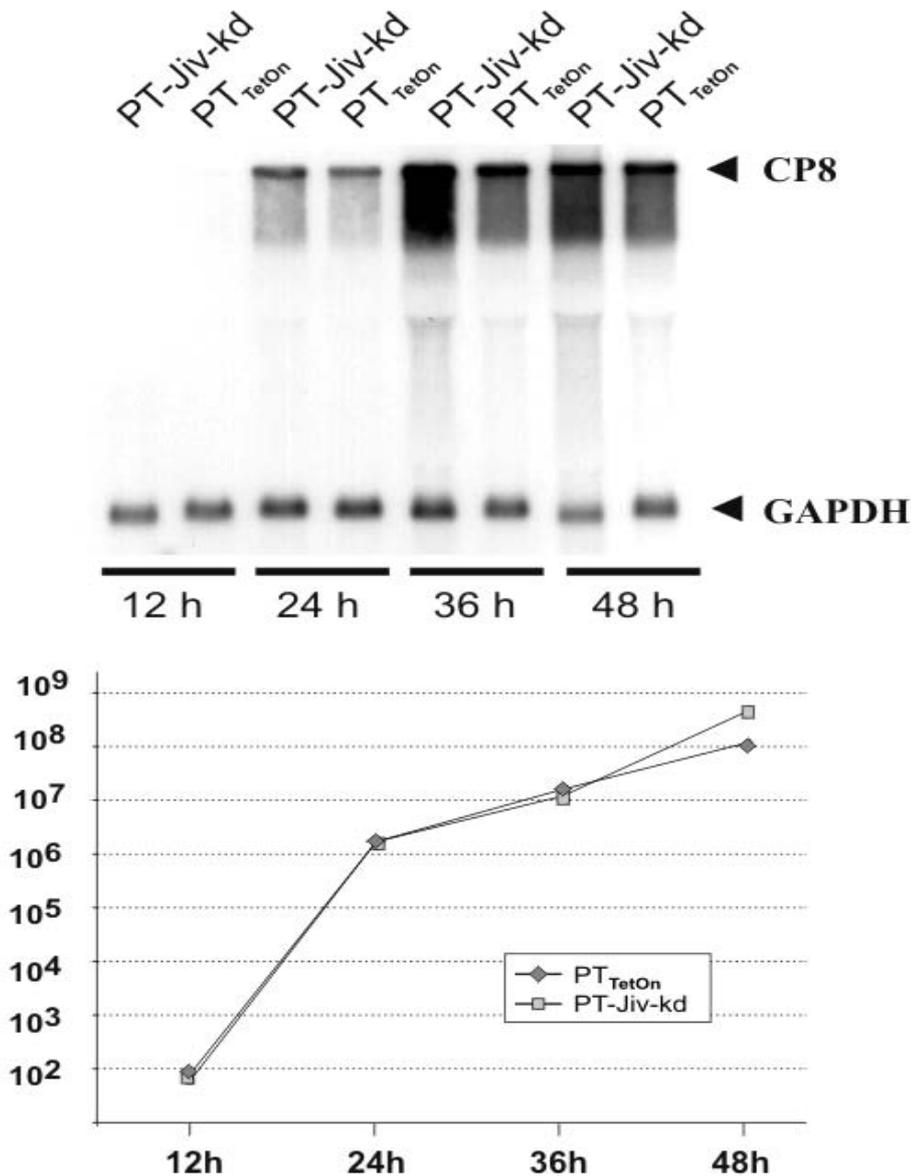


Abb. 17: Replikation von BVDV CP8 in Jiv-reduzierten Zellen

oben: Die Gesamtzell-RNA der mit zp BVDV CP8 (MOI=5) infizierten Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten präpariert und anschließend die virale RNA mittels einer BVDV-spezifischen Sonde im Northernblot dargestellt. Der Nachweis der GAPDH-RNA dient als Ladekontrolle.

unten: Die Zellkulturüberstände der mit zp BVDV CP8 (MOI=5) infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Anzahl der darin enthaltenen infektiösen Virionen per Virustitration bestimmt. Die Virustiter sind als GKID₅₀/ml angegeben.

5.3.3.1 Spezifität der beobachteten Effekte

Es ist bekannt, dass kurze haarnadelförmige RNAs (*hairpin RNAs*), wie sie auch der Zelllinie PT-Jiv-kd als Vorgängertranskripte der siRNA vorkommen, das Interferon-System aktivieren können (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003), was zu unspezifischen Effekten bei Infektionsexperimenten mit den entsprechenden Zellen führen kann. Daher wurde in den oben beschriebenen Infektionsexperimenten als Kontrolle zusätzlich die Jiv-„rescue“-Zelllinie PT-Jiv-kd-resc eingesetzt, in der die Jiv-Expression trotz Anwesenheit der siRNA und der kurzen haarnadelförmigen RNAs (*hairpin RNAs*) wiederhergestellt ist (s.o.), um die Situation der niedrigen endogenen Jiv-Expression in bovinen Fibroblasten so gut wie möglich nachzuahmen.

In diesen Zellen verhält sich die virale RNA-Replikation und auch die Produktion infektiöser Nachkommen-Viren wie in den ursprünglichen PT_{TetOn}-Zellen (Abb. 18). Dies bedeutet, dass im hier verwendeten System keine relevanten unspezifischen Effekte durch die siRNA bzw. durch die kurzen haarnadelförmigen RNAs (*hairpin RNAs*) verursacht werden.

Zusätzlich wurde die Produktion infektiöser Nachkommenviren in der Zelllinie PT-Jiv-kd-Jiv90 untersucht. Die Fragestellung war, ob durch die Expression von Jiv90 die Reduktion des endogenen Jiv-Spiegels ebenfalls ausgeglichen werden kann. Die Virustiter erreichten bei diesen Zellen 24 h und 36 h p.i. Werte, die sich etwas oberhalb der Virustiter der Kontrollzellen bewegten, was vermutlich in der relativ hohen Jiv90-Überexpression dieser Zelllinie begründet ist (Abb. 18).

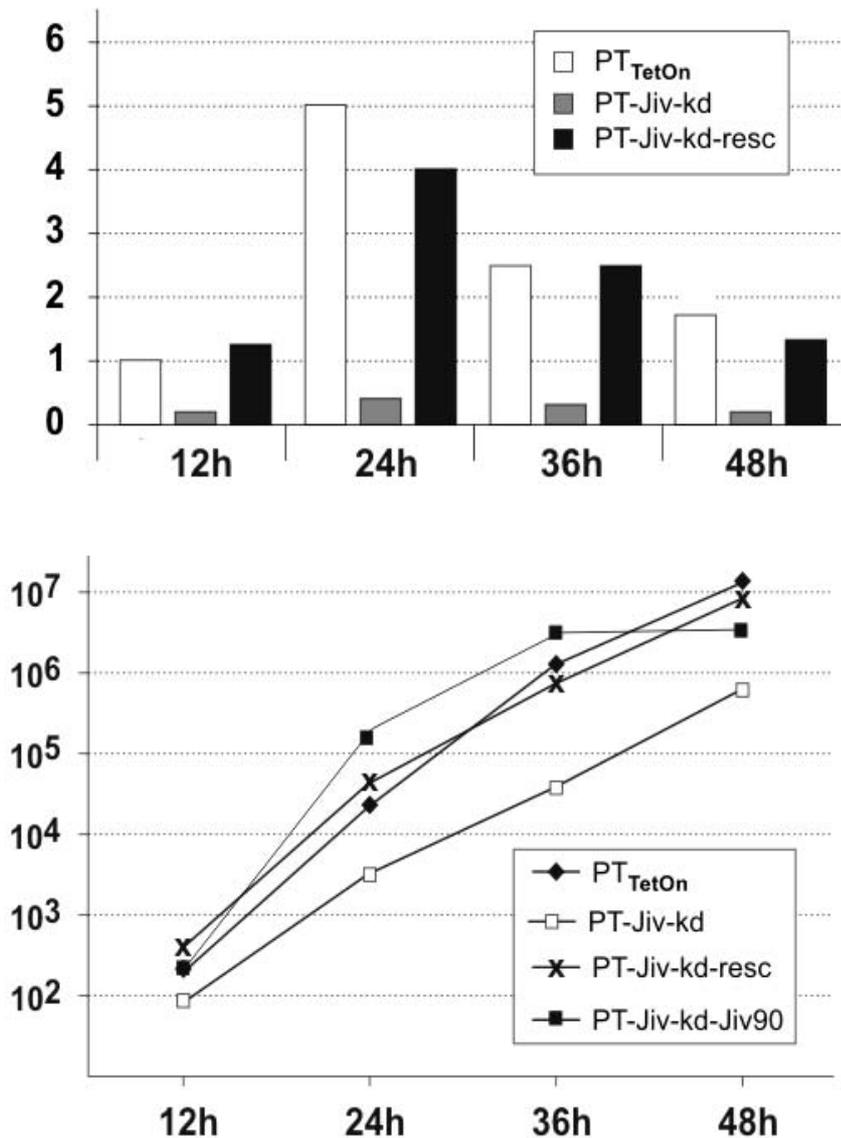


Abb. 18: BVDV-Replikation in verschiedenen Zellen

Oben: Die Gesamtzell-RNA der mit nzp BVDV NCP8 (MOI=5) infizierten Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Anschließend wurde die virale RNA mit Hilfe der quantitativen Realtime-RT-PCR quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die zum Zeitpunkt 12 h p.i. in den Kontrollzellen gemessene virale RNA-Menge wurde als Referenzwert verwendet und auf den Wert 1 gesetzt.

Unten: Die Zellkulturüberstände der mit nzp BVDV infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Menge der enthaltenen infektiösen Virionen mittels Virustitration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Jiv-spezifische siRNA wurde in den unterschiedlichen Zelllinien nach Präparation der zellulären RNA durch Northernblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 19).

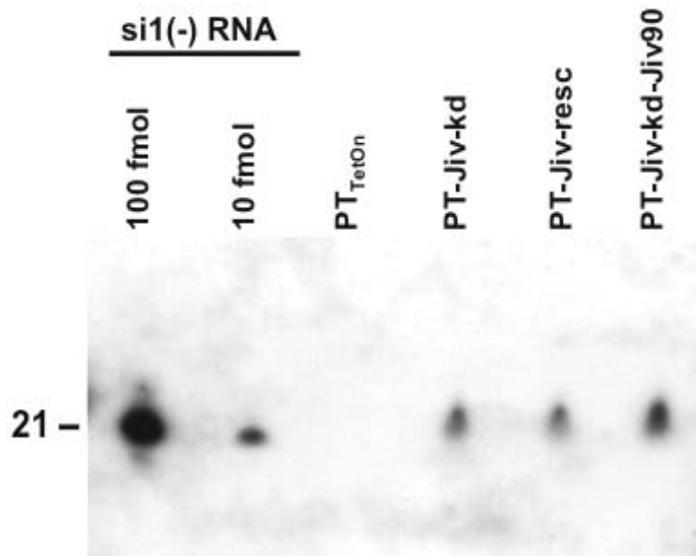


Abb. 19: Nachweis der Jiv-spezifischen siRNA im Northernblot

Die Präparation der zellulären RNA erfolgte nach einem Protokoll, das zur Anreicherung kleiner RNA-Spezies führt (siehe Material und Methoden). Die RNA wurde mit Hilfe eines 15%igen Polyacrylamidgels aufgetrennt und anschließend mittels Elektrobrot auf eine Nylonmembran geblottet. Als Positivkontrolle und zugleich als Größenmarker diente das 21 Basen große RNA-Oligonukleotid siRNA1(-). Zur Detektion wurde das radioaktiv markierte DNA-Oligonukleotid siRNA1(+) eingesetzt, die Auswertung erfolgte per Autoradiographie.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den durch Reduzierung der Jiv-Menge in der Zelle nachgewiesenen Effekten auf die Replikation um Pestivirus-spezifische Effekte handelt, wurde die Replikation von Tollwutvirus und Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) in den Jiv-„*knockdown*“-Zellen im Vergleich zu den Ausgangszellen untersucht. Die beobachteten Effekte erwiesen sich als Pestivirus-spezifisch, denn weder die Vermehrung von Tollwutvirus noch die Vermehrung von EMCV wurde durch den reduzierten Jiv-Spiegel beeinflusst.

In PT_{TetOn}-Zellen und in PT-Jiv-kd-Zellen wurden nach Infektion mit Tollwut-Virus die gleichen Virustiter erreicht (M. König, persönliche Mitteilung). Auch nach Infektion der beiden Zelllinien mit EMCV (MOI=10/MOI=1000) zeigte sich 24 h p.i. kein signifikanter Unterschied in den resultierenden Virustitern.

EMCV-Infektion (GKID ₅₀ /ml 24h p.i.)	PT _{TetOn}	PT-Jiv-kd
MOI=10	1,8 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸
MOI=1000	2,6 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸

5.3.4 Replikation anderer Pestiviruspezies in Jiv-reduzierten Zellen

Um zu untersuchen, ob die Reduktion des zellulären Jiv-Spiegels auch bei anderen Pestiviren Auswirkungen auf die virale Replikation zeigt, wurden ein nzp Border Disease-Stamm und verschiedene nzp BVDV-2-Stämme untersucht.

