

UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE ZELLULÄRER
PROTEINE BEI DER PROZESSIERUNG DES
PESTIVIRENEN NICHTSTRUKTURPROTEINS
NS2-3 UND DESSEN BEDEUTUNG FÜR
REPLIKATION UND VIRIONMORPHOGENESE

ERIK LATTWEIN

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 2009

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 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Norbert Tautz

**Untersuchungen zur Rolle zellulärer Proteine bei der Prozessierung
des pestiviralen Nichtstrukturproteins NS2-3 und dessen
Bedeutung für Replikation und Virionmorphogenese**

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

eingereicht von

Erik Lattwein

Tierarzt aus Lebach

Gießen 2009

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. N. Tautz

Prof. Dr. Ch. Greveling

Tag der Disputation:

16.06.2009

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.



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

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3	EINLEITUNG	9
3.1	DIE FAMILIE <i>FLAVIVIRIDAE</i>	9
3.2	PESTIVIREN	10
3.2.1	Taxonomie	10
3.2.2	Eigenschaften von Pestiviren.....	11
3.2.3	Infektionen durch Pestiviren.....	11
3.3	BOVINE VIRUSDIARRHÖ UND MUCOSAL DISEASE (BVD/MD).....	14
3.3.1	Bedeutung	14
3.3.2	Pathogenese.....	15
3.3.3	Diagnostik	18
3.3.4	Bekämpfung.....	20
3.4	REPLIKATION VON PESTIVIREN.....	22
3.4.1	Invasion der Zelle	22
3.4.2	Genom und Polyprotein	22
3.4.3	Virale Strukturproteine	25
3.4.4	Virale Nichtstrukturproteine.....	27
3.4.5	Virionmorphogenese.....	32
3.5	GRUNDLAGEN DER ZYTOPATHOGENITÄT	33
3.5.1	Zytopathogene Pestiviren mit Insertionen zwischen NS2 und NS3	34
3.5.2	Zytopathogene Pestiviren mit Duplikationen oder Deletionen.....	37
3.5.3	Zytopathogene Pestiviren mit Mutationen im NS2	38
3.5.4	Zytopathogene Pestiviren mit Jiv-Insertionen	39
3.6	DAS JIV-PROTEIN.....	41
3.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	44
4	MATERIAL UND METHODEN	46

Inhaltsverzeichnis

4.1	MATERIAL	46
4.1.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	46
4.1.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	48
4.1.3	Verwendete Geräte	48
4.1.4	Verwendete Enzyme	49
4.1.5	Verwendete Kits	50
4.1.6	Verwendete Antikörper	50
4.1.7	Verwendete Basis-Plasmide	51
4.1.8	Verwendete PCR-Primer	51
4.1.8.1	<i>NCP7/Osloss Virus-Chimäre</i>	51
4.1.8.2	<i>Jiv Expressionskonstrukte</i>	53
4.1.8.3	<i>NS2 Expressionskonstrukte</i>	54
4.1.8.4	<i>IR-Primer</i>	54
4.1.9	Verwendete Jiv-Expressionsplasmide	55
4.1.9.1	<i>Expression in E. coli</i>	55
4.1.9.2	<i>Expression in BHK-21</i>	55
4.1.10	Verwendete NS2-Expressionsplasmide	56
4.1.11	Verwendete Gesamtklone	56
4.1.12	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	56
4.1.13	Verwendete eukaryontische Zellen	56
4.1.14	Verwendete Viren	56
4.1.15	Verwendete Lösungen und Puffer	57
4.2	METHODEN	59
4.2.1	Arbeiten mit DNA	59
4.2.1.1	<i>Herstellung kompetenter Bakterien</i>	59
4.2.1.2	<i>Glycerinkultur von Bakterien</i>	59
4.2.1.3	<i>Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen</i>	59
4.2.1.4	<i>Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen und Konzentrationsbestimmung</i>	60
4.2.1.5	<i>Restriktionsenzym-Verdau und Klonierungstechniken</i>	61
4.2.1.6	<i>Agarosegel-Elektrophorese von DNA und Isolation von DNA Fragmenten</i>	63
4.2.1.7	<i>Ligation und Transformation in E. coli</i>	64
4.2.1.8	<i>PCR und RT-PCR</i>	64

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.9	<i>Gerichtete Mutagenese</i>	68
4.2.1.10	<i>DNA-Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen</i>	69
4.2.1.11	<i>Bestimmung der Nukleotidsequenz des chimären Virus</i>	71
4.2.2	<i>Arbeiten mit RNA</i>	72
4.2.2.1	<i>In vitro Transkription</i>	72
4.2.2.2	<i>RNA-Isolierung aus Zellen</i>	72
4.2.3	<i>Arbeiten mit Proteinen</i>	74
4.2.3.1	<i>Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine</i>	74
4.2.3.2	<i>Expression, Aufreinigung und Spaltung mit der TEV-Protease</i>	76
4.2.3.3	<i>Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen</i>	77
4.2.3.4	<i>SDS-PAGE</i>	78
4.2.3.5	<i>Silberfärbung</i>	78
4.2.3.6	<i>Western Blot</i>	79
4.2.3.7	<i>Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper (mAk)</i>	80
4.2.4	<i>Arbeiten mit Zellen</i>	81
4.2.4.1	<i>Allgemeine Zellkultur-Techniken</i>	81
4.2.4.2	<i>Kryokonservierung von Zellen</i>	82
4.2.4.3	<i>T7-Vaccinia-Expression</i>	82
4.2.4.4	<i>Infektion von MDBK Zellen</i>	83
4.2.4.5	<i>Elektroporation von MDBK Zellen</i>	84
4.2.4.6	<i>Immunfluoreszenz</i>	85
4.2.4.7	<i>Bestimmung des Virus-Titers von Zellkulturüberständen</i>	85
4.2.4.8	<i>Plaquereinigung</i>	86
4.2.5	<i>Produktion monoklonaler Antikörper</i>	87
4.2.5.1	<i>Immunisierung von Mäusen</i>	87
4.2.5.2	<i>Gewinnung und Ausplattierung von Feeder-Zellen</i>	87
4.2.5.3	<i>Gewinnung der Splenozyten (Milzzellen)</i>	88
4.2.5.4	<i>Fusion von Splenozyten und Myelomzellen</i>	89
4.2.5.5	<i>Selektion von Hybridomzellen</i>	89
4.2.5.6	<i>Screening von Hybridomzellen</i>	89
4.2.5.7	<i>Klonierung positiver Hybridome</i>	91
4.2.5.8	<i>Gewinnung der mAk</i>	91
4.2.5.9	<i>Isotypisierung der mAk</i>	92
4.2.5.10	<i>Bestimmung des Epitops</i>	92
5	ERGEBNISSE	93

Inhaltsverzeichnis

5.1	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>E. COLI</i>	93
5.1.1	Expression und Reinigung von Jiv	93
5.1.2	Expression und Reinigung von NS2	100
5.2	HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER	103
5.3	ERZEUGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES CHIMÄREN VIRUS MIT EINER UBIQUITIN-INSERTION ZWISCHEN NS2 UND NS3	108
6	DISKUSSION.....	116
6.1	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>E. COLI</i>	116
6.1.1	Expression und Reinigung von Jiv	116
6.1.2	Expression und Reinigung von NS2	117
6.2	HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER	118
6.3	ERZEUGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES CHIMÄREN VIRUS MIT EINER UBIQUITIN-INSERTION ZWISCHEN NS2 UND NS3	119
7	ZUSAMMENFASSUNG	126
8	SUMMARY.....	128
9	LITERATURVERZEICHNIS	130
10	DANKSAGUNG.....	145

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-21	"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
CIP	"calf intestine phosphatase", alkalische Phosphatase
CSFV	Virus der klassischen Schweinepest
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Cyanogen 3
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	Dimethylsulphoxid
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
E	"Envelope protein"; Hüllprotein in der Virusmembran
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
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
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm; Erdbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

G	Guanosin
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
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
Hcc	"hepatocellular carcinoma", hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
His	Histidin
HSP	"heat shock protein", Hitzeschockprotein
HT	Hypoxanthin, Thymidin
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IMAC	"immobilized metal affinity purification"
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
IRD800	"Infrared Dye" 800
IRES	"internal ribosome entry site", interne Ribosomeneintrittsstelle
Jiv	"J-domain protein interacting with viral protein"
JivX	X Aminosäuren-Fragment des zellulären Jiv
kb	Kilobasen
kD	kDa, Kilo-Dalton, Einheit der Proteinmasse
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LC-3	"light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B"
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LEW	Lysis, Equilibration, Wash
LMA	Low Melting Agarose
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
Mistic	Membrane Integrating Sequence for Translation of Integral Membrane Protein Constructs
MOI	"multiplicity of infection", Anzahl infektiöser Viren pro Zelle
mRNA	"messenger-RNA"
n	nano (10^{-9})
NADL	"National Animal Disease Laboratory"
NEDD8	"neural precursor cell-expressed developmentally downregulated" 8
Ni	Nickel
N ^{pro}	N-terminale Protease
NS	Nichtstrukturprotein

Abkürzungsverzeichnis

nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	nicht-translatierte Region einer RNA
nzp	nicht zytopathogen
OD _x	optische Dichte bei "x" nm Wellenlänge
ORF	"open reading frame", offenes Leseraster
Osl	BVDV-1 Stamm Osloss
p	pico (10 ⁻¹²)
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	"phosphate buffered saline", phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	"post infectionem", nach der Infektion
PI	persistent infiziert
PNK	Polynukleotidkinase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QC	QuikChange®, Methode zur gerichteten DNA-Mutagenese
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
rpm	"rotation per minute", Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SMT3B	suppressor of MIF2 mutation 3B
s.o.	siehe oben
ssRNA	"single-stranded RNA", Einzelstrang-RNA
s.u.	siehe unten
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TEV	Tobacco Etch Virus
Tf	Trigger Factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TRE	"tetracyclin responsive element"
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	"transfer-RNA"
TSP	"transferable surface plate"
U	Unit (Enzymeinheit); Uridin (nt)
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UCH	"ubiquitin-C-terminal hydrolase"
usw.	und so weiter
UV	ultraviolette elektromagnetische Strahlung

Abkürzungsverzeichnis

V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
W	Watt
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*

Die Einteilung von Viren in unterschiedliche Familien erfolgt aufgrund verschiedener Hauptkriterien, die vor allem den Genomaufbau betreffen (DNA oder RNA, einzelsträngig oder doppelsträngig, positive oder negative Strangorientierung, kontinuierlich oder segmentiert, Anordnung der Gene). Daneben sind auch die Form der Viruspartikel (Kapside) sowie das Vorhandensein oder Fehlen einer Lipidhülle Kriterien für die Zuordnung von Viren. 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* (Heinz et al., 2005) haben im Wesentlichen folgende 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). 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 Virus-kodierte Glykoproteine eingelagert sind.

Die Viren der Familie *Flaviviridae* werden drei verschiedenen Genera zugeordnet: *Flavivirus*, *Hepacivirus* und *Pestivirus*.

Zum Genus *Flavivirus* gehören unter anderem das namensgebende Gelbfiebervirus sowie das Frühsommermeningoenzephalitis(FSME)-Virus, das Dengue-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 nachfolgend 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 und einer gesteigerten Effektivität antiretroviraler Therapie verbunden. In Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, dass GBV-C die Replikation von HIV hemmt, vermutlich durch eine Verhinderung des Eintritts in die Zelle (Reshetnyak et al., 2008; George und Varmaz, 2005; Williams et al., 2004).

3.2 Pestiviren

3.2.1 Taxonomie

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

- 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)

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). Sequenzvergleiche und serologische Untersuchungen sprechen eher für eine Klassifizierung als eigenständige Spezies (Avalos-Ramirez et al., 2001).

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. Außerdem konnten die Verwandtschaftsgrade der Virusspezies untereinander besser untersucht werden. Auf dieser Grundlage werden die Pestiviren heute der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet (Heinz et al., 2005), 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). Bis zur Etablierung eines effektiven HCV-Zellkultursystems (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005) wurden 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 Zellkulturen 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, 1997; Schweizer und Peterhans, 1999; Zhang et al., 1996). Es zeigt sich ein deutlicher zytopathischer Effekt (Corapi et al., 1988; Hoff und Donis, 1997; Lambot et al., 1998; Pocock et al., 1987; Purchio et al., 1984; Schweizer und Peterhans, 2001; Vassilev und Donis, 2000; Zhang et al., 1996). Es kommt zur Vakuolisierung und Abkugelung der Zellen, die sich schließlich aus dem Zellverband lösen. Im Gegensatz dazu verursachen nzp Viren in infizierten Rinderzellkulturen keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen.

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^{ms} und E2 konnten mittels Immun-Elektronenmikroskopie auf der Oberfläche der Virionen nachgewiesen werden (Weiland et al., 1992; Weiland et al., 1990).

3.2.3 Infektionen durch Pestiviren

Pestiviren verursachen wirtschaftlich bedeutende Krankheiten bei Schweinen und verschiedenen Hauswiederkäuerarten, sowie bei Wildwiederkäuern. Klassische Schweinepest und Bovine Virusdiarrhö / Mucosal Disease gehören heute zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen.

Einleitung

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; Vilcek und Nettleton, 2006). BDV wurde nicht nur aus Schafen, sondern auch aus Schweinen isoliert (Becher et al., 1999b; Becher et al., 1997).