Zunächst wurden die Jiv-„knockdown“-Zellen PT-Jiv-kd und PT_{TetOn}-Zellen parallel mit nzp BVD Moredun (MOI=5) infiziert. Jeweils 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Infektion wurden die Virustiter in den Zellkulturüberständen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Virustiter zu allen Zeitpunkten in den Jiv-„knockdown“-Zellen PT-Jiv-kd deutlich reduziert waren (Abb. 20).

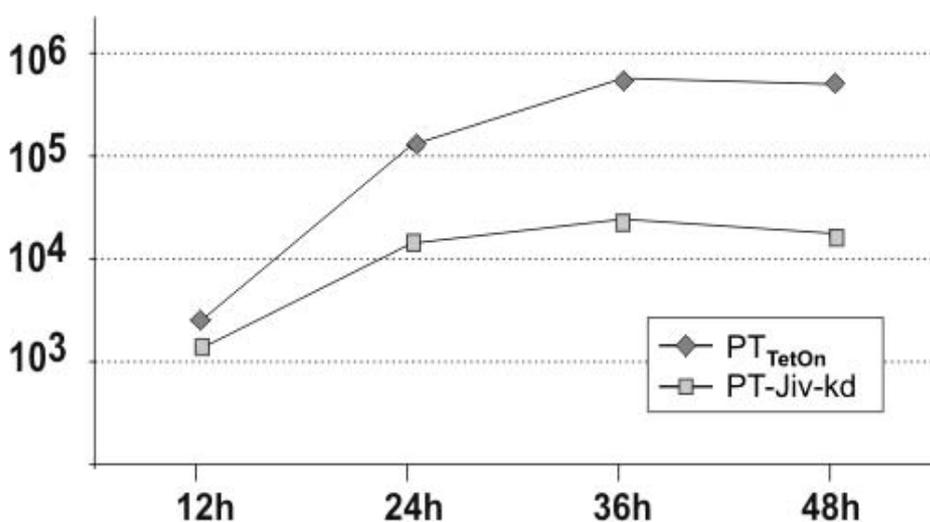


Abb. 20: Wachstumskinetik von nzp BDV in Jiv-reduzierten Zellen

Die Zellkulturüberstände der mit nzp BDV Moredun (MOI=5) infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Anzahl der darin enthaltenen infektiösen Virionen per Virustitration bestimmt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Virustiter sind als GKID₅₀/ml angegeben.

Das gleiche Experiment wurde anschließend mit dem nzp BVDV-2-Stamm #890 wiederholt. Hier zeigte sich keine Titer-Reduktion in den Jiv-„knockdown“-Zellen PT-Jiv-kd (Abb. 21).

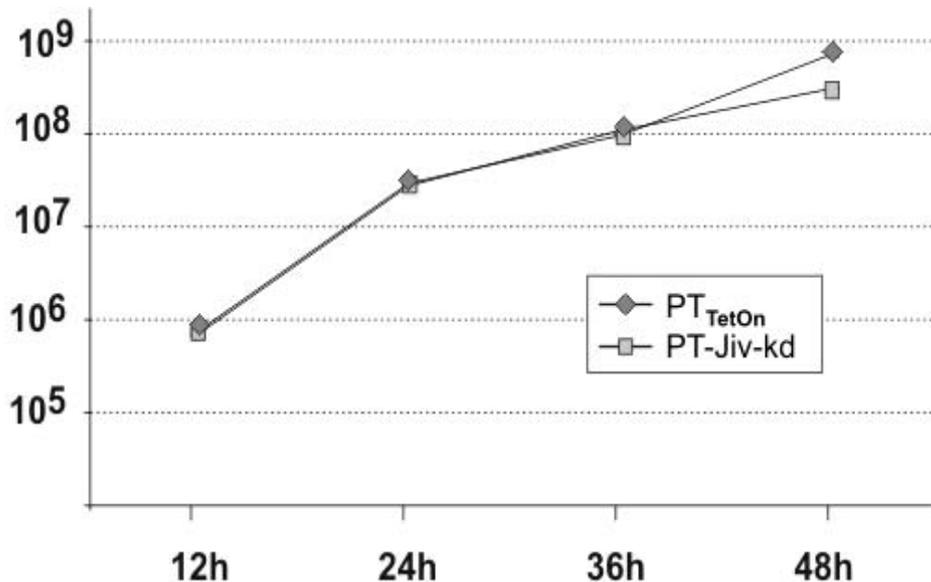


Abb. 21: Wachstumskinetik von nzp BVDV-2 #890 in Jiv-reduzierten Zellen

Die Zellkulturüberstände der mit nzp BVDV-2 #890 (MOI=5) infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Anzahl der darin enthaltenen infektiösen Virionen per Virustitration bestimmt. Das Diagramm stellt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Virustiter sind als GKID₅₀/ml angegeben.

Auffällig an dieser Wachstumskinetik sind die extrem hohen Virustiter zu frühen Zeitpunkten nach Infektion. Dieses Ergebnis war reproduzierbar. Um zu klären, ob das ungewöhnliche Wachstumsverhalten auf diesen Stamm begrenzt ist oder allgemein bei BVDV-2 auftritt, wurden im Weiteren die BVDV-2-Stämme Gi1 und Gi 4 untersucht. Die hohen Titer zu frühen Zeitpunkten traten auch bei Gi1 auf, nicht jedoch bei Gi4. Der Stamm Gi4 zeigte eine Jiv-unabhängige Wachstumskinetik, während das Verhalten von Gi1 eine gewisse Jiv-Abhängigkeit der Replikation vermuten lässt (Abb. 22).

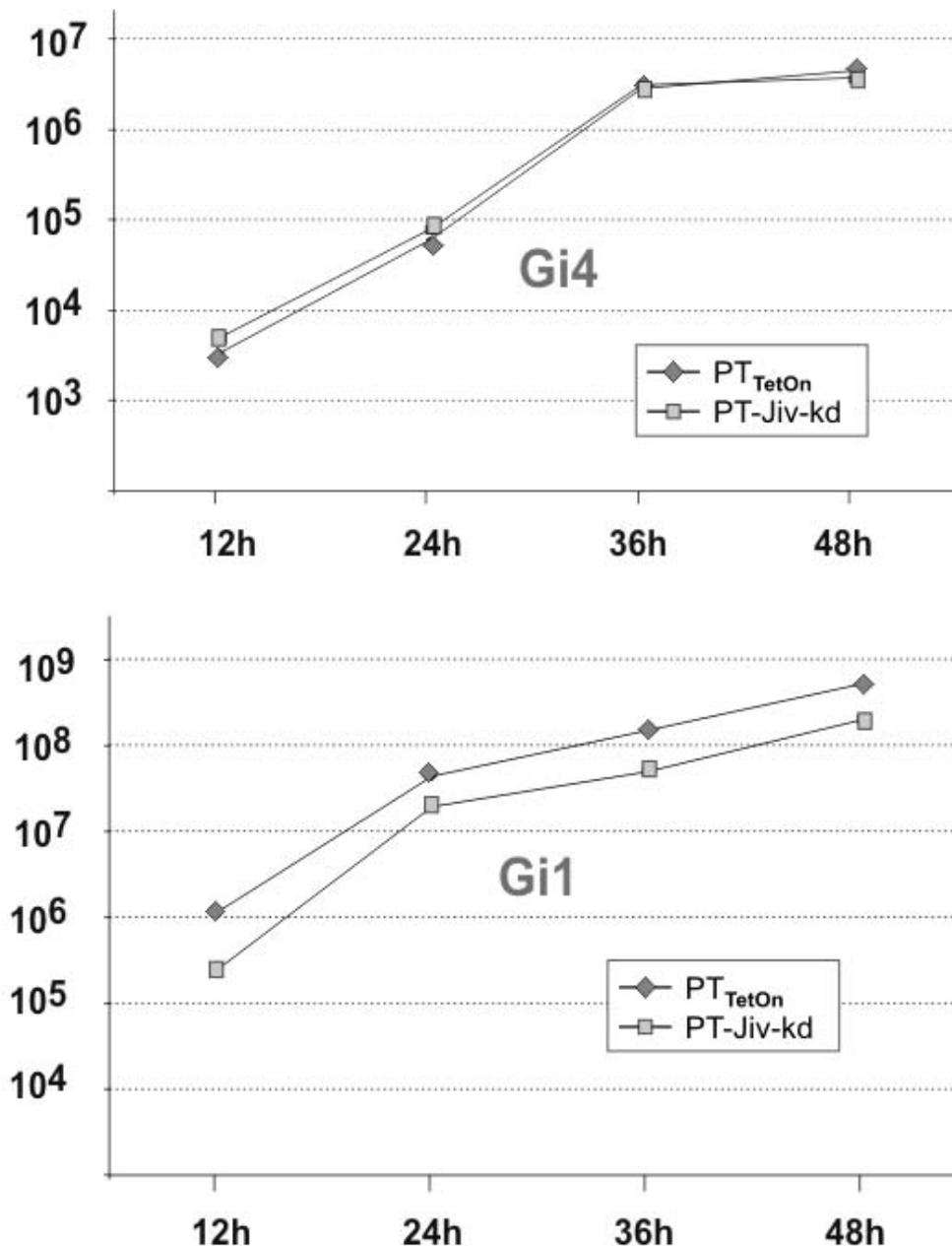


Abb. 22: Wachstumskinetik von nzp BVDV-2 Gi1 und Gi4 in Jiv-reduzierten Zellen

Die Zellkulturüberstände der mit nzp BVDV-2 Gi1 bzw. Gi4 (MOI=5) infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Anzahl der darin enthaltenen infektiösen Virionen per Virustitration bestimmt. Die Diagramme stellen jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Virustiter sind als GKID₅₀/ml angegeben.

Bezüglich der Replikation von BVDV-2 kann man festhalten, dass verschiedene BVDV-2-Stämme deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten zeigen und sich bezüglich der Jiv-Abhängigkeit der Replikation uneinheitlich darstellen.

5.4 Versuch der Herstellung einer dominant-negativen Jiv-Mutante

Eine Mutationsanalyse in Form eines „Alanin-Scans“ von Jiv90 hatte ergeben, dass durch den Austausch von Tryptophan an Position 39 durch Alanin die Jiv-induzierte NS2-3-Spaltung inhibiert wird. Lediglich eine andere aromatische Aminosäure ist an dieser Position ebenfalls erlaubt. Wird das Tryptophan an Position 39 des Jiv90 durch Alanin ersetzt (Jiv90W39A), kann zwar noch Bindung an NS2, aber keine Spaltung von NS2-3 mehr erfolgen (Lackner et al., 2005).

Es wurde vermutet, dass die Expression dieser Jiv90-Mutante in einer Zelllinie einen negativen Effekt auf die Replikation von nzp BVDV in diesen Zellen ausüben könnte. Nach Infektion der Zelllinie PT-GSTJiv90W39A mit nzp BVDV ergab sich jedoch keine Reduktion der Produktion von Nachkommenviren (Abb. 23).

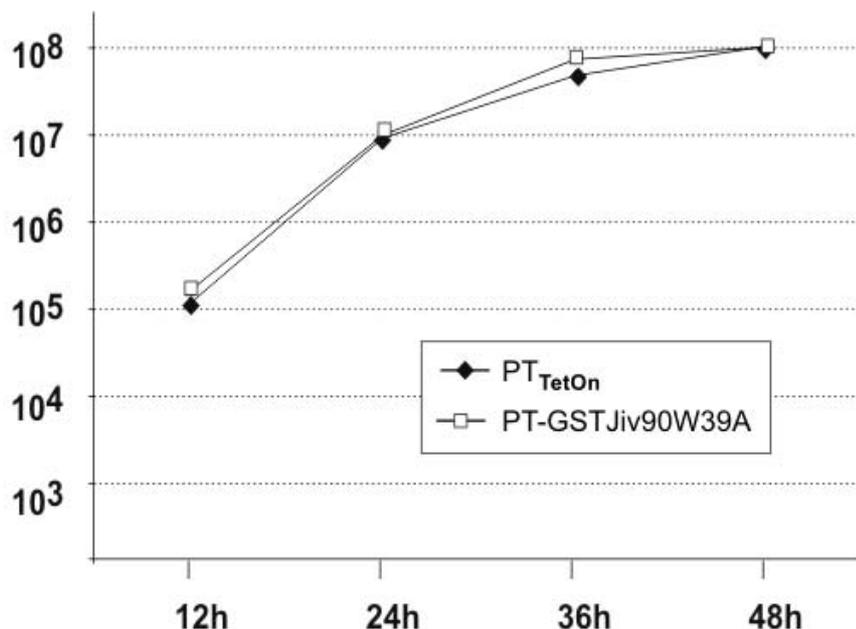


Abb. 23: BVDV-Replikation in Jiv90W39A-exprimierenden Zellen

Die Zellkulturüberstände der mit nzp BVDV infizierten Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Menge der enthaltenen infektiösen Virionen mittels Virustitration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Virustiter sind als GKID₅₀/ml angegeben.

5.5 Einfluss der BVDV-Infektion auf die Jiv-Expression

Abschließend wurde untersucht, ob eine Infektion mit BVDV einen Einfluß auf die Jiv-Expression der Zelle ausübt. Es wäre denkbar, dass es infolge einer Infektion mit Pestiviren zu einer Herabregulierung der Jiv-Expression in den infizierten Zellen kommt, aber auch eine Erhöhung der Expression infolge des vermehrten Verbrauches wäre möglich.