Wird ein trächtiges Wirtstier mit Pestiviren infiziert, können diese die Plazentarschranke überwinden und den Embryo oder Fötus infizieren (Moennig und Plagemann, 1992; Thiel et al., 1996). Maternale Antikörper können diese Barriere aufgrund des Aufbaus der Plazenta bei Wiederkäuern und Schweinen (*Placenta Epitheliochorialis*) nicht überwinden. Der Zeitpunkt der diaplazentaren Infektion des Embryos oder Fötus 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 Fötus 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 aber die Infektion mit einem nzp Virus zu einem früheren Zeitpunkt (beim Rind etwa zwischen dem 40. und dem 125. Tag der Trächtigkeit) statt, ist das Immunsystem des Fötus 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 lebenslang 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

Einleitung

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 so genannten 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).

Die Krankheiten im Einzelnen:

Die **klassische Schweinepest** (KSP) oder europäische Schweinepest (ESP), verursacht durch das CSFV (*classical swine fever virus*; auch: *hog cholera virus*), trat 1833 in Amerika als erste durch Pestiviren ausgelöste Erkrankung in Erscheinung. Sie 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 Organe 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.

Die **Border Disease der Schafe** (BD) wurde erst wesentlich später zum ersten Mal beschrieben (Hughes et al., 1959). Die Krankheitsbezeichnung ist darauf zurückzuführen, dass die durch BDV verursachte Erkrankung erstmals an der Grenze zwischen England und Wales auftrat. BDV ist heute weltweit verbreitet und hat in Ländern mit intensiver Schafhaltung wirtschaftliche Relevanz. Die Krankheit wird auch als „hairy shaker disease“ bezeichnet, da bei neugeborenen Lämmern infolge diaplazentarer Infektion Symptome wie Zittern, Ataxie und Veränderungen des Haarkleides 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 und zur Geburt von persistent infizierten Tieren führen (García-Pérez et al., 2009; Nettleton et al., 1998). Auch ein MD-ähnliches Krankheitsbild wurde bei Schafen beobachtet (Barlow et al., 1983).

Die durch BVDV ausgelösten Rinderkrankheiten **Bovine Virusdiarrhö** und **Mucosal Disease** (BVD/MD) wurden 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). Auf sie wird nachfolgend noch einmal ausführlicher eingegangen.

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 - 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, Büffeln, Yaks, Kleinkantschilen, Alpakas, dem Japanischen Serau sowie in Schweinen nachgewiesen werden (Barnett et al., 2008; Becher et al., 1999a; Becher et al., 1997; Grøndahl et al., 2003; Hamblin und Hedger, 1979; Harasawa et al., 2006; Mishra et al., 2008; 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 v.a. 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

Einleitung

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.

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 Läsionen wie Ulzerationen und Nekrosen der Schleimhäute im gesamten 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 (siehe Abbildung 1). 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; Wilhelmssen 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). In persistent infizierten Rindern kann das persistierende nzp Virus in vielen unterschiedlichen Organen und Geweben gefunden werden, unter anderem in Leukozyten (Bielefeldt Ohmann et al.,

Einleitung

1987), im Verdauungstrakt (Liebler et al., 1991; McClurkin et al., 1985) und im ZNS (Fernandez et al., 1989), jedoch verursacht es keinerlei Läsionen (Liebler-Tenorio et al., 2004) und es scheint immer nur eine begrenzte Anzahl von Zellen infiziert zu sein. Im Intestinaltrakt eines PI-Tieres findet man etwa Virusantigen nur in einigen wenigen Epithelzellen, 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. Mit dem Auftreten des zp Virus, oft erst Monate oder Jahre nach der Infektion mit dem persistierenden nzp Stamm, steigt also die Zahl der infizierten Zellen dramatisch an (Liebler et al., 1991). 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). Das betroffene Tier erkrankt an MD und stirbt innerhalb von zwei Wochen nach dem Einsetzen der ersten Symptome.

Eine Variante der MD ist die so genannte „*late onset*“-Form. Bei den betroffenen Tieren folgt nach dem Auftreten der ersten Symptome zuerst 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.