Daher wurden mittels quantitativer Realtime-RT-PCR die relativen Mengen zellulärer Jiv-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Infektion bestimmt. Es traten nur leichte Veränderungen bei den infizierten Zellen auf, die sich teilweise oberhalb und teilweise unterhalb der Vergleichswerte in den nicht infizierten Zellen bewegten. Auch nach Wiederholung des Experiments zeigten sich keine eindeutigen Tendenzen.

Die Infektion von bovinen Fibroblasten mit BVDV hat demzufolge keinen deutlichen Einfluss auf die Jiv-mRNA-Menge in diesen Zellen. Es gibt somit bisher keinen Hinweis auf eine Rückkopplung zwischen BVDV-Infektion und Höhe der Jiv-Expression.

6 Diskussion

6.1 Der zytopathogene BVDV-Stamm CP8

Viele Studien innerhalb der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Zytopathogenität bei Pestiviren eng mit Mutationen verbunden ist, die zur Expression von freiem NS3 in großen Mengen führen (Lindenbach und Rice, 2001; Meyers und Thiel, 1996). Die NS3-Freisetzung wird auf verschiedenen Wegen erreicht, die auf drei grundlegenden Mechanismen beruhen.

Bei vielen zytopathogenen BVDV-Stämmen führt die Insertion von zellulären Sequenzen direkt oberhalb von NS3 zur Freisetzung von NS3 durch zelluläre Proteasen (Tautz et al., 1993; Baroth et al., 2000; Becher et al., 2002; Meyers et al., 1998; Qi et al., 1998; Meyers et al., 1989b).

In anderen Fällen führen Punktmutationen, wie beim zp BVDV-Stamm Oregon (Kümmerer et al., 1998), oder kleine Insertionen im NS2, wie beim zp BVDV-Stamm CP7 (Tautz et al., 1996) zur NS2-3-Spaltung. Für den Stamm CP7 wurde gezeigt, dass es über einen noch nicht genau bekannten Mechanismus zur Aktivierung einer Autoprotease im NS2 kommt, welche NS3 abspaltet (Lackner et al., 2004). Wahrscheinlich beruht die gesteigerte NS2-3-Spaltung beim Stamm Oregon auf einem analogen Mechanismus.

Bei einem weiteren Typ von zp Pestivirus-Stämmen wird die NS2-3-Spaltung durch Insertion von Jiv-kodierenden Sequenzen im NS2-Gen induziert (Becher et al., 1996; Mendez et al., 1998; Neill und Ridpath, 2001; Ridpath und Neill, 2000; Rinck et al., 2001; Meyers et al., 1991a).

Alle bislang aufgeführten zp Pestivirus-Stämme haben die gemeinsame Eigenschaft, dass die zp-spezifische Mutation die NS2-3-kodierende Region betrifft. Der erstmals 2002 beschriebene (Rinck, 2002) und in dieser Arbeit weiter charakterisierte zp BVDV-Stamm CP8 passt jedoch

nicht in dieses allgemeine Schema, da seine 1539 Nukleotide große zp-spezifische Insertion im 5'-Bereich des Genoms und damit im Strukturprotein-kodierenden Bereich lokalisiert ist. Interessanterweise besteht diese Insertion aus viralen und zellulären Sequenzen. Der zelluläre Sequenzanteil besteht aus einem kurzen Abschnitt des bovinen Homologs des humanen Hcc-1-Gens (hepatocellular carcinoma-1; GenBank Accession-Nr. P82979) sowie zwei Fragmenten des zellulären Jiv-Gens.

Durch zwei N^{pro}-abhängige Prozessierungsschritte generiert CP8 in infizierten Zellen zusätzlich zu einem kompletten Satz viraler Proteine ein 513 AS großes Fusionsprotein (C*-N^{pro*}), das nicht weiter prozessiert wird. In CP8-infizierten Zellen wird NS2-3 gespalten (Abb. 10). Im NS2 von CP8 waren allerdings keine auffälligen Veränderungen im Vergleich zu NCP8 identifizierbar. Darüberhinaus trat nach Expression der NS2-3-Region von CP8 im Kontext von E2-4A keine Spaltung auf (Abb. 11). Diese Fakten machten deutlich, dass die Ursache für die NS2-3-Spaltung von CP8 eine andere sein muss als bei allen bis dahin bekannten zp Stämmen.

Die Vermutung lag nahe, dass das CP8-spezifische Protein C*-N^{pro*} die Prozessierung von NS2-3 hervorruft. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass das 513 AS große Jiv-Fusionsprotein die NS2-3-Spaltung *in trans* induzieren kann, wie dies bereits für das zelluläre Jiv-Protein und für dessen Fragment Jiv90 gezeigt worden war (Rinck et al., 2001). Im Kontext von C*-N^{pro*} war das Jiv90-Peptid für die Induktion der NS2-3-Spaltung essentiell und ausreichend; andere Bereiche von C*-N^{pro*} induzierten keine NS2-3-Spaltung. Spaltete man C*-N^{pro*} im Bereich des Jiv90 in zwei Fragmente auf, führten diese auch bei gemeinsamer Expression nicht zur NS2-3-Spaltung. Dies bedeutet, dass sich das N-terminale und das C-terminale Jiv90-Fragment nicht funktionell ergänzen

können. Somit wird ein komplettes Jiv90-Peptid zur NS2-3-Spaltungsinduktion benötigt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Jiv90 auch im Kontext des Jiv Fusionsproteins C*-N^{PRO*} *in trans* die NS2-3-Spaltung induzieren und Zytopathogenität auslösen kann. Dabei interagiert das Jiv90-Peptid im C*-N^{PRO*} mit der NS2-Protease, aktiviert diese und induziert so die NS2-3-Spaltung. Details zur Protein-Protein-Interaktion sowie der Mechanismus der Aktivierung der NS2-Protease sollen in weiterführenden Studien untersucht werden.

Kürzlich wurde in einem weiteren Bericht eine zelluläre Jiv-Insertion in der N-terminalen Region des Polyproteins zweier zp BVDV-Stämme beschrieben (Nagai et al., 2003). Das Polyprotein von BVDV Nose und BVDV KS86 1cp beinhaltet jeweils eine 110 Aminosäuren umfassende Jiv-Insertion, die sich stromabwärts eines C-terminal verkürzten C befindet; auf die Jiv-Insertion folgt ein N^{PRO}, welches N-terminal um 6 AS verkürzt ist. Bisher wurden für diese Virusstämme keine Proteinprozessierungsstudien veröffentlicht. Da jedoch das N-terminal um 21 AS verkürzte N^{PRO*} von BVDV CP8 proteolytisch aktiv ist, kann man davon ausgehen, dass dies auch für das um 6 AS verkürzte N^{PRO} der Stämme Nose und KS86 1cp zutrifft.

Diese beiden Stämme weisen daher eine vereinfachte Version der bei CP8 vorgefundenen Genomorganisation auf. Die Insertion von Jiv-Fragmenten in der N-terminalen Region des Polyproteins als Grundlage des zytopathogenen Biotyps von BVDV ist also offenbar nicht auf den Stamm CP8 beschränkt; es scheint sich dabei vielmehr um das charakteristische Merkmal eines neuen Typs zytopathogener BVDV-Stämme zu handeln.

6.2 Das zelluläre J-Domänen-Protein Jiv

Jiv ist ein Mitglied der Familie der J-Domänen-Proteine, wobei es sich um eine Gruppe von zellulären Chaperonen handelt, die durch das Vorhandensein einer 70 AS großen J-Domäne gekennzeichnet sind. Die bekanntesten Vertreter dieser Familie sind das DnaJ-Protein aus *E.coli* und das eukaryontische Hsp40 (Agashe und Hartl, 2000; Cheetham und Caplan, 1998; Kelley, 1998). Diese J-Domänen-Proteine haben die Fähigkeit, mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 zu interagieren und die Aktivität dieses Chaperons zu regulieren. Sie vermitteln über ihre J-Domäne die Hsp70-Substrat-Interaktion, indem sie zunächst selbst an die Substrate binden und diese dann an Hsp70 weiterreichen. Damit spielen die J-Domänen-Proteine eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung. Die Faltungsaktivität von Hsp70 wird massiv stimuliert, wenn das Substrat und ein J-Domänen-Protein an das Chaperon gebunden sind (Kelley, 1998). Das Eingehen und das Vermitteln von Protein-Protein-Interaktionen ist also eine typische Eigenschaft von J-Domänen-Proteinen.

Über das als HDJ3 (humanes DnaJ3) bezeichnete Jiv-Homolog des Menschen (Chen et al., 2003) ist bezüglich seiner Funktion wenig bekannt. Es ist ebenfalls homolog zu dem als DRIP78 (*dopamine-receptor interacting protein 78*) bezeichneten Jiv-Homolog der Ratte, welches nachweislich am Export von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie dem Dopamin D1-Rezeptor, an die Zelloberfläche beteiligt ist (Bermak et al., 2001b). Diese Funktion wird durch eine Protein-Protein-Interaktion über eine Proteindomäne, welche Jiv90 umfasst, vermittelt. Der Jiv90-Bereich des bovinen Jiv-Proteins ist für die Interaktion des bovinen Jiv-Proteins mit dem NS2 von Pestiviren verantwortlich (Lackner et al., 2005; Rinck et al., 2001).

6.3 Die NS2-Autoprotease und ihre Bedeutung für nzp BVDV

Die Freisetzung großer Mengen von NS3 sowie die Akkumulation großer Mengen viraler RNA in der infizierten Zelle sind - neben der Ausbildung eines ZPE in der Zellkultur - die wichtigsten Merkmale zytopathogener Pestiviren. Wie oben bereits beschrieben kann die NS3-Freisetzung bei zp Pestiviren aufgrund verschiedener Mechanismen erreicht werden.

Vor kurzem wurde im NS2 von Pestiviren eine Autoprotease identifiziert, die für die NS2-3-Spaltung und damit für die NS3-Freisetzung verantwortlich ist (Lackner et al., 2004). Diese Autoprotease wird im Folgenden als NS2-Protease bezeichnet. Obwohl bereits bekannt war, dass NS3 für die Replikation von Pestiviren essentiell ist (Behrens et al., 1998), herrschte bis zu diesem Zeitpunkt das Dogma, dass bei nzp Pestiviren keine NS2-3-Spaltung stattfindet. Man ging davon aus, dass die Funktion von NS3 als Bestandteil des Replikationskomplexes bei nzp Pestiviren von ungespaltenem NS2-3 übernommen wird. Nun erschien allerdings die neue Beobachtung, dass auch bei nzp BVDV zu frühen Zeitpunkten nach Infektion NS2-3-Spaltung stattfindet und dass ungespaltenes NS2-3 nicht in der Lage ist, das freie NS3 funktionell zu ersetzen (Lackner et al., 2004).

Als entscheidend für die pestivirale Replikation erwies sich die zeitliche Regulation der NS2-Protease. In nzp BVDV-infizierten Zellen nimmt die Aktivität der NS2-Protease im Laufe der ersten 9 Stunden nach der Infektion sehr deutlich ab, später translatiertes NS2-3 wird nicht mehr gespalten. Dadurch sinkt die Freisetzung von NS3 innerhalb dieser 9 Stunden auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau ab. Parallel bricht die RNA-Replikation von nzp BVDV bereits 24 h p.i. deutlich ein. Im Gegensatz dazu replizieren zp BVDV-Viren über die gesamte Dauer der Infektion auf einem sehr hohen Niveau (Lackner et al., 2005).

6.4 Jiv als Kofaktor der NS2-Autoprotease

Es ist bereits seit einigen Jahren bekannt, dass das Chaperon Jiv als zellulärer Bindungspartner von NS2 die NS2-3-Spaltung in nzp BVDV-infizierten Zellen induziert. Infolgedessen führt die Jiv-Überexpression zu einem Wechsel des viralen Biotyps von nzp zu zp (Rinck et al., 2001). Vor kurzem konnten diese Beobachtungen auf die Funktion von Jiv als Kofaktor der NS2-Protease zurückgeführt werden (Lackner et al., 2005).

Ausgehend von der Annahme, dass die Aktivität der NS2-Protease von ihrem Kofaktor Jiv abhängig ist, wäre das oben beschriebene Phänomen der zeitlichen Regulierung der NS2-Protease damit erklärbar, dass der zelluläre Jiv-Vorrat im Laufe der Infektion verbraucht wird, denn das Jiv-Protein ist in der Zelle nur in sehr geringen Mengen vorhanden und wird nur in geringem Maß nachgeliefert.

Es lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Durch den Verbrauch des zellulären Jiv wird die NS2-3-Spaltung und damit die NS3-Freisetzung begrenzt, was wiederum zur Beschränkung der viralen RNA-Replikation führt, da NS3 als Bestandteil der viralen Replikase benötigt wird; auf diese Weise reguliert die zelluläre Jiv-Menge die virale Replikation.

6.5 Einfluss des zellulären Jiv-Proteins auf die Replikation von Pestiviren

Nachdem die Bedeutung der NS2-Protease für die pestivirale Replikation gezeigt und Jiv als Kofaktor der NS2-Protease identifiziert worden war, sollte in dieser Arbeit die Bedeutung von Jiv für die Regulation der pestiviralen Replikation untersucht werden.