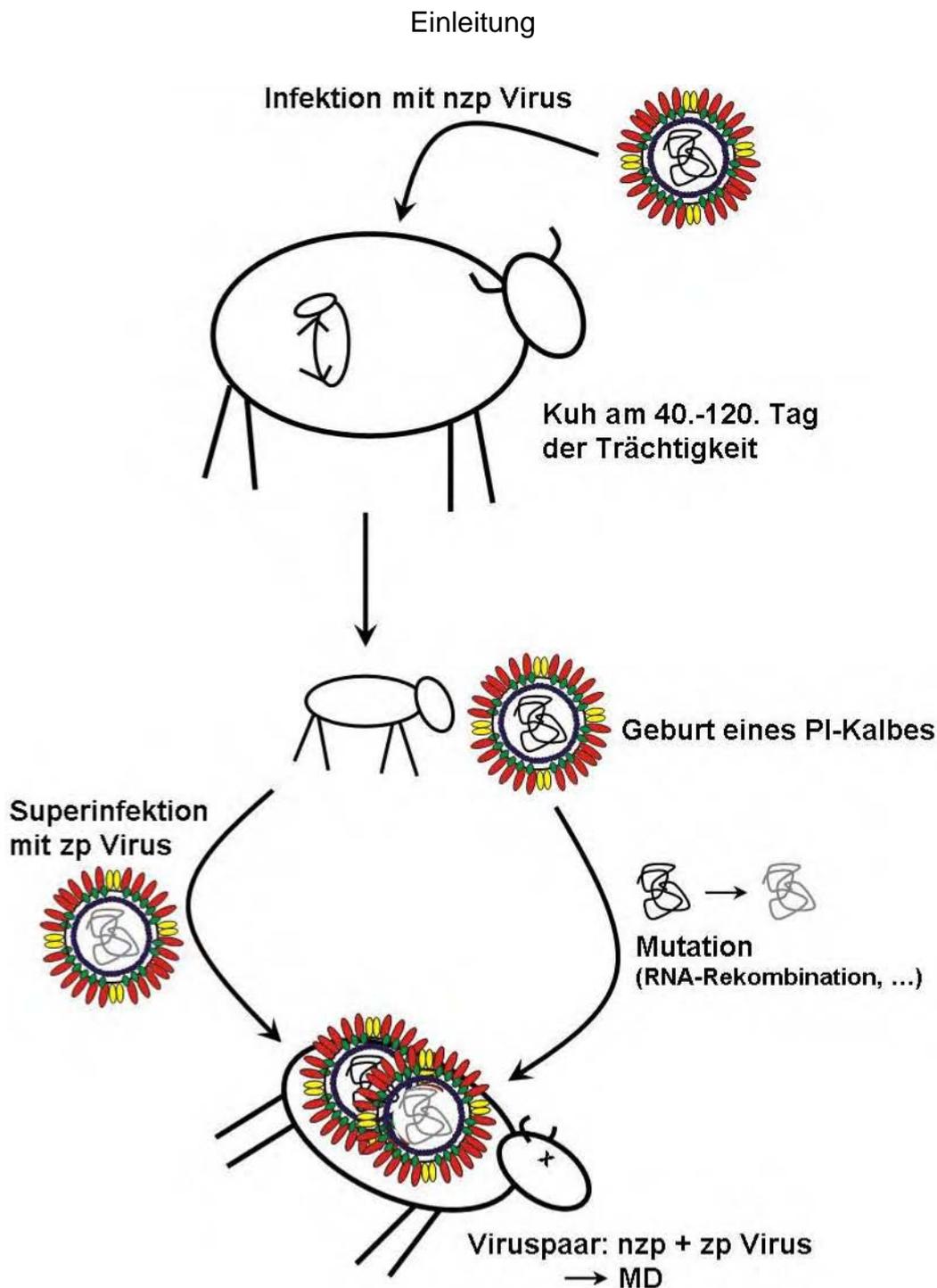


Abbildung 1: Entstehung der Mucosal Disease (MD)

Wird eine trächtige Kuh mit einem nichtzytopathogenen BVD Virus infiziert, so kann es zur diaplazentaren Infektion des Fötus kommen. Geschieht die Infektion zwischen dem 40. und 120. Tag der Trächtigkeit, so kann der Fötus eine spezifische Immuntoleranz gegenüber dem Virus entwickeln und es kommt zur Geburt eines persistent infizierten Kalbes. Das Kalb selbst erkrankt in der Regel nicht, scheidet jedoch Virus aus. Nach meist 0,5 - 2 Jahren entsteht durch Mutationen im Genom des persistierenden Virus ein zp BVDV. Alternativ kann auch eine Superinfektion mit einem dem nzp Virus antigenetisch eng verwandten zp Virus zur Bildung eines Viruspaares im PI-Tier führen. In beiden Fällen kommt es durch das Auftreten des zp Virus zum Ausbruch der Mucosal Disease (MD) und damit zum Tod des Tieres.

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

Einleitung

Nachweis antiviraler Antikörper erfolgen. Im Oktober 2008 wurde eine amtliche Methodensammlung des Friedrich-Loeffler-Instituts im Bundesanzeiger veröffentlicht, welche Verfahren zur Probennahme und Untersuchung auf BVD enthält.

Die höchste Sensitivität und Spezifität unter den indirekten Methoden erreicht der Serumneutralisationstest (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 anschließender Untersuchung auf Virusantigen mittels Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidase-Methoden (Thiel et al., 1996). Außerdem ist die Detektion 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 eines bestimmten viralen Genomfragments in Echtzeit durch computergestützte Messung von Fluoreszenz-Signalen verfolgt werden kann (Bhudevi und Weinstock, 2001; Gaede et al., 2005; McGoldrick et al., 1998).

In den letzten Jahren wurden verstärkt Methoden zum Nachweis von Virus in Hautbiopsien per ELISA, RT-PCR und Immunhistochemie entwickelt (Brodersen, 2004; Cornish et al., 2005; Fulton et al., 2006; Grooms und Keilen, 2002; Kennedy et al., 2006; Njaa et al., 2000). Persistent mit BVDV infizierte Rinder spielen die Hauptrolle bei der Übertragung der Infektion. Die frühzeitige Erkennung und Eliminierung der PI-Tiere haben daher herausragende Bedeutung bei der Bekämpfung der BVD. Bei der BVD-Diagnostik junger Kälber stören kolostrale Antikörper im Blut, da sie zur Maskierung von viralem Antigen und somit zu einer diagnostischen Lücke führen, die je nach verwendetem Testsystem bis zum 60., teils auch bis zum 120. Lebensstag reicht. Die Blutuntersuchung ist daher zumindest für den Antigennachweis kein ideales Instrument. Oberhautpartien enthalten hohe Konzentrationen an BVDV-Antigen aber nur wenig Blut, so dass maternale Antikörper nicht interferieren und die diagnostische Lücke so bei jungen PI-Tieren auf unter 2

Wochen eingeschränkt werden kann. Zudem scheint BVDV-Antigen nur bei persistenten und nicht bei transienten Infektionen in epidermalen Hautstrukturen nachweisbar zu sein (Hilbe et al., 2007), wodurch eine Identifikation von PI-Tieren ermöglicht wird. Ein wichtiger Vorteil von Hautbiopsien ist nicht zuletzt, dass sie einfach als Ohrstanzproben mit dem Einziehen der Ohrmarken im Rahmen der Rinder-Kennzeichnung gemäß der Viehverkehrsverordnung von jedem Kalb gewonnen werden können. Die Untersuchung von Ohrgewebeproben stellt also eine aussichtsreiche Alternative für die bisher praktizierte BVD-Diagnostik dar, insbesondere zur Identifikation von PI-Tieren im Rahmen von Bekämpfungsprogrammen.

3.3.4 Bekämpfung

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 die nun laufenden freiwilligen Bekämpfungsprogramme der einzelnen Bundesländer dienen. Mittlerweile werden in zahlreichen Staaten Programme zur Eradikation der BVD/MD durchgeführt. In der Schweiz läuft seit Frühjahr 2008 ein BVD-Ausrottungsprogramm („Stop BVD“), das im Oktober 2009 abgeschlossen sein soll. In Deutschland wird es erst ab 1. Januar 2011 ein Bekämpfungsprogramm auf staatlicher Ebene geben, wenn die im Dezember 2008 verabschiedete „Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus“ (BVDV-Verordnung) in Kraft tritt.

In den USA wird oft und mit einer Vielzahl an Präparaten geimpft (zur Zeit über 150), allerdings ohne bisher eine Verbesserung der Seuchenlage zu erreichen. In Europa steht man der BVD Impfung etwas zurückhaltender gegenüber. Dies hat einerseits mit der Effizienz und Sicherheit der erhältlichen Impfstoffe zu tun und andererseits mit der oftmals falschen Anwendung derselben. Zudem tritt BVDV in einer Vielzahl von Varianten auf, die sich zum Teil antigenetisch stark unterscheiden. Ein BVD Impfstoff sollte einerseits den Ausbruch einer akuten Erkrankung wirksam unterbinden und andererseits in der Lage sein, intrauterine Infektionen des Fötus sowie Fruchtbarkeitsstörungen zu verhindern. Gelingt ersteres, so ist der Schutz des Fötus zwar vorhanden, keinesfalls aber 100 %ig. Der Schutz vor Fertilitätsstörungen ist ebenfalls unvollständig. Die verwendeten

Einleitung

Lebendvakzinen enthalten zp BVDV und verhindern, dass während der Trächtigkeit geimpfte Mütter persistent infizierte Kälber gebären. Bei PI-Tieren ist eine solche Impfung nicht nur sinnlos, sondern auch riskant, denn sie kann die Mucosal Disease auslösen. Zudem können Lebendvakzinen eine ähnliche immunsuppressive Wirkung haben wie das Feldvirus. Totvakzinen sind sicher in der Anwendung, allerdings sind sie wesentlich weniger wirksam als Lebendvakzinen und der Impfschutz muss häufig erneuert werden (mindestens 2x / Jahr). BVD Vakzinen wirken am besten gegen akute Erkrankungen, welche in 70-90 % der Fälle ohnehin symptomlos ablaufen. Damit erscheint die Impfung nur als zusätzliche Massnahme sinnvoll, um besonders gefährdete Tiere zu schützen. Dazu gehören v.a. Virus- und Antikörper-negative Rinder vor der ersten Belegung, weil eine Infektion dieser Tiere im kritischen Frühstadium der Trächtigkeit zu persistent infizierten Nachkommen führen kann.

Aufgrund ihrer enormen Bedeutung für die Virusverbreitung sind die persistent infizierten Kälber, die über ihre Körpersekrete das Virus lebenslang in großen Mengen ausscheiden, der wichtigste Angriffspunkt im Rahmen der Tierseuchenkämpfung. Etwa 0,1 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 Eliminierung 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 bis zum Inkrafttreten der BVDV-Verordnung 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.

3.4 Replikation von Pestiviren

3.4.1 Invasion der Zelle

Das zelluläre Oberflächenprotein CD46 dient dem BVD-Virus als Rezeptor (Krey et al., 2006; Maurer et al., 2004) und es gibt Hinweise auf die Existenz mindestens eines Co-Rezeptors, der aber bisher nicht identifiziert werden konnte. Nach der Adsorption an die Zelloberfläche gelangt das Virus durch Rezeptor-vermittelte und Clathrin-abhängige Endozytose in die Zelle (Flores et al., 1996; Grummer et al., 2004; Krey et al., 2005; Lecot et al., 2005). Zur Entlassung des Virus aus dem Vesikel (Endosom) wird durch eine H⁺-Ionenpumpe in der Vesikelmembran das Innere des Endosoms 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). Es wird angenommen, dass erst durch das Lösen der Disulfidbindungen zwischen den viralen Glykoproteinen die Fusion der Membranen ermöglicht wird (Krey et al., 2005) und so schließlich das Kapsid ins Zytoplasma gelangt. Über die Freisetzung der RNA aus dem Kapsid ist wenig bekannt.

3.4.2 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). 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). 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). 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.

Einleitung

Die Translation wird durch eine interne Ribosomenbindung an die 5'NTR des viralen Genoms initiiert. Die Länge der 5'NTR beträgt zwischen 380 und 400 nt, innerhalb welcher sich eine besonders gefaltete RNA-Struktur mit zahlreichen AUG-Triplets oberhalb des eigentlichen Start-AUG befindet. 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; Rijnbrand et al., 1997; Pestova und Hellen, 1999; Tautz et al., 1999; Yu et al., 2000; Fletcher und Jackson, 2002). Somit unterscheidet sich die genomische RNA von Pestiviren und HCV bezüglich der Translationsinitiation von der RNA der Flaviviren, deren Translation durch eine *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. Die Länge der 3'NTR bei Pestiviren variiert zwischen 188 und 276 nt (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1998). Beim Alignment pestiviraler 3'NTRs fällt auf, dass die am weitesten 3'-wärts gelegenen 70 Nukleotide innerhalb des Genus hoch konserviert sind. Diese Region wird als „3' conserved“ (3'C)-Region bezeichnet, wohingegen der variable Rest der 3'NTR „3' variable“ (3'V)-Region benannt wird. Durch Sequenzanalysen und Computervorhersagen konnten Modelle für die Sekundärstruktur der 3'NTR von BVDV und KSPV erstellt werden (Deng und Brock, 1993). In dieser Studie wurde die Existenz von drei Stemloopstrukturen vorhergesagt. In neueren Studien konnte durch Verdau mit substratspezifischen RNasen, welche selektiv einzelsträngige RNA verdauen, sowie durch chemische Modifikation einzelsträngiger Sequenzabschnitte mit Agenzien wie Dimethylsulfat die Sekundärstruktur für die 3'NTR des BVDV-Replikons DI9C bestimmt werden (Yu et al., 1999). Dabei konnten 3 Stemloopstrukturen experimentell nachgewiesen werden, welche durch einzelsträngige Sequenzabschnitte voneinander getrennt sind. In Mutagenesestudien konnte durch Transitionen gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur des 3' terminalen Stemloop (SL I) der 3'C Region für die RNA-Replikationsfähigkeit des Replikons DI9C wichtig ist (Yu et al., 1999). Essentielle Sequenzmotive finden sich insbesondere im apikalen Loop von SL I. Am Beispiel von BVDV CP7 konnte durch Deletionsmutanten gezeigt werden, dass SL I und der 3'-Bereich des einzelsträngigen Abschnitts zwischen SL I und SL II für die Virusreplikation essentiell sind. SL II oder SL III können jedoch deletiert werden, ohne dass dadurch die Replikationsfähigkeit verlorenght (Pankraz et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt

Einleitung

werden, dass in der 3'V Region der 3'NTR von Pestiviren mehrere Translations-Stopkodons nach dem eigentlichen Stopkodon „in frame“ liegen, d.h., dass sie im Leseraster des ORFs liegen. Diese werden als Pseudostopkodons bezeichnet (Isken et al., 2004). Durch Analyse dieser Pseudostopkodons mittels strukturneutraler und nichtstrukturneutraler Mutationen konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Termination der Translation abhängig von dem Vorhandensein weiterer Stopkodons in der 3'V Region ist, da das eigentliche Stopkodon des offenen Leserasters (ORF) alleine nicht zu einer vollständigen Termination der Translation führt. Pseudostopkodons finden sich in der 3'NTR von allen Mitgliedern der Familie Flaviviridae. Demzufolge erscheint die 3'V Region mit den Pseudostopkodons als eine Art Abstandhalter zwischen ORF und der 3'C Region, um eine Interferenz von Translation und Replikation zu verhindern.

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 Leseraster 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). Signalpeptide im Bereich der Strukturproteine sorgen für den Transport des Translationskomplexes an die Membran des ER. Nach Translation in das ER finden die Signal Peptidase- und Signalase-katalysierten Protein-Spaltungen zwischen C/E^{ns}, (E^{ns}/E1), E1/E2, E2/p7 und p7/NS2 statt (Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000; Heimann et al., 2006; Thiel et al., 1993). Vermutlich bleiben alle Virusproteine mit der ER-Membran assoziiert, wo auch die Genomreplikation stattfindet. Aus dem Polyprotein entstehen durch mehrere ko- und posttranslationale, von zellulären und viralen Proteasen katalysierte Prozessierungsschritte, schließlich zwölf reife virale Proteine (Abbildung 2).