6.5.1 BVDV-Replikation in Zellen mit verändertem Jiv-Spiegel

Die Hypothese, dass die zelluläre Jiv-Menge die virale Replikation reguliert, wird von den Ergebnissen dieser Arbeit unterstützt. Erhöht man die Menge des intrazellulären Jiv-Proteins massiv, wie dies in den Jiv-überexprimierenden Zellen $\text{MDBK}_{\text{TetOnJiv}}$ der Fall ist, greift der

Regulationsmechanismus in Form einer Limitierung der viralen Replikation durch den Verbrauch des zellulären Kofaktors Jiv nicht mehr. Auch in diesen Zellen wird zwar Jiv verbraucht, doch neues Jiv wird ständig in konstanten Mengen nachgeliefert und ist daher jederzeit in großen Mengen vorhanden. In diesen Zellen kommt es im Verlauf einer nzp BVDV-Infektion nicht zum Einbruch der viralen RNA-Replikation (Abb. 13); die Replikation erfolgt über den gesamten Zeitraum der Infektion auf einem konstant hohen Niveau, wie dies auch in zp BVDV-infizierten Zellen der Fall ist. Es kommt zur Ausbildung eines ZPE, auf Proteinebene lässt sich über den gesamten Zeitraum der Infektion eine effiziente NS2-3-Spaltung nachweisen, und in den Zellen akkumulieren große Mengen viraler RNA. Eine Erhöhung des intrazellulären Jiv-Spiegels interferiert also mit der Regulation der NS2-3-Spaltung in nzp BVDV-infizierten Zellen mit der Folge, dass nzp BVDV in diesen Zellen zytopathogen wird und wie zp BVDV repliziert. Dies ist bereits ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Jiv-Protein eine wichtige Rolle innerhalb der Regulationsvorgänge während einer Infektion mit nicht zytopathogenen Pestiviren spielt.

Weitere Unterstützung bekommt diese Hypothese, wenn man die Vorgänge während einer nzp BVDV-Infektion in Zellen mit einem durch RNA-Interferenz reduzierten Jiv-Spiegel (Jiv-„*knockdown*“-Zellen, siehe Kap. 5.3.1.3) untersucht. In diesen Zellen sinkt die Aktivität der NS2-Protease und damit die Freisetzung von NS3 bereits 7 Stunden nach der Infektion, und damit 2 Stunden früher als in den Vergleichszellen, auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau ab (Lackner et al., 2005). Die Kinetik der NS2-3-Prozessierung in nzp BVDV-infizierten Zellen wird also eindeutig durch den zellulären Jiv-Spiegel beeinflusst.

Auch auf die virale Replikation hat die Reduktion des zellulären Jiv-Spiegels Auswirkungen. In Jiv-„*knockdown*“-Zellen“ findet man im

Vergleich zu den Ausgangszellen nach Infektion mit nzp BVDV eine um 90% reduzierte Menge viraler RNA und einen um 1,5 log₁₀-Stufen reduzierten Virustiter. Dies entspricht einer Reduktion der Menge freigesetzter Virionen um etwa 97%. Die vorhandene Jiv-Menge limitiert also offensichtlich die virale RNA-Replikation und die Virusproduktion der infizierten Zelle.

In Zellen, in denen trotz vorhandener Jiv-spezifischer siRNA die Jiv-Expression auf Wildtyp-Niveau wiederhergestellt wurde (Jiv-„*rescue*“-Zellen, siehe Kap. 5.3.1.5) erreichten nach nzp BVDV-Infektion sowohl die virale RNA-Menge als auch die Virusproduktion vergleichbare Werte wie in den Wildtyp-Zellen. Damit ist belegt, dass die in den Jiv-„*knockdown*“-Zellen beobachteten Effekte keine unspezifischen Auswirkungen durch die vorhandene siRNA darstellen. Diese Kontrolle war sehr wichtig, denn es ist bekannt, dass es im Zusammenhang mit RNA-Interferenz-Techniken zu einer Aktivierung des zellulären Interferon-Systems kommen kann (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003). Wäre dies hier der Fall gewesen, d.h. handelte es sich bei der Reduktion der viralen Replikation in den Jiv-„*knockdown*“-Zellen um einen unspezifischen Interferon-Effekt, ausgelöst durch die Anwesenheit der kurzen haarnadelförmigen Transkripte (*hairpin RNAs*), hätte dieser auch in den Jiv-„*rescue*“-Zellen auftreten müssen. Des Weiteren hatte die Reduktion des zellulären Jiv-Spiegels keinerlei Auswirkungen auf die Replikation von Tollwut-Virus in diesen Zellen, womit ein weiterer Hinweis gegeben ist, dass es sich bei den beschriebenen Effekten tatsächlich um spezifische Auswirkungen des reduzierten zellulären Jiv-Spiegels auf die pestivirale Replikation handelt.

Für den zp BVDV-Stamm CP8 wurde in den Jiv-„*knockdown*“-Zellen keine Reduktion der viralen RNA-Replikation beobachtet. Dies beruht gemäß der erarbeiteten Daten auf der Generierung des Jiv-

Fusionsproteins C*-N^{pro*} durch CP8. Dieses Protein kann die Funktion des zellulären Jiv offensichtlich übernehmen, sodass die Reduktion des zellulären Jiv-Spiegels keine Auswirkungen auf die Replikation dieses Stammes hat.

6.5.2 Jiv-Abhängigkeit verschiedener Pestivirus-Spezies

Die Replikationslimitierung durch einen begrenzten zellulären Jiv-Vorrat wurde zunächst für nzp BVDV-1 (Stämme NCP8 und NCP7) nachgewiesen. Es stellte sich dann die Frage, ob auch die Replikation anderer Pestivirus-Spezies von Jiv abhängig ist. Getestet wurde nzp BDV (Stamm Moredun) sowie nzp BVDV-2 (Stämme #890, Gi1 und Gi4). Meine Untersuchungen ergaben eine eindeutige Jiv-Abhängigkeit der Replikation bei dem untersuchten nzp BDV-Stamm und in abgeschwächter Form bei einem der untersuchten nzp BVDV-2-Stämme. Die Replikationslimitierung durch einen begrenzten zellulären Jiv-Vorrat lässt sich also bei verschiedenen Pestiviren nachweisen, jedoch nicht bei allen. Damit ist gezeigt, dass es sich hierbei um ein speziesübergreifendes Phänomen handelt, das wahrscheinlich alle bislang untersuchten nzp BVDV-1-Stämme und auch nzp BDV betrifft; es gilt allerdings nicht für alle nzp Pestiviren, wie sich im Fall von BVDV-2 zeigte. Eine Untersuchung einer größeren Zahl von Stämmen wird notwendig sein, um ein eindeutiges Bild zu erhalten.

Zytopathogene Pestiviren generieren freies NS3 mittels verschiedener Mechanismen (siehe Kap. 3.3.5 und 6.1). Dadurch werden sie bezüglich der NS3-Generierung unabhängig vom zellulären Jiv. Dies kann durch die Insertion von zellulären Jiv-Sequenzen geschehen, wie bei dem in dieser Arbeit untersuchten Stamm CP8. Aber daneben existieren viele andere Wege - wie z.B. die Insertion zellulärer Sequenzen, welche eine zusätzliche Protease-Spaltstelle im Polyprotein generieren, oder Mutationen im NS2-Gen -, die komplett ohne Jiv auskommen. Dies legt

die Vermutung nahe, dass zp Viren unabhängig von zellulärem Jiv replizieren können. Für den endgültigen Beweis dieser Annahme sind allerdings Jiv-„*knockdown*“-Zellen nicht ausreichend, man bräuchte dafür Jiv-„*knockout*-Zellen“. In solchen Zellen wäre die Jiv-Expression nicht nur herabreguliert, sondern durch Deletion oder Inaktivierung des Jiv-Gens komplett abgeschaltet.

Eine interessante Ausnahme von der Replikationslimitierung der nzp Pestiviren durch einen begrenzten zellulären Jiv-Vorrat, die im Detail noch weiter zu untersuchen ist, stellt offensichtlich nzp BVDV-2 dar. Hier wurde zunächst der nzp Stamm #890 untersucht. Dabei handelt es sich um einen HS-Stamm, der aus einem Tier, das an akutem hämorrhagischem Syndrom starb, isoliert wurde. Dieser nzp BVDV-2-Stamm besitzt eine 228 Nukleotide große Insertion zwischen dem p7- und dem NS2-Gen. Auf das reguläre p7-Protein folgen 26 AS aus dem NS2, 3 AS unbekannter Herkunft und 47 AS aus dem p7-Protein; daran schließt sich das reguläre NS2 an. Somit befindet sich die Insertion oberhalb der Stelle, an der sich bei verschiedenen zp Stämmen die Jiv-Insertionen befinden. Die Insertion konnte nicht mit Virulenz-Unterschieden in Zusammenhang gebracht werden und wurde bisher auch bei keinem anderen BVDV-Stamm gefunden (Ridpath und Bolin, 1995). BVDV-2 #890 erwies sich bezüglich seiner Replikation als Jiv-unabhängig, ebenso wie der Stamm Gi4, der zu einem anderen Genotyp als #890 gehört. Bei den nzp BVDV-2-Stämmen Gi1 und Gi4 handelt es sich um Isolate, die als Kontamination in fötalem Kälberserum entdeckt wurden (M.König, Institut für Virologie, Gießen). Gi1 gehört zum gleichen Genotyp wie #890, zeigte aber im Gegensatz zu diesem Stamm eine abgeschwächte Form der Replikationslimitierung in den Jiv-„*knockdown*“-Zellen.

Die Jiv-Unabhängigkeit der Replikation ist also offensichtlich kein

generelles BVDV-2-spezifisches Phänomen. Auch scheint es nicht genotypspezifisch zu sein, da die Stämme Gi1 und #890 zum gleichen Genotyp gehören, sich aber unterschiedlich verhalten. Das Phänomen könnte stammspezifisch auf HS-Stämme begrenzt sein. Um dies zu klären, sind weitere Untersuchungen mit verschiedenen BVDV-2-Stämmen mit bekannter Virulenz notwendig. Außerdem wäre es interessant zu ergründen, wie im Falle von BVDV-2 #890 und Gi4 die Jiv-Unabhängigkeit der Replikation erreicht wird.

Außerdem stellt sich die Frage, ob das Schweinepestvirus (CSFV) bezüglich seiner Replikation vom zellulären Jiv-Spiegel abhängt. Dabei besteht aber die Schwierigkeit, dass die hier verwendeten bovinen PT-Zellen nur mit geringer Effektivität mit CSFV infizierbar sind. Es gibt die Möglichkeit einer vergleichenden Elektroporation der PT_{TetOn}-Zellen und der Jiv-„*knockdown*“-Zellen mit rekombinanter infektiöser CSFV-RNA, die von mir bereits durchgeführt wurde. Dieses Experiment ergab einen Hinweis darauf, dass auch die Replikation von CSFV vom zellulären Jiv abhängig ist (nicht gezeigt). Allerdings handelt es sich bei diesem Versuchsaufbau im Gegensatz zu den Infektionsexperimenten um ein artifizielles System, und die so erzielten Ergebnisse sind nicht direkt mit den Ergebnissen einer Infektion vergleichbar. Ideal wäre die Etablierung einer Schweinezelllinie mit reduziertem Jiv-Spiegel und die anschließende Durchführung von Infektionsexperimenten mit dieser Zelllinie, um mit einem möglichst natürlichen System zu arbeiten.

6.5.3 Mechanismus der Replikationsregulation durch Jiv

Bei verschiedenen Viren wurde bereits ein Einfluss von zellulären J-Domänen-Proteinen auf die virale Replikation entdeckt. Zur korrekten Bildung des Replikationskomplexes des Hepatitis B-Virus - eines DNA-Virus, dessen Replikation die Bildung eines RNA-Zwischenproduktes erfordert - werden zum Beispiel das J-Domänen-Protein Hdj1 sowie

Hsp70 benötigt. Hdj1 bildet mit der reversen Transkriptase einen metastabilen Komplex, der bei ausbleibender RNA-Bindung bald wieder zerfällt, aber nach erfolgter RNA-Bindung sehr stabil ist (Beck und Nassal, 2003; Hu et al., 1997). Auch das Plusstrang-RNA-Virus Brom-Mosaik-Virus ist zur Formierung seines Replikationskomplexes auf zelluläre Chaperone angewiesen, unter anderem auf das J-Domänen-Protein Ydj1. In Zellen, die eine Ydj1-Mutante exprimierten, fand keine Replikation der viralen RNA statt, obwohl alle benötigten viralen Proteine und die virale RNA vorhanden waren und sogar korrekt an den ER-Membranen, dem Ort der Replikation, lokalisiert waren (Tomita et al., 2003).

Im Gegensatz zu diesen beiden Beispielen, wo authentische zelluläre Chaperone an der Formierung des Replikationskomplexes beteiligt sind, wird im Fall von BVDV nicht das komplette Jiv benötigt, sondern es genügt bereits das kleine Jiv-Fragment Jiv90 um die Replikation zu fördern. Es wurde gezeigt, dass Jiv90 als Kofaktor ausreichend ist, um die NS2-3-Spaltung zu ermöglichen (Lackner et al., 2005). Das Jiv-Protein bzw. das Jiv90-Peptid ist wahrscheinlich nicht direkt an der Formierung des Replikationskomplexes beteiligt, wird aber im Vorfeld unbedingt benötigt, um als Kofaktor der NS2-Protease die NS2-3-Spaltung zu ermöglichen, sodass NS3 freigesetzt wird, welches ein essentieller Bestandteil des Replikationskomplexes ist.