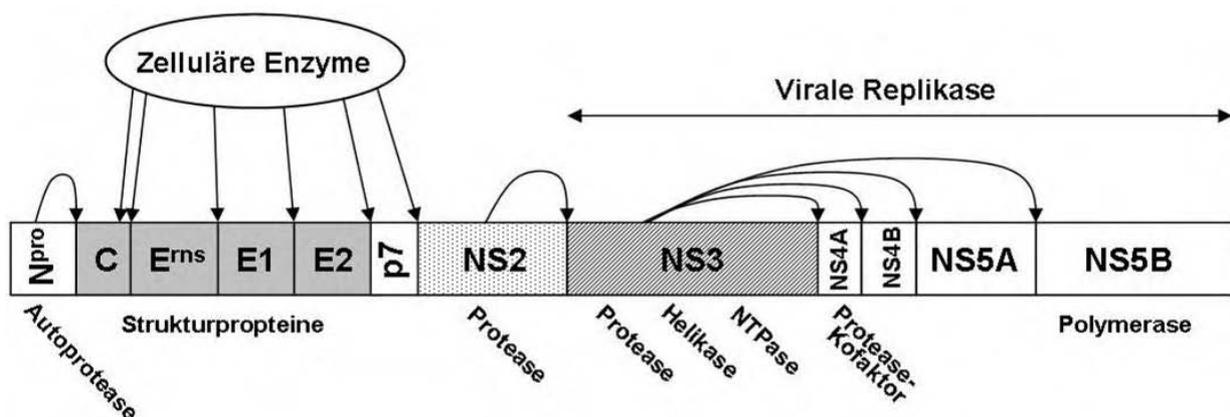


Abbildung 2: Prozessierung des Polyproteins von Pestiviren durch zelluläre und Virus-kodierte Proteasen

3.4.3 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. Der C-Terminus von Core wird erst durch eine zweite Spaltung mittels der Signal Peptidase generiert (Heimann et al., 2006). Das Core Protein ist im nativen Zustand ungefaltet und enthält viele basische Aminosäuren, die für dessen Interaktion mit der viralen RNA verantwortlich sind (Murray et al., 2007).

Eine Signalsequenz direkt vor E^{ns} führt zur Translokation des folgenden Proteinabschnittes in das ER-Lumen. Die viralen Struktur-Glykoproteine E^{ns}, E1 und E2 sowie das hydrophobe Protein p7 werden durch die zelluläre Signalase freigesetzt. Die Signalase ist eine an der lumenalen Seite 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. Die Spaltung zwischen E^{ns} und E1 wird durch eine unbekannt zelluläre Protease vermittelt (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. Ungespaltenes E2/p7 ist hingegen nicht essentiell (Harada et al., 2000). In E1 und E2 (Köhl et al., 2004; Rümenapf et al., 1993; van Zijl et al., 1991) sowie in der C-terminalen Region von E^{ns} (Fetzer et al., 2005) konnten Strukturen identifiziert werden, welche für die Membranverankerung dieser Proteine verantwortlich sind. Die Glykoproteine können über Disulfidbrücken miteinander interagieren. In infizierten Zellen und in gereinigten Virionen können E^{ns}- und E2-Homodimere, sowie E1/E2- und E^{ns}/E2-Heterodimere, nicht jedoch E^{ns}/E1-Heterodimere, gefunden werden (Lazar et al., 2003; Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990).

Das essentielle Strukturprotein E^{ns} 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). Es konnte eine amphipatische Helix im C-terminalen Bereich

Einleitung

nachgewiesen werden, welche das Protein in der viralen, bzw. in zellulären Membranen verankert (Tews und Meyers, 2007). Weiterhin besitzt dieses Strukturprotein im C-terminalen Bereich eine membranaktive Sequenz, welche eine energieunabhängige Aufnahme von E^{rns} in Zellen erlaubt (Langedijk, 2002). 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), woher auch die Bezeichnung „rns“ für sezernierte Ribonuklease (*ribonuclease secreted*) rührt. 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). Es ist möglicherweise am pestiviralen Invasionsmechanismus beteiligt, scheint jedoch für den Virusentry nicht essentiell zu sein (Ronecker et al., 2008). Durch Zugabe von großen Mengen E^{rns} zu permissiven Zellen kann eine pestivirale Infektion inhibiert werden (Hulst und Moormann, 1997), was auf seine Bindung an Glykosaminoglykane an der Oberfläche von eukaryontischen Zellen zurückzuführen ist (Iqbal et al., 2000). Diese Bindung erfolgt vermutlich aufgrund von Zellkultur-adaptiven Mutationen im E^{rns} (Hulst und Moormann, 2001). Da E^{rns} in Abhängigkeit vom zellulären Kompartiment in unterschiedlichen Glykosylierungsformen vorkommt, besitzt es verschiedene apparente Molekulargewichte von 44 kD bis 60 kD (Thiel et al., 1991). Neueren Untersuchungen zufolge inhibiert E^{rns} von BVDV die Interferon-Antwort der Zellen, die beispielsweise durch den Kontakt mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) ausgelöst wird. Die Produktion von Interferon 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^{rns} 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). Interessanterweise beschränkt sich diese Fähigkeit von E^{rns} jedoch auf den extrazellulären Raum, d.h. E^{rns} blockiert die durch dsRNA ausgelöste Interferon-Antwort nur ausserhalb der Zelle (Magkouras et al., 2008). Dies könnte eine wichtige Rolle für die Viruspersistenz im Wirt bedeuten.

Über die Funktion des Glykoproteins **E1** ist so gut wie nichts bekannt. Es wird angenommen, dass es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (Weiland et al., 1990; Thiel et al., 1991).

E2 ist bei Pestiviren für die Bindung der Virionen an den zellulären Rezeptor CD46

verantwortlich (Krey et al., 2006; Maurer et al., 2004). Die meisten Virusneutralisierenden Antikörper sind gegen Epitope des E2-Proteins gerichtet.

3.4.4 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). Neuere Untersuchungen zeigen, dass N^{pro} eine wichtige Rolle bei der Hemmung der zellulären Immunantwort gegen das Virus spielt. Dies geschieht durch Blockade der IRF-3 (Interferon Regulatory Factor-3)-abhängigen Aktivierung von Interferon in der infizierten Zelle (Magkouras et al., 2008; Ruggli et al., 2003; Seago et al., 2007).