Jiv90 ist die kürzeste bisher in zp Pestiviren gefundene Jiv-Insertion. Der zp Stamm NADL - als Beispiel für eine Vielzahl ähnlich aufgebauter zp Pestiviren - besitzt eine Insertion von Jiv90 im NS2 und zeigt wie alle zp BVDV-Stämme eine im Vergleich zu nzp BVDV gesteigerte RNA-Replikation. In diesem Fall sowie bei allen anderen zp Stämmen mit verschieden großen Jiv-Insertionen im NS2-Gen bewirkt die Jiv-Insertion *in cis* eine Aktivierung der NS2-Protease. Beim zp Stamm CP8 umfasst

die Insertion zwar einen größeren Jiv-Anteil, aber bei weitem nicht das gesamte Jiv; nur ein Teil der J-Domäne ist Bestandteil der Insertion. Bei diesem Stamm wird, wie oben beschrieben, das Jiv-Fusionsprotein nach der Freisetzung aus dem viralen Polyprotein *in trans* aktiv, also auf dem gleichen Weg wie das zelluläre Jiv. Da die J-Domäne für die Fähigkeit von Jiv, die Replikation zu fördern nicht notwendig ist, auf der anderen Seite aber für die Hsp70-Bindung benötigt wird, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass Hsp70 oder Proteine der Hsp70-Familie an den Vorgängen der Aktivierung der NS2-Protease beteiligt sind.

6.5.4 Folgen der Jiv-Abhängigkeit

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass zelluläres Jiv über die Regulation der NS2-Protease-Aktivität und damit der Freisetzung des Replikationsfaktors NS3, die pestivirale Replikation reguliert. Ein solcher Regulationsmechanismus, der über die begrenzte Menge eines zellulären Faktors die virale Replikation limitiert, war bisher nicht bekannt. Es gibt einige Beispiele für die Abhängigkeit viraler Proteasen von einem Kofaktor. So sind z.B. die NS3-Proteasen von HCV und von Pestiviren bezüglich ihrer Aktivität von NS4A abhängig; die NS3-Protease von Flaviviren benötigt für ihre Aktivität NS2B (Lindenbach und Rice, 2001). Allerdings werden diese Kofaktoren von den Viren selbst kodiert. Die Abhängigkeit von einem zellulären Kofaktor hat dagegen für das Virus andere Konsequenzen. Eine solche Abhängigkeit führt zu einer engen Verbindung der viralen Replikation mit den physiologischen Vorgängen in der Zelle, womit eine effektive Anpassung an den Wirt möglich wird. Im Fall von BVDV ist dies für die Fähigkeit des Virus im infizierten Wirtstier zu persistieren von entscheidender Bedeutung.

In persistent infizierten Kälbern konnte man das persistierende nzp Virus in allen Geweben nachweisen, es verursachte jedoch keinerlei Läsionen (Liebler-Tenorio et al., 2004). Im Intestinaltrakt eines PI-Tieres fand man

Virusantigen nur in einigen wenigen Epithel-Zellen, mononukleären Zellen sowie intramuralen Ganglienzellen (Liebler et al., 1991).

Im Laufe der Virusreplikation kommt es im PI-Tier früher oder später durch RNA-Rekombination oder Mutation zur Entstehung eines zp Virus. Dieses zp Virus, das zunächst nur an einer einzigen Stelle in einem beliebigen Gewebe des Tieres vorhanden ist, verbreitet sich im Laufe der Pathogenese der Mucosal Disease im gesamten Organismus. Schließlich liegt der Titer des zp Virus nur geringfügig unter dem des nzp Virus.

Eine Studie über experimentell induzierte Mucosal Disease bei mehreren Kälbern führte zu der Beobachtung, dass in der frühen Phase der MD das zp Virus v.a. in Tonsillen, Lymphknoten und im lymphatischen Gewebe des Darmes zu finden war, während es nur eine Woche später in der späten Phase der MD diffus verteilt vorlag (Liebler-Tenorio et al., 1997). Zu diesem Zeitpunkt lagen bereits massive Läsionen des Intestinaltraktes vor, und die Tiere mussten aufgrund starker klinischer Symptome euthanasiert werden.

Die erstaunliche Ausbreitungsfähigkeit des zp Virus, auch in Konkurrenz zum persistierenden nzp Virus, könnte mit der Replikationslimitierung des nzp Virus durch das zelluläre Jiv zusammenhängen, welcher das zp Virus nicht unterliegt und somit einen Replikationsvorteil erlangt.

Auch als Grundlage für Zelltropismus oder Gewebetropismus könnte dieser Mechanismus der Jiv-Abhängigkeit dienen. Bisher ist allerdings sowohl bezüglich der Jiv-Expression in verschiedenen Gewebearten als auch bezüglich des Zell- bzw. Gewebetropismus von BVDV nur relativ wenig bekannt. In persistent mit nzp BVDV infizierten Rindern lässt sich das Virus zwar in allen Geweben nachweisen, doch es fehlt eine Differenzierung nach Zellarten. Idealerweise müsste man die Vorgänge auf Einzelzellebene untersuchen; dafür wären allerdings speziell

markierte Viren notwendig, deren Ausbreitung man verfolgen könnte. Ein qualitativer RT-PCR-Nachweis von Jiv in verschiedenen bovinen Gewebearten ergab nur geringfügige Unterschiede, der Nachweis gelang in allen untersuchten Gewebearten (Neill und Ridpath, 2001). Allerdings wurden hier ebenfalls nur verschiedene Gewebearten, nicht aber verschiedene Zellarten differenziert. Daher steht der Nachweis für den Einfluss von Jiv auf den Zelltropismus im Wirtstier noch aus.

Die Bedeutung der Jiv-Abhängigkeit für die virale Persistenz steht hingegen fest. Wie die Ergebnisse zeigen, ist die begrenzte Jiv-Menge innerhalb der Zelle die Grundlage für die Regulation der viralen Replikation in nzp BVDV-infizierten Zellen. Die Begrenzung der Replikation ist notwendig für die Erhaltung des nzp Biotyps, der wiederum die Voraussetzung für die Etablierung persistenter Infektionen darstellt. Dieser ungewöhnliche und bislang einzigartige Mechanismus der Replikationssteuerung über die Abhängigkeit von einem nur begrenzt zur Verfügung stehenden zellulären Kofaktor ist somit ein viraler Kontrollmechanismus im Rahmen der Anpassung an den Wirt, der es den nzp BVDV-Viren ermöglicht, lebenslang im Wirtsorganismus zu persistieren.

6.6 Versuch der Herstellung einer dominant-negativen Jiv-Mutante

Nachdem die Replikation von nzp BVDV durch eine Reduktion des zellulären Jiv-Spiegels deutlich gehemmt wird, wäre es interessant, eine Möglichkeit zu finden, mit der sich dieser Effekt noch verstärken ließe. Als vielversprechende Möglichkeit würde sich der Einsatz einer dominant-negativen Jiv-Mutante anbieten.

Eine Mutationsanalyse in Form eines Alanin-Scans des Jiv90 hatte ergeben, dass keine der 90 Aminosäuren für die Bindung des Jiv90 an die NS2-Protease essentiell ist. Die Induktion der NS2-3-Spaltung durch

Jiv wurde hingegen durch den Austausch des Tryptophan an Position 39 durch Alanin inhibiert. Lediglich eine andere aromatische Aminosäure ist an dieser Position ebenfalls erlaubt. Ersetzt man das Tryptophan durch Alanin (Jiv90W39A), kann zwar noch Bindung an NS2, aber keine Spaltung von NS2-3 mehr erfolgen (Lackner et al., 2005). Da die NS2-3-Spaltung wie bereits beschrieben eng mit der viralen Replikation verbunden ist, könnte die Expression von Jiv90W39A in der Wirtszelle einen negativen Einfluss auf die Replikation in diesen Zellen haben.

Bezüglich des Mechanismus, der einem solchen Effekt zugrunde liegen könnte, kommen zwei Möglichkeiten in Frage, die entweder einzeln oder auch gemeinsam wirken könnten. Wenn Jiv90W39A an ein NS2-3-Molekül bindet und dort gebunden bleibt, verhindert dies die Bindung von Wildtyp-Jiv und damit die NS2-3-Spaltung. Andererseits bilden Jiv-Proteine bzw. Jiv90-Moleküle untereinander Dimere oder Multimere (N.Tautz, persönliche Mitteilung). Dies könnte dazu führen, dass durch Dimerbildung zwischen mutiertem Jiv90 und normalem zellulärem Jiv weitere Jiv-Moleküle aus dem zur NS2-3-Spaltungsinduktion zur Verfügung stehenden Jiv-Vorrat entfernt werden, was den Effekt noch verstärken würde.

Die Expression der Jiv90W39A-Mutante in einer Zelllinie verursachte jedoch keinerlei Replikationshemmung von nzp BVDV. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sich bei Jiv90W39A offenbar nicht um eine dominant-negative Mutante handelt. Eine mögliche Begründung für die nicht vorhandene Replikationshemmung könnte sein, dass Jiv90W39A mit einer geringeren Bindungsaffinität als Wildtyp-Jiv90 an NS2 bindet. In diesem Fall käme es nicht zu einer Konkurrenz zwischen Wildtyp und Mutante. Außerdem ist nicht sicher, ob und in welchem Ausmaß die Dimerisierung bzw. Multimerisierung dieser Moleküle stattfindet.

6.7 Einfluss der BVDV-Infektion auf die Jiv-Expression

Bei Sindbis-Viren, einem Modellsystem für Plusstrang-RNA-Viren, wurde gezeigt, dass in der infizierten Zelle wesentliche Veränderungen der Zellphysiologie auftreten. Durch Herabregulierung von zellulären Transkriptions- und Translationsvorgängen kommt es zu einer Hemmung der antiviralen Zellantwort, vor allem durch die Verhinderung der Interferon- α/β -Freisetzung. Dieser Eingriff in die Regulationsmechanismen der Zelle ist jedoch nicht spezifisch, sondern es werden alle Transkriptionsvorgänge gehemmt, um eine effiziente Reduktion der antiviralen Zellantwort zu erreichen (Gorchakov et al., 2005).

Daher wäre es denkbar, dass es infolge einer Infektion mit Pestiviren auch zu einer Herabregulierung der Jiv-Expression in den infizierten Zellen kommt. Die Infektion von bovinen Fibroblasten mit BVDV hat jedoch ersten Untersuchungen zufolge keinen deutlichen Einfluss auf die Jiv-mRNA-Menge in diesen Zellen. Es gibt also bisher keinen Hinweis auf eine Rückkopplung zwischen BVDV-Infektion und der Transkription der Jiv-mRNA. Die Fragestellung, ob eine Rückkopplung zwischen viraler Replikation und dem zellulären Jiv-Spiegel existiert, sollte aber in weiteren Studien, bevorzugt mit primären Zellen und vorzugsweise auf Proteinebene, genauer untersucht werden.

Es wurde gezeigt, dass es zwei unabhängige Mechanismen gibt, die an der Verhinderung von BVDV-Superinfektionen beteiligt sind; ein Mechanismus wirkt auf der Ebene des Viruseintritts in die Zelle, der andere auf der Ebene der Replikation (Lee et al., 2005). Der auf Replikationsebene aktive Mechanismus könnte mit dem Jiv-Protein in Zusammenhang stehen, entweder in Form einer negativen Rückkopplung zwischen BVDV-Infektion und Jiv-Expression, die aber bislang nicht nachgewiesen werden konnte, oder aber durch den Jiv-Verbrauch durch das primär infizierende Virus. Basierend auf der

Beobachtung, dass aufgrund des verbrauchten zellulären Jiv-Vorrats die NS2-3-Spaltung bei nzp BVDV-infizierten Zellen wenige Stunden nach der Infektion auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau absinkt, könnte man sich vorstellen, dass für das überinfizierende Virus nicht mehr genügend Jiv in der Zelle vorhanden ist, um die Replikation zu starten.

6.8 Ausblick

Nachdem die Jiv-Abhängigkeit der Replikation der nzp Stämme der Spezies BVDV-1 gezeigt ist, wäre es wichtig zu untersuchen, ob die hier am Beispiel nzp BDV Moredun festgestellte Jiv-Abhängigkeit generell für nzp Stämme der Spezies BDV zutrifft. Dafür müssen weitere Stämme untersucht werden.

Da sich die Spezies BVDV-2 offensichtlich nicht einheitlich darstellt, ist die Untersuchung zusätzlicher BVDV-2-Stämme von besonderem Interesse. Die Jiv-unabhängige Replikation könnte mit Virulenzunterschieden gekoppelt sein, z.B. mit der Entstehung des hämorrhagischen Syndroms. Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre die Untersuchung einer Reihe bezüglich ihrer Virulenz gut charakterisierter BVDV-2-Stämme notwendig. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, wie die Stämme #890 und Gi4 die Jiv-Unabhängigkeit erreichen. Ein besonderes Augenmerk sollte man dabei auf die NS2-Protease dieser Stämme richten; möglicherweise könnte man Punktmutationen finden, die ähnlich wie bei dem zp BVDV-Stamm Oregon zu einer dauernden Aktivierung der NS2-Protease führen könnten, wodurch die Jiv-Abhängigkeit der Replikation überwunden würde. In diesem Zusammenhang wäre es auch hilfreich, die NS2-3-Prozessierungskinetik dieser Stämme zu untersuchen. Möglicherweise haben sie einen Weg gefunden, der die ständige Freisetzung größerer Mengen NS3 ermöglicht, ohne dass damit Zytopathogenität verbunden wäre. Diese Möglichkeit entspricht der Situation, wie sie bei CSFV

vorliegt. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Pathogenese einer akuten Schweinepest-Infektion große Ähnlichkeit hat mit der Pathogenese des hämorrhagischen Syndroms, das durch die HS-Stämme der Spezies BVDV-2 ausgelöst wird.

Da die Verringerung des zellulären Jiv-Spiegels um etwa 85% bereits zu einer sehr deutlichen Reduktion der viralen RNA-Replikation und der Produktion infektiöser Virionen von nzp BVDV führt, ist es wahrscheinlich, dass sich bei einem noch weiter reduzierten Jiv-Spiegel noch drastischere Auswirkungen zeigen würden. Wahrscheinlich handelt es sich bei Jiv um einen essentiellen Wirtsfaktor. Dies würde bedeuten, dass in einer Jiv-freien Zelle überhaupt keine virale Replikation mehr möglich wäre. Allerdings ist es mit den bislang angewandten Methoden nicht möglich, eine solche Reduktion zu erreichen. Dazu wäre ein Jiv-„knockout“ notwendig. Es stellt sich dabei die Frage, ob eine solche „Knockout“-Mutation von den Zellen toleriert würde bzw. ob dies zu Veränderungen der Zellphysiologie führen würde und falls ja, zu welchen. Dass die Reduktion der Jiv-mRNA auf 15% des Ausgangswertes jedoch keine negativen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der kultivierten Zellen hatte, könnte ein Hinweis dafür sein, dass zumindest auf Zellkultur-Ebene der „Knockout“ toleriert würde. Ein nächster möglicher Schritt wäre dann der Jiv-„knockdown“ oder der Jiv-„knockout“ im Gesamtorganismus. Bei *Caenorhabditis elegans* gelang bereits der „Knockdown“ des orthologen DnaJ-Proteins, indem mittels RNA-Interferenz in der Eizelle das Gen *dnj-5* abgeschaltet wurde; dabei entstanden lebensfähige Nachkommen, die keine Veränderung des Phänotyps aufwiesen (WormBase <http://www.wormbase.org>, release WS144; Harris et al., 2003; Piano et al., 2000). Bei Wirbeltieren wurde ein solcher „Knockdown“ oder gar ein „Knockout“ jedoch noch nicht durchgeführt. Der Versuch, mit Tid1 ein verwandtes Protein der Maus

auszuschalten, bei dem es sich wie bei Jiv ebenfalls um ein J-Domänen-Protein handelt, das als Co-Chaperon von Proteinen der Hsp70-Familie agiert, führte nicht zum Erfolg; es entstanden keine lebensfähigen Embryonen. Selbst in embryonalen Maus-Fibroblasten führte das Abschalten des entsprechenden Gens zu massivem Zelltod (Lo et al., 2004).

Sollte in Zukunft allerdings ein Jiv-„*knockdown*“ oder ein Jiv-„*knockout*“ beim Rind gelingen, wäre zu vermuten, dass nzp BVDV in diesen Tieren nur noch mit massiver Einschränkung oder überhaupt nicht mehr replizieren könnte. Damit hätte man ein tierzüchterisches Mittel zur Verfügung, das man im Rahmen von BVDV-Bekämpfungsstrategien einsetzen könnte.

7 Zusammenfassung

Nichtzytopathogene (nzp) BVDV-Stämme können nach diaplazentarer Infektion von Rinderföten persistierende Infektionen hervorrufen; diese gehen mit einer erworbenen Immuntoleranz gegen das infizierende Virus einher. Durch Rekombination oder Mutation des viralen RNA-Genoms können in diesen persistent infizierten Tieren zytopathogene (zp) Viren entstehen, welche die tödliche Krankheit Mucosal Disease (MD) auslösen. In infizierten Zellkulturen führen zp BVD-Viren zu deutlichen morphologischen Veränderungen der Zellen, welche als zytopathischer Effekt (ZPE) bezeichnet werden. Zp BVD-Viren bilden in infizierten Zellen große Mengen des viralen Nichtstrukturproteins 3 (NS3) und führen im Gegensatz zu ihren nzp Vorgängern zu einer verstärkten Anhäufung viraler RNA in der Wirtszelle.

Diese Arbeit untersucht den Einfluss eines zellulären Proteins aus der Familie der J-Domänen-Chaperone auf die Replikation von Pestiviren. Dieses Protein interagiert mit dem viralen Nichtstrukturprotein 2 (NS2) und wird daher als Jiv (J-domain protein interacting with viral protein) bezeichnet. Im NS2 befindet sich eine Autoprotease, welche die NS2-3-Spaltung vermittelt. Diese Protease unterliegt einer zeitlichen Regulierung; in nzp BVDV-infizierten Zellen ist sie nur innerhalb der ersten Stunden nach der Infektion aktiv. Wird das Jiv-Protein zusammen mit NS2-3 exprimiert, führt es zur NS2-3-Spaltung und damit zur Freisetzung von NS3. Einige zp BVDV-Stämme tragen Jiv-kodierende Sequenzen im NS2-3-kodierenden Bereich ihres Genoms, was eine zeitlich unbegrenzte NS2-3-Prozessierung, eine starke RNA-Replikation und den zp Biotyp zur Folge hat.

Der zp BVDV-Stamm CP8, dessen Eigenschaften im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben werden, besitzt im Gegensatz zu den bisher

bekannten Stämmen mit Jiv-Insertionen einen unveränderten NS2-3-Bereich. Im N-terminalen Bereich des Polyproteins dieses Stammes befinden sich zwei Fragmente des zellulären Jiv innerhalb einer komplexen Insertion zellulären und viralen Ursprungs. Infolgedessen wird zusätzlich zu den „regulären“ pestiviralen Proteinen ein 513 AS großes Jiv-Fusionsprotein exprimiert, welches aufgrund des enthaltenen Jiv-Anteils die NS2-3-Spaltung *in trans* induzieren kann. Damit unterscheidet sich BVDV CP8 von allen bisher bekannten np BVDV-Stämmen und stellt daher eine neue Variante innerhalb der vielen verschiedenen Möglichkeiten von Genomveränderungen dar, die zur Zytopenie führen.

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Einfluss des zellulären Jiv-Spiegels auf die Replikation von Pestiviren untersucht. Es stellte sich die Frage, ob Jiv einen essentiellen Wirtsfaktor für die pestivirale Replikation darstellt. Durch vergleichende Studien in Wildtyp-Wirtszellen und Jiv-überexprimierenden Zellen bzw. Jiv-„*knockdown*“-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung bzw. die Verminderung der in der Wirtszelle vorhandenen Jiv-Menge direkt mit der Replikationseffizienz von np BVDV korreliert.

Jiv besitzt die Fähigkeit, über die Regulation der NS2-3-Prozessierung die virale Replikation zu kontrollieren. An Gewebekulturzellen zeigte sich, dass der intrazelluläre Jiv-Spiegel die Replikation von np BVDV limitiert. Dieser hier nachgewiesene Kontrollmechanismus ist entscheidend für den viralen Biotyp und daher für die Fähigkeit von np BVDV, in seinem Wirt zu persistieren.

8 Summary

After diaplacental transmission noncytopathogenic (noncp) BVDV strains are able to cause persistent infections of calves. Viral persistence is associated with a specific acquired immunotolerance concerning the persisting virus. In the persistently infected animal the emergence of a cytopathogenic (cp) virus from its noncp ancestor by recombination or mutation of the viral RNA genome results in lethal Mucosal Disease. In cell culture cp BVDV causes severe morphologic alterations of the infected cells, which are referred to as cytopathic effect (CPE). Large amounts of nonstructural protein 3 (NS3) are produced upon cp BVDV infection leading to an enhanced accumulation of viral RNA when compared to noncp BVDV infected cells.

This work analyses the influence of a cellular protein belonging to the family J-domain chaperons on pestiviral replication. This protein interacts with the viral NS2 and is therefore termed Jiv (J-domain protein interacting with viral protein). In the NS2 protein an autoprotease resides which mediates NS2-3 cleavage. This protease is temporally regulated; in noncp BVDV infected cells its activity is restricted to the first hours after infection. Coexpression of the Jiv protein and NS2-3 leads to NS2-3 cleavage and thereby to the release of NS3. Some cp BVDV strains encompass Jiv-coding sequences in the NS2-3-coding region causing temporally unlimited NS2-3 cleavage, high level RNA replication and the cp biotype.

In the first part of this work the characteristics of the cp BVDV strain CP8 are described. This strain contains in contrast to all other known cp BVDV strains a Jiv-insertion located apart from the NS2-3 region. The insertion is located in the N-terminal region of the polyprotein and includes two fragments of cellular Jiv in the context of a complex

insertion of cellular and viral origin. This results in the expression of a Jiv-fusion protein with a length of 513 amino acids in addition to a regular set of viral proteins. Due to its Jiv-portion the Jiv-fusion protein is capable of inducing NS2-3 cleavage *in trans*. Thereby BVDV CP8 differs from all other cp BVDV strains and represents a new type among the numerous possible genomic variations leading to cytopathogenicity.

In the second part of this work the influence of the cellular Jiv level on viral replication has been studied. The question arose whether Jiv may be a host factor which is essential for pestiviral replication. Comparative studies based on wildtype host cells, Jiv-overexpressing cells and Jiv-knockdown cells demonstrated a direct correlation between the cellular Jiv level and the replication efficiency of noncp BVDV.

Jiv has the ability to control viral replication by regulating NS2-3 processing. For tissue culture cells the limitation of noncp BVDV replication by the intracellular Jiv level was demonstrated. This control mechanism is crucial for the determination of the viral biotype and thereby for the persistence of noncp BVDV in its host.

9 Literaturverzeichnis

- Agapov, E.V., Frolov, I., Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., Schlesinger, S. and Rice, C.M. (2004) Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, **78**, 2414-2425.
- Agashe, V.R. and Hartl, F.-U. (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Cell & Developmental Biology*, **11**, 15-25.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J. and Becher, P. (2001) Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, **286**, 456-465.
- Baker, J.A., York, C.J., Gillespie, J.H. and Mitchell, G.B. (1954) Virus diarrhea in cattle. *Am.J. Vet. Res.*, **15**, 525-553.
- Baker, J.C. (1987) Bovine viral diarrhea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **190**, 1449-1458.
- Baker, R.T., Tobias, J.W. and Varshavsky, A. (1992) Ubiquitin-specific protease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **267**, 23364-23375.
- Barlow, R.M., Gardiner, A.C. and Nettleton, P.F. (1983) The pathology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. *J Comp Pathol*, **93**, 451-461.
- Baroth, M., Orlich, M., Thiel, H.-J. and Becher, P. (2000) Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology*, **278**, 456-466.
- Bazan, J.F. and Fletterick, R.J. (1989) Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*, **171**, 637-639.
- Becher, P., Meyers, G., Shannon, A.D. and Thiel, H.-J. (1996) Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J Virol*, **70**, 2992-2998.
- Becher, P., Orlich, M., König, M. and Thiel, H.-J. (1999a) Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J Virol*, **73**, 5646-5653.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. and Thiel, H.-J. (1999b) Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, **262**, 64-71.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., König, M. and Thiel, H.-J. (1997) Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol*, **78**, 1357-1366.
- Becher, P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (1998) Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol*, **72**, 5165-5173.
- Becher, P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (2000) Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus result in altered growth characteristics. *J Virol*, **74**, 7884-7894.
- Becher, P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (2001) RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol*, **75**, 6256-6264.
- Becher, P., Shannon, A.D., Tautz, N. and Thiel, H.-J. (1994) Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, **198**, 542-551.

- Becher, P., Thiel, H.-J., Collins, M., Brownlie, J. and Orlich, M. (2002) Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric Acid (a) receptor-associated protein and Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. *J Virol*, **76**, 13069-13076.
- Behrens, S.-E., Grassmann, C.W., Thiel, H.-J., Meyers, G. and Tautz, N. (1998) Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol*, **72**, 2364-2372.
- Bermak, J.C., Li, M., Bullock, C. and Zhou, Q.Y. (2001a) Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol*, **3**, 492-498.
- Bermak, J.C., Li, M., Bullock, C. and Zhou, Q.Y. (2001b) Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol*, **3**, 492-498.
- Bhudevi, B. and Weinstock, D. (2001) Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*, **83**, 1-10.
- Bielefeldt Ohmann, H. (1988a) *Vet. Pathol.*, 304-309.
- Bielefeldt Ohmann, H. (1988b) *Acta Vet. Scand.*, 77-84.
- Bielefeldt Ohmann, H., Ronsholt, L. and Bloch, B. (1987) Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J Gen Virol*, **68 (Pt 7)**, 1971-1982.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Cutlip, R.C. and Coria, M.F. (1985) Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*, **46**, 573-576.
- Bolin, S.R., Moennig, V., Kelso Gourley, N.E. and Ridpath, J. (1988) Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch Virol*, **99**, 117-123.
- Brendel, T., Gerbermann, H., Zenk, A., Forster, U., Kaaden, O.-R. and Wolf, G. (2005) Prävalenz und epidemiologische Gesichtspunkte des Bovinen Virusdiarrhö Virus (BVDV) - Infektion in bayerischen Rinderherden. *Tierärztliche Umschau*, **60**, 250-258.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L. and Iggo, R. (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, **34**, 263-264.
- Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J. (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec*, **114**, 535-536.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Bruschke, C.J., Weerdmeester, K., Van Oirschot, J.T. and Van Rijn, P.A. (1998) Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol*, **64**, 23-32.
- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A. and Anderson, N. (1998) Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest*, **10**, 27-35.