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 kD kleine hydrophobe Protein **p7** ist für die Bildung infektiöser Virionen essentiell, obwohl es in den Virionen selbst bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000). Es zeigt strukturelle Homologien zu den Viroporinen, einer Familie kleiner viraler Peptide, die eine entscheidende Rolle bei der Reifung von Virionen spielen. Viroporine bilden durch Oligomerisierung in Membranen 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 (Jones et al., 2007; Sakai et al., 2003; Steinmann et al., 2007). 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; StGelais et al., 2007). 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

Einleitung

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). 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. Freies NS3 hingegen ist essentieller Bestandteil der viralen Replikase und kann als solcher nicht durch ungespaltenes NS2-3 ersetzt werden. Die Freisetzung von NS3 mittels NS2-3-Spaltung erfolgt bei nzp Viren durch eine Autoprotease im **NS2** *in cis*. Es handelt sich dabei um eine Membran-assoziierte Cystein-Protease, die Ähnlichkeit zur NS2-3-Protease von HCV und GB-Viren aufweist (Lackner et al., 2004). Es gibt bisher keine experimentellen Daten zur Proteinstruktur von NS2 und die verfügbaren Informationen beruhen somit auf bioinformatischen Vorhersagen. Demnach ist die N-terminale Hälfte von NS2 sehr hydrophob und enthält eine Transmembrandomäne mit bis zu acht Membrandurchgängen. Dieser Bereich ist zudem essentiell für die Funktion der NS2 Protease, deren aktives Zentrum sich in der zweiten Hälfte des Proteins findet. Insbesondere das Histidin an Position 1447 und das Cystein an Position 1512 sind von Bedeutung für die Aktivität der NS2 Protease und ein Austausch einer dieser Aminosäuren zu einem Alanin führt zur kompletten Inaktivierung der Protease. In der C-terminalen Hälfte des Proteins befindet sich zudem ein vermutlich Zn^{2+} koordinierendes Motiv (Abbildung 3).

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; Gallei et al., 2008; 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. Lange Zeit 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. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch in nzp BVDV-infizierten Zellen freies NS3 entsteht, allerdings nur zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion. 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 (Lackner et al., 2004).

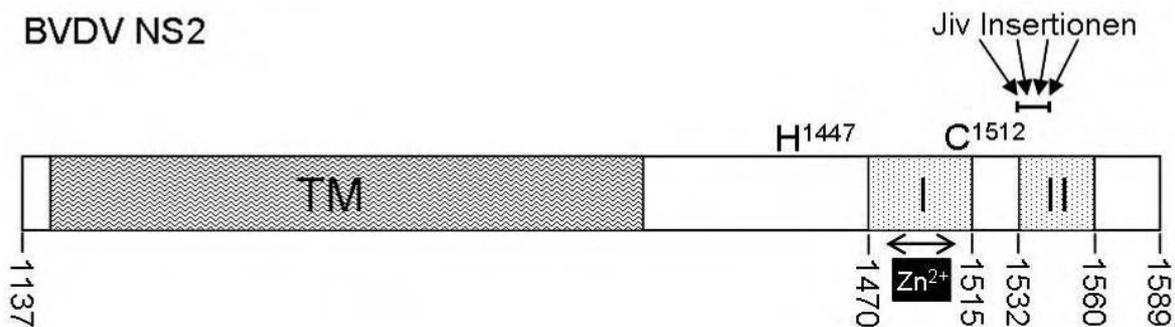


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Nichtstrukturproteins NS2

In der N-terminalen Hälfte des Proteins wird eine Transmembrandomäne postuliert (TM). In der C-terminalen Hälfte befinden sich zwei mit dem zellulären Protein Jiv interagierende Bereiche (I+II) und ein Zn²⁺ bindendes Motiv. In dieser Region finden sich auch die Insertionsstellen von Jiv-Sequenzen in manchen zp Pestiviren (s.u.) und die katalytischen Aminosäuren H1447 und C1512. Die Nummerierung entspricht den Aminosäurepositionen im Polyprotein des BVDV-1 Stammes SD-1.

Es ist bereits seit einigen Jahren bekannt, dass das Chaperon Jiv (J-domain-protein interacting with yiral protein) 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). Es stellte sich heraus, dass Jiv ein essentieller Kofaktor der NS2 Protease ist, den diese in stöchiometrischen Mengen benötigt (Lackner et al., 2005). Die Untersuchung der Interaktion zwischen NS2 und Jiv ergab zwei Jiv-Bindungsdomänen im NS2. Die NS2 Autoprotease kann in eine Protease- (N-terminaler Teil des NS2) und eine Substratdomäne (C-terminaler Bereich) zerlegt werden. Werden beide Fragmente zusammen mit Jiv90 exprimiert kommt es zur Assemblierung einer aktiven NS2 Protease. Ohne Koexpression von Jiv90, bzw. nach Mutation der NS2-3 Spaltstelle oder des aktiven Zentrums der NS2 Protease unterbleibt die Prozessierung (Lackner et al., 2006). Im Fall einer nzp BVDV Infektion limitiert die intrazelluläre Jiv-Menge die Zahl der pro Zelle freigesetzten NS3 Moleküle und damit die Zahl der aktiven Replikationskomplexe. Das Jiv-Protein ist in der Zelle jedoch nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Der Verbrauch des zellulären Jiv-Pools durch die irreversible Bindung an NS2 erklärt somit zusammen mit ihrer Beschränkung auf *cis*-Spaltung die zeitliche Regulation der NS2 Protease-Aktivität und damit das Umschalten

von RNA-Replikation zu Virionmorphogenese (Lackner et al., 2005). Die Aktivität der NS2 Protease reguliert also den Lebenszyklus des nzp Virus (Abbildung 4).

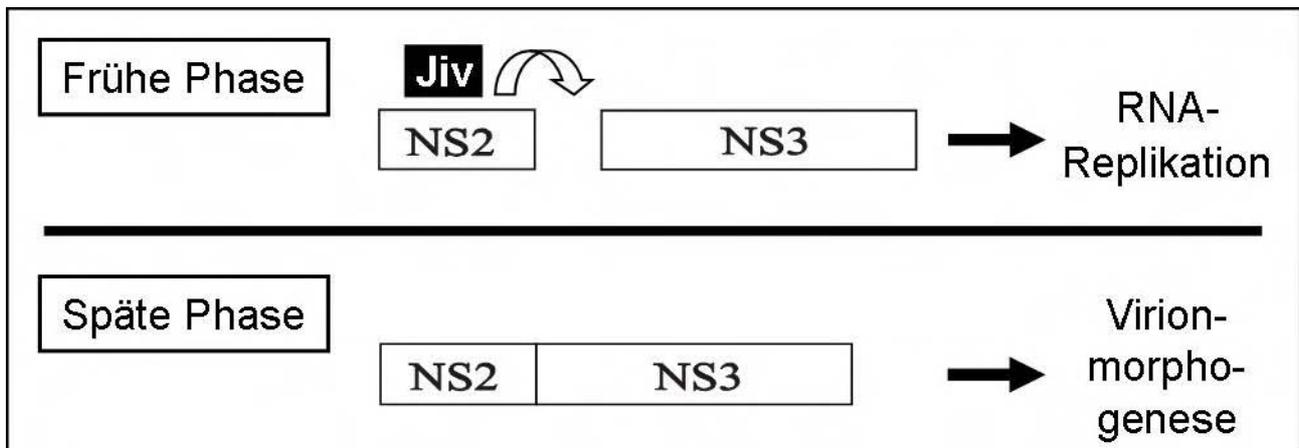


Abbildung 4: Zeitliche Regulation der Virusreplikation durch die Jiv-abhängige Aktivität der NS2 Protease

In frühen Phasen der Infektion ist ausreichend zellulärer Kofaktor Jiv vorhanden, um die Aktivität der NS2 Protease und damit die NS2-3-Spaltung zu gewährleisten. Somit steht freies NS3 für RNA-Replikationskomplexe zur Verfügung. Wird später der zelluläre Jiv-Pool aufgebraucht, so ist überwiegend ungespaltenes NS2-3 vorhanden, welches zur Bildung infektiöser Virionen benötigt wird. Die Herabregulierung der NS2-3-Spaltung führt also zu einem Wechsel von RNA-Replikation zu Virionmorphogenese. Auf diese Weise reguliert die Aktivität der NS2 Protease den Lebenszyklus des nzp Virus.