- Carrasco, L. (1995) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv Virus Res*, **45**, 61-112.
- Cheetham, M.E. and Caplan, A.J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell stress & Chaperones*, **3**, 28-36.
- Chen, J., Huang, Y., Wu, H., Ni, X., Cheng, H., Fan, J., Gu, S., Gu, X., Cao, G., Ying, K., Mao, Y., Lu, Y. and Xie, Y. (2003) Molecular cloning and characterization of a novel human J-domain protein gene (HDJ3) from the fetal brain. *J Hum Genet*, **48**, 217-221.
- Chon, S.K., Perez, D.R. and Donis, R.O. (1998) Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **251**, 370-382.
- Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S. and Retzel, E. (1988a) Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: The genome organization of a pestivirus. *Virology*, **165**, 200-208.
- Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K. and Purchio, A.F. (1988b) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **165**, 191-199.
- Collett, M.S., Wiskerchen, M.A., Welniak, E. and Belzer, S.K. (1991) Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch Virol*, **Suppl. 3**, 19-27.
- Corapi, W.V., Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1988) Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea infections. *J Virol*, **62**, 2823-2827.
- Corapi, W.V., Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1990a) Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res*, **51**, 1388-1394.
- Corapi, W.V., Elliott, R.D., French, T.W. and Dubovi, E.J. (1990b) Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc*, **196**, 590-596.
- Corapi, W.V., French, T.W. and Dubovi, E.J. (1989) Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, **63**, 3934-3943.
- Darbyshire, J.A. (1960) *Vet. Rec.*, 331.
- de Moerlooze, L., Desport, M., Renard, A., Lecomte, C., Brownlie, J. and Martial, J.A. (1990) The coding region for the 54-kDa protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "zinc finger-like" domain. *Virology*, **177**, 812-815.
- de Moerlooze, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberg, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., Renard, A. and Martial, J.A. (1993) Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J Gen Virol*, **74**, 1433-1438.
- Deng, R. and Brock, K.V. (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology*, **191**, 867-879.
- Donis, R.O. and Dubovi, E.J. (1987) Characterization of bovine diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J Gen Virol*, **68**, 1597-1605.
- Duff, K.C. and Ashley, R.H. (1992) The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers. *Virology*, **190**, 485-489.

- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1996) Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7. *J Virol*, **70**, 4131-4135.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7413-7417.
- Fernandez, A., Hewicker, M., Trautwein, G., Pohlenz, J. and Liess, B. (1989) Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol*, **26**, 26-32.
- Fetzer, C., Tews, B.A. and Meyers, G. (2005) The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol*, **79**, 11901-11913.
- Finley, D., Bartel, B. and Varshavsky, A. (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, **338**, 394-401.
- Finley, D., Özkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell*, **48**, 1035-1046.
- Fletcher, S.P. and Jackson, R.J. (2002) Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function. *J Virol*, **76**, 5024-5033.
- 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)**, 1295-1303.
- Fritzemeier, J., Greiser-Wilke, I., Haas, L., Pituco, E., Moennig, V. and Liess, B. (1995) Experimentally induced "late-onset" mucosal disease - characterization of the cytopathogenic viruses isolated. *Veterinary Microbiology*, **46**, 285-294.
- Frolov, I., McBride, M.S. and Rice, C.M. (1998) cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhoea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *Rna*, **4**, 1418-1435.
- Gaede, W., Gehrman, B. and Korber, R. (2003) [Elimination of persistently BVDV infect animals: efficient herd screening using RT-PCR and antigen ELISA in milk and serum samples]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **116**, 234-239.
- 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**, 255-265.
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Koonin, E.V. and Blinov, V.M. (1989a) N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3889-3897.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1989b) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res*, **17**, 4713-4729.
- Grassmann, C.W., Isken, O. and Behrens, S.E. (1999) Assignment of the Multifunctional NS3 Protein of Bovine Viral Diarrhoea Virus during RNA Replication: an In Vivo and In Vitro Study. *J Virol*, **73**, 9196-9205.

- Grassmann, C.W., Isken, O., Tautz, N. and Behrens, S.E. (2001) Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol*, **75**, 7791-7802.
- Gray, E.W. and Nettleton, P.F. (1987) The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J Gen Virol*, **68 (Pt 9)**, 2339-2346.
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P. and Rowlands, D.J. (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, **535**, 34-38.
- Grummer, B., Bendfeldt, S., Wagner, B. and Greiser-Wilke, I. (2002) Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res*, **90**, 143-153.
- Grummer, B., Grotha, S. and Greiser-Wilke, I. (2004) Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **51**, 427-432.
- Gu, B., Liu, C., Lin-Goerke, J., Maley, D.R., Gutshall, L.L., Feltenberger, C.A. and Del Vecchio, A.M. (2000) The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J Virol*, **74**, 1794-1800.
- Hamblin, C. and Hedger, R.S. (1979) The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea / mucosal disease virus in African wildlife. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **2**, 295-303.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harada, T., Tautz, N. and Thiel, H.-J. (2000) E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol*, **74**, 9498-9506.
- Harlow, E. and Lane, D. (1998) *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J. and Smith, M.H. (1985) The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *Embo J*, **4**, 3021-3024.
- Heinz, F.X., Collett, M.S., Purcell, R.H., Gould, E.A., Houghton, M., Meyers, G., Rice, C.M. and Thiel, H.-J. (2005) Family Flaviviridae. In Ball, L.A., Desselberger, U., Fauquet, C.M., Maniloff, J. and Mayo, M.A. (eds.), *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, pp. 981-998.
- Heinz, F.X., Collett, M.S., Purcell, R.H., Gould, E.A., Howard, C.R., Houghton, M., Moormann, J.M., Rice, C.M. and Thiel, H.-J. (2000) Family Flaviviridae. In M.H.V., R.v., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. (eds.), *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 859-878.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (eds.). (1992) *The ubiquitin system*.
- Hochstrasser, M. (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol*, **2**, E153-157.

- Hoff, H.S. and Donis, R.O. (1997a) Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res*, **49**, 101-113.
- Hoff, H.S. and Donis, R.O. (1997b) Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res*, **49**, 101-113.
- Horner, G.W., Tham, K.M., Orr, D., Ralston, J., Rowe, S. and Houghton, T. (1995) Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet Microbiol*, **43**, 75-84.
- Horzinek, M.C., Maess, J. and Laufs, R. (1971) Studies on the substructure of Togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch. f. d. ges. Virusforschung*, **33**, 306-318.
- Howard, C.J., Brownlie, J. and Clarke, M.C. (1987) Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol*, **19**, 13-21.
- Hughes, L.E., Kershaw, G.F. and Shaw, I.G. (1959) "B" or "Border Disease". An undiscrbed disease of sheep. *Vet. Rec.*, **71**, 113-317.
- Hulst, M.M. and Moormann, R.J. (2001) Erns protein of pestiviruses. *Methods Enzymol*, **342**, 431-440.
- Hulst, M.M., Westra, D.F., Wensvoort, G. and Moormann, R.J. (1993) Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol*, **67**, 5435-5442.
- Iqbal, M., Flick-Smith, H. and McCauley, J.W. (2000) Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol*, **81**, 451-459.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S. and McCauley, J.W. (2004) Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol*, **78**, 136-145.
- Jentsch, S. (ed.). (1992) *The ubiquitin-conjugating system*.
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol*, **10**, 335-342.
- Jonnalagadda, S., Butt, T.R., Monia, B.P., Mirabelli, C.K., Gotlib, L., Ecker, D.J. and Crooke, S.T. (1989) Multiple (α-NH₂-ubiquitin) protein endoproteases in cells. *J Biol Chem*, **264**, 10637-10642.
- Kao, C.C., Del Vecchio, A.M. and Zong, W. (1999) De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant Flaviviridae RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, **253**, 1-7.
- Kelley, W.L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci*, **23**, 222-227.
- Kräusslich, H.G. and Wimmer, E. (1988) Viral proteinases. *Annu Rev Biochem*, **57**, 701-754.
- Krey, T., Thiel, H.J. and Rumenapf, T. (2005) Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol*, **79**, 4191-4200.
- Kümmerer, B., Stoll, D. and Meyers, G. (1998) Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J Virol*, **72**, 4127-4138.

- Kümmerer, B.M. and Meyers, G. (2000) Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol*, **74**, 390-400.
- Kümmerer, B.M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. and Meyers, G. (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol*, **77**, 117-128.
- Lackner, T., Müller, A., König, M., Thiel, H.-J. and Tautz, N. (2005) Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol*.
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.J., Gorbalenya, A.E. and Tautz, N. (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol*, **78**, 10765-10775.
- Lambot, M., Hanon, E., Lecomte, C., Hamers, C., Letesson, J.J. and Pastoret, P.P. (1998) Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol*, **79**, 1745-1749.
- Langedijk, J.P. (2002) Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem*, **277**, 5308-5314.
- Laude, H. (1977) Improved method for the purification of hog cholera virus grown in tissue culture. *Arch Virol*, **54**, 41-51.
- Leary, T.P., Muerhoff, A.S., Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Desai, S.M. and Mushahwar, I.K. (1996) Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol*, **48**, 60-67.
- Liebler-Tenorio, E.M., Greiser-Wilke, I. and Pohlenz, J.F. (1997) Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch Virol*, **142**, 1613-1634.
- Liebler-Tenorio, E.M., Ridpath, J.E. and Neill, J.D. (2004) Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, **16**, 388-396.
- Liebler, E.M., Waschbusch, J., Pohlenz, J.F., Moennig, V. and Liess, B. (1991) Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol Suppl*, **3**, 109-124.
- Liess, B. (1967) Die ätiologische Abgrenzung selbständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im sogenannten "Mucosal Disease Komplex" bei Rindern. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **74**, 46-49.
- Liess, B., Frey, H.R., Kittsteiner, H., Baumann, F. and Neumann, W. (1974) [Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a "slow virus infection"]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **81**, 481-487.
- Liess, B., Frey, H.R., Trautwein, G. and Peters, W. (1987) [Frequency of appearance of persistent BVD virus infections and their effects on the cattle population]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **94**, 583-585.
- Lin, C., Lindenbach, B.D., Prágal, B.M., McCourt, D.W. and Rice, C.M. (1994) Processing in the Hepatitis C Virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2- specific products with different C termini. *J Virol*, **68**, 5063-5073.

- Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2001) Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, New York, Vol. 1, pp. 991-1042.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110-113.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J. and Rümenapf, T. (2004) CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol*, **78**, 1792-1799.
- Mayer, A.N. and Wilkinson, K.D. (1989) Detection, resolution, and nomenclature of multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochemistry*, **28**, 166-172.
- McClurkin, A.W., Bolin, S.R. and Coria, M.F. (1985) Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*, **186**, 568-569.
- McGoldrick, A., Lowings, J.P., Iyata, G., Sands, J.J., Belak, S. and Paton, D.J. (1998) A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *J Virol Methods*, **72**, 125-135.
- McKercher, D.G., Saito, J.K., Crenshaw, G.L. and Bushnell, R.B. (1968) Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc*, **152**, 1621-1624.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M.S. and Rice, C.M. (1998) Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J Virol*, **72**, 4737-4745.
- Meyer, C., Von Freyburg, M., Elbers, K. and Meyers, G. (2002) Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J Virol*, **76**, 8494-8503.
- Meyers, G., Rümenapf, T., Tautz, N., Dubovi, E. and Thiel, H.-J. (1991a) Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol*, **Suppl. 3**, 133-142.
- Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1989a) Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, **171**, 555-567.
- Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1989b) Ubiquitin in a togavirus. *Nature*, **341**, 491.
- Meyers, G., Saalmüller, A. and Büttner, M. (1999) Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol*, **73**, 10224-10235.
- Meyers, G., Stoll, D. and Gunn, M. (1998) Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle. *J Virol*, **72**, 4139-4148.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. and Kümmerer, B. (1996) Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J Virol*, **70**, 8606-8613.
- Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E.J. and Thiel, H.-J. (1991b) Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology*, **180**, 602-616.

- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E.J., Collett, M.S. and Thiel, H.-J. (1992) Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, **191**, 368-386.
- Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1996) Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in virus research*, **47**.
- Moennig, V., Frey, H.-R., Liebler, E., Polenz, P. and Liess, B. (1990) Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet Rec*, **127**, 200-203.
- Moennig, V. and Greiser-Wilke, I. (2003) [Perspectives on BVD eradication in Germany]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **116**, 222-226.
- Moennig, V., Greiser-Wilke, I., Frey, H.R., Haas, L., Liebler, E., Pohlenz, J. and Liess, B. (1993) Prolonged persistence of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus (BVDV) in a persistently viremic cattle. *Zentralbl Veterinarmed [B]*, **40**, 371-377.
- Moennig, V. and Plagemann, P.G.W. (1992) The pestiviruses. *Adv Vir Res*, **41**, 53-98.
- Moormann, R.J.M., Warmerdam, P.A.M., Van der Meer, B., Schaaper, W.M.M., Wensvoort, G. and Hulst, M.M. (1990) Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain brescia and mapping of the genomic region encoding envelope glycoprotein E1. *Virology*, **177**, 184-198.
- Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Dawson, G.J., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Schlauder, G.G., Desai, S.M. and Mushahwar, I.K. (1995) Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol*, **69**, 5621-5630.
- Müller, A., Rinck, G., Thiel, H.-J. and Tautz, N. (2003) Cell-derived sequences in the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J Virol*, **77**, 10663-10669.
- Myers, T.M., Kolupaeva, V.G., Mendez, E., Baginski, S.G., Frolov, I., Hellen, C.U. and Rice, C.M. (2001) Efficient translation initiation is required for replication of bovine viral diarrhoea virus subgenomic replicons. *J Virol*, **75**, 4226-4238.
- Nagai, M., Sakoda, Y., Mori, M., Hayashi, M., Kida, H. and Akashi, H. (2003) Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol*, **84**, 447-452.
- Nettleton, P.F. (1990) Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, **9**, 131-150.
- Nettleton, P.F., Gilmour, J.S., Herring, J.A. and Sinclair, J.A. (1992) The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **15**, 179-188.
- Olafson, P., MacCullum, A.D. and Fox, F.H. (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, **36**, 205-213.
- Paton, D.J., Sands, J.J., Lowings, J.P., Smith, J.E., Ibata, G. and Edwards, S. (1995) A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet Res*, **26**, 92-109.
- Patterson, B. and Guthrie, C. (1987) An essential yeast snRNA with a U5-like domain is required for splicing in vivo. *Cell*, **49**, 613-624.

- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B. and Zitzmann, N. (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6104-6108.
- Pellerin, C., Moir, S., Lecomte, J. and Tijssen, P. (1995) Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhea viruses. *Vet Microbiol*, **45**, 45-47.
- Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J. and Tijssen, P. (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, **203**, 260-268.
- Pestova, T.V. and Hellen, C.U. (1999) Internal initiation of translation of bovine viral diarrhea virus RNA. *Virology*, **258**, 249-256.
- Pocock, D.H., Howard, C.J., Clarke, M.C. and Brownlie, J. (1987) Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol*, **94**, 43-53.
- Poole, T.L., Wang, C., Popp, R.A., Potgieter, L.N.D., Siddiqui, A. and Collett, M.S. (1995) Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, **206**, 750-754.
- Potgieter, L.N.D., McCracken, M.D., Hopkins, F.M. and Guy, J.S. (1985) Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 151-153.
- Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G.D. and Gage, P.W. (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett*, **557**, 99-103.
- Purchio, A.F., Larson, R. and Collett, M.S. (1984) Characterization of bovine viral diarrhea viral proteins. *J Virol*, **50**, 666-669.
- Qi, F., Ridpath, J.F. and Berry, E.S. (1998) Insertion of a bovine SMT3B gene in NS4B and duplication of NS3 in a bovine viral diarrhea virus genome correlated with the cytopathogenicity of the virus. *Virus Res*, **57**, 1-9.
- Qu, L., McMullan, L.K. and Rice, C.M. (2001) Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol*, **75**, 10651-10662.
- Ramsey, F.K. and Chivers, W.H. (1953) Mucosal disease of cattle. *North Am Vet*, **34**, 629-633.
- Rebhuhn, W.C., French, T.W., Perdrizet, J.A., Dubovi, E.J., Dill, S.G. and Karcher, L.F. (1989) Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med*, **3**, 42-46.
- Rechsteiner, M. (ed.). (1987) *Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis*.
- Redmann, K.L. and Rechsteiner, M. (1989) Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature*, **338**, 438-440.
- Renard, A., Dino, D. and Martial, J. (1987) Vaccines and diagnostics derived from bovine diarrhea virus. *European patent Application number 86870095.6*, publication number 02.08672.
- Rice, C.M. (1996) In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, pp. 933-959.
- Ridpath, F.F., Bolin, S.R. and Dubovi, E.J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, **205**, 66-74.

- Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. (1995a) Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*, **212**, 259-262.
- Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. (1995b) The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: Detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, **212**, 39-46.
- Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. (1997) Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res*, **50**, 237-243.
- Ridpath, J.F., Hietala, S.K., Sorden, S. and Neill, J.D. (2002) Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections. *J Vet Diagn Invest*, **14**, 303-307.
- Ridpath, J.F. and Neill, J.D. (2000) Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhoea viruses. *J Virol*, **74**, 8771-8774.
- Rijnbrand, R., v.d. Straaten, T., v. Rijn, P.A., Spaan, W.J.M. and Breedenbeek, P.J. (1997) Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol*, **71**, 451-457.
- Rinck, G. (2002) Prozessierung des Polyproteins zytopathogener Pestiviren: Funktion einer zellulären Insertion. *Institut für Virologie (FB10)*. Justus-Liebig-Universität, Giessen, p. 155.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H.-J. and Tautz, N. (2001) A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J Virol*, **75**, 9470-9482.
- Rossmann, W., Vilcek, S., Wenzl, H., Rossmann, E., Loitsch, A., Durkovic, B., Strojny, L. and Paton, D.J. (2001) Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. *Vet Microbiol*, **81**, 207-218.
- Roux, L., Simon, A.E. and Holland, J.J. (1991) Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Adv virus res*, **40**, 181-211.
- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M. and Thiel, H.-J. (1998) N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol*, **72**, 2544-2547.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1991) Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol*, **65**, 589-597.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H. and Thiel, H.-J. (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol*, **67**, 3288-3295.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11646-11651.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.

- Schägger, H. and Jagow, G.v. (1987) Tricine- sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schelp, C. and Greiser-Wilke, I. (2003) [BVD diagnosis: an overview]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **116**, 227-233.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. and Thiel, H.-J. (1993) Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science*, **261**, 1169-1171.
- Schweizer, M. and Peterhans, E. (1999) Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol*, **80 (Pt 5)**, 1147-1155.
- Schweizer, M. and Peterhans, E. (2001) Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol*, **75**, 4692-4698.
- Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Leary, T.P., Dawson, G.H., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Muerhoff, A.S., Erker, J.C., Buijk, S.L., Chalmers, M.L., vanSant, C.L. and Mushahwar, I.K. (1995) Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 3401-3405.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. and Williams, B.R. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-839.
- Stapleton, J.T. (2003) GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin Liver Dis*, **23**, 137-148.
- Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. (1993) Processing of pestivirus polyprotein: Cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol*, **67**, 7088-7095.
- Steffens, S., Thiel, H.-J. and Behrens, S.-E. (1999) The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol*, **80**, 2583-2590.
- Sutter, G., Ohlmann, M. and Erfle, V. (1995) Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Letters*, **371**, 9-12.
- Tamura, J.K., Warrenner, P. and Collett, M.S. (1993) RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*, **193**, 1-10.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1997) Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol*, **71**, 5415-5422.
- Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S.E. and Thiel, H.-J. (1999) Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J Virol*, **73**, 9422-9432.
- Tautz, N., Kaiser, A. and Thiel, H.-J. (2000) NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology*, **273**, 351-363.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E.J. and Thiel, H.-J. (1996) Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27 nucleotide insertion. *J Virol*, **70**, 7851-7858.
- Tautz, N., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1993) Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology*, **197**, 74-85.

- Tautz, N. and Thiel, H.-J. (2003) Cytopathogenicity of pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhoea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication. *Arch Virol*, **148**, 1405-1412.
- Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E.J. and Meyers, G. (1994) Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by internal deletion. *J Virol*, **68**, 3289-3297.
- Thiel, H.-J., Meyers, G., Stark, R., Tautz, N., Rümenapf, T., Unger, G. and Conzelmann, K.-K. (1993) Molecular characterization of positive-strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol*, **Suppl. 7**, 41-52.
- Thiel, H.-J., Plagemann, P.G.W. and Moennig, V. (1996) Pestiviruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, New York, Vol. 1, pp. 1059-1073.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T. and Meyers, G. (1991) Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*, **65**, 4705-4712.
- Tratschin, J.D., Moser, C., Ruggli, N. and Hofmann, M.A. (1998) Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture. *J Virol*, **72**, 7681-7684.
- Tsukiyama-Kohara, K., Hzuka, N., Kohara, M. and Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **66**, 1476-1483.
- van Oirschot, J.T. (1992) In Lerman (ed.), *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 274-285.
- van Oirschot, J.T., Brusckhe, C.J. and van Rijn, P.A. (1999) Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol*, **64**, 169-183.
- van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. and Moormann, R. (1991) Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol*, **65**, 2761-2765.
- Vantsis, J.T., Barlow, R.M., Fraser, J., Rennie, J.C. and Mould, D.L. (1976) Experiments in border disease. VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J Comp Path*, **86**, 111-120.
- Vassilev, V.B., Collett, M.S. and Donis, R.O. (1997) Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhoea virus that yield infectious transcripts. *J Virol*, **71**, 471-478.
- Vassilev, V.B. and Donis, R.O. (2000) Bovine viral diarrhoea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res*, **69**, 95-107.
- Vilcek, S., Greiser-Wilke, I., Nettleton, P. and Paton, D.J. (2000) Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet Microbiol*, **77**, 129-136.
- Wada, H., Kito, K., Caskey, L.S., Yeh, E.T. and Kamitani, T. (1998) Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**, 688-692.
- Warrener, P. and Collett, M.S. (1995) Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol*, **69**, 1720-1726.

- Weiland, S., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. and Thiel, H.-J. (1992) A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol*, **66**, 3677-3682.
- Weiland, S., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1990) Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J Virol*, **64**, 3563-3569.
- Wensvoort, G. and Terpstra, C. (1985) [Swine fever: a changing clinical picture]. *Tijdschr Diergeneeskd*, **110**, 263-269.
- Westaway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich, S., Horzinek, M.C., Igarashi, A., Kaariainen, L., Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russell, P.K. and Trent, D.W. (1985) Togaviridae. *Intervirology*, **24**, 125-139.
- Wilhelmsen, C.L., Bolin, S.R., Ridpath, J.F., Chevillie, N.F. and Kluge, J.P. (1991) Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea. *Am J Vet Res*, **52**, 269-275.
- Williams, C.F., Klinzman, D., Yamashita, T.E., Xiang, J., Polgreen, P.M., Rinaldo, C., Liu, C., Phair, J., Margolick, J.B., Zdunek, D., Hess, G. and Stapleton, J.T. (2004) Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N Engl J Med*, **350**, 981-990.
- Windisch, J.M., Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1996) RNase of Classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol*, **70**, 352-358.
- Wiskerchen, M., Belzer, S.K. and Collett, M.S. (1991) Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol*, **65**, 4508-4514.
- Wiskerchen, M. and Collett, M.S. (1991) Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, **184**, 341-350.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P.R., Lin, C., Murcko, M.A., Collett, M.S. and Rice, C.M. (1997) Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol*, **71**, 5312-5322.
- Yeh, E.T., Gong, L. and Kamitani, T. (2000) Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene*, **248**, 1-14.
- Yu, H., Grassmann, C.W. and Behrens, S.E. (1999) Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J Virol*, **73**, 3638-3648.
- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C.W. and Behrens, S.E. (2000) A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol*, **74**, 5825-5835.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M.C. and McCauley, J.W. (1996) Cell death induced by cytopathic bovine diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol*, **77**, 1677-1681.
- Zhong, W., Gutshall, L.L. and Del Vecchio, A.M. (1998) Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, **72**, 9365-9369.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

- Prof. Dr. H.-J. Thiel, der diese Arbeit ermöglichte und sich viel Zeit für Gespräche sowie für die rasche Korrektur meiner Arbeit nahm.
- Dr. Norbert Tautz, der mir das spannende Thema gab und mir jederzeit mit Rat und Tat, guten Ideen, Motivation und Begeisterung für die Forschung weiterhalf.
- der gesamten „Arbeitsgruppe Tautz“, wo ich mich dank der entspannten Arbeitsatmosphäre immer sehr wohl gefühlt habe: Tobias, Erik und Deborah für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft, Sylvaine zusätzlich für das Übernehmen von wichtigen Versuchsschritten zu „nachtschlafender“ Zeit.
- Dr. Matthias König für seine Hilfe beim Erlernen und Anwenden der Realtime-PCR-Technik.
- allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft.
- Kanokporn Triwityakorn (Tik), die als Gastwissenschaftlerin in unserem Labor meine siRNA-Experimente tatkräftig unterstützte und mir half, meine Englisch-Kenntnisse zu verbessern.
- dem Graduiertenkolleg 455 und dem SFB 535 für die finanzielle Unterstützung und viele interessante Praktika und Seminare.
- Dr. A. Herken, da ich ohne ihn heute vermutlich keine Tierärztin wäre.

Traditionell am Schluss aber umso wichtiger gilt mein Dank meiner Familie, der ich diese Arbeit widmen möchte; insbesondere meinen Eltern, die den Grundstein dafür gelegt haben, dass diese Arbeit entstehen konnte, indem sie schon früh meine Freude am Lernen förderten und mich nicht nur im Studium in jeder erdenklichen Weise unterstützten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

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

ISBN 3-89687-291-5