In zp BVDV-infizierten Zellen ist die Abhängigkeit von Jiv und somit die zeitliche Regulation aufgehoben, so dass hier stets NS3 freigesetzt wird. Dabei erreichen verschiedene zp BVDV-Stämme diese Deregulation auf unterschiedliche Weise (s.u.).

Die Abhängigkeit von Jiv ist bedeutend für die Fähigkeit des Virus zur Persistenz. Die begrenzte Jiv-Menge innerhalb der Zelle ist die Grundlage für die Regulation und damit für die Limitierung der viralen Replikation in nzp BVDV-infizierten Zellen. Die Begrenzung 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 (Lackner et al., 2004).

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;

Einleitung

Gorbalenya et al., 1989b; Grassmann et al., 1999; Gu et al., 2000; Tamura et al., 1993; Tautz et al., 2000; Warrener 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) und führt somit 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.

NS4A wird als Kofaktor für die Spaltungen zwischen NS4B/NS5A und NS5A/NS5B benötigt. Dazu interagiert es mit dem N-terminalen Bereich von NS3 (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997). Für HCV wurde gezeigt, dass NS4A zur Faltung von NS3 beiträgt, das Enzym in der Membran verankert und die Aktivität der NS3-Helikase moduliert (Lindenbach et al., 2007). Daneben hat freies NS4A auch wichtige Funktion bei der Virionmorphogenese (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007).

Die Proteine von NS3 bis NS5B bilden gemeinsam den viralen RNA-Replikationskomplex (Behrens et al., 1998; Meyers et al., 1996; Tautz et al., 1994). 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). 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).

Das hydrophobe **NS4B** gehört zu den am wenigsten erforschten pestiviralen Proteinen. Ausgehend von den strukturellen und biochemischen Gemeinsamkeiten mit HCV NS4B (Welsch et al., 2007) lassen sich jedoch ähnliche Funktionen vermuten. Demnach könnte NS4B die Ausbildung von speziellen Membranstrukturen („membranous web“) induzieren, in welchen dann die RNA-Replikation des Virus stattfindet (Gosert et al., 2003; Moradpour et al., 2004). Desweiteren kommt NS4B im Rahmen des Replikationskomplexes eine wichtige Funktion für die virale RNA-Replikation zu (Paredes und Blight, 2008).

NS5A nimmt eine Sonderstellung ein, da es als einziges Mitglied des Replikationskomplexes *in trans* komplementiert werden kann (Grassmann et al., 2001). Es handelt sich um ein Zink-bindendes Phosphoprotein (Tellinghuisen et al., 2006), welches Untersuchungen bei HCV zufolge in drei Domänen unterteilt werden kann, von welchen die ersten beiden für die Replikation der viralen RNA benötigt werden, während die Domäne III eine entscheidende Rolle bei der Bildung infektiöser Virionen hat (Tellinghuisen et al., 2008). Demzufolge stellt NS5A einen zentralen Regulator der Virusreplikation dar, wobei seine Aktivität durch wechselnde Phosphorylierung bestimmt wird.

NS5B ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp, *RNA dependend RNA polymerase*) des Virus (Kao et al., 1999; Steffens et al., 1999; Zhong et al., 1998). Sie 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. Daneben wird auch für NS5B eine Rolle bei der Virionmorphogenese vermutet, da eine Insertion im C-terminalen Bereich des Proteins die Produktion infektiöser Viren verhinderte, während die RNA-Replikation davon nicht betroffen war (Ansari et al., 2004).

3.4.5 Virionmorphogenese

Zur Bildung der Pestiviruspartikel werden nicht nur ihre eigentlichen Bestandteile benötigt, also die viralen Strukturproteine, sondern auch die Nichtstrukturproteine sind von entscheidender Bedeutung für die Koordination der Virionmorphogenese (Murray et al., 2008). Besonders p7, NS2-3, NS4A, NS5A und NS5B scheinen für die Generierung infektiöser Virionen besondere Bedeutung zu besitzen (s.o.). Die Rolle des NS2-3 Proteins bei der Virionmorphogenese soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

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 mit dem Core Protein assoziierten Virusgenome in ER-Membranbereiche ausstülpfen, in welche größere Mengen E^{ns} , E1 und E2 eingelagert sind. Es kommt zur Abschnürung von Partikel-haltigen Vesikeln in das ER-Lumen, die von dort entlang des sekretorischen Weges zum Golgi-Apparat transportiert werden und schließlich mit der Zytoplasmamembran fusionieren, wodurch die infektiösen Virionen freigesetzt werden.

3.5 Grundlagen der Zytopathogenität

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 Zytopathogenität von Pestiviren korreliert (Collett et al., 1988a; Corapi et al., 1988; Pocock et al., 1987; Purchio et al., 1984). Zytopathogene 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 Zytopathogenität 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^{rns}, E1, E2 und p7 für die Festlegung des viralen Biotyps nicht essentiell sind (Tautz et al., 1999).

Ausgehend von einem zp BVD-Virus konnte experimentell ein Virus generiert werden, 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.

Inzwischen wurden zahlreiche Viruspaare aus an MD gestorbenen Tieren isoliert und zum Teil komplett sequenziert. Die in Verbindung mit dem zp Biotyp gefundenen

Einleitung

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.

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 die Freisetzung von NS3 auf verschiedenen Wegen erreicht:

- eine zelluläre Insertion direkt oberhalb von NS3 dient als zusätzliche Proteasespaltstelle und bewirkt so die Freisetzung von NS3;
- Duplikationen oder Deletionen viraler Sequenzen platzieren die virale Protease N^{pro} direkt oberhalb von NS3 und führen so zur Bildung von freiem NS3 (Rearrangement im viralen Genom);
- 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).

3.5.1 Zytopathogene Pestiviren mit Insertionen zwischen NS2 und NS3

Häufig gefundene Insertionstypen sind Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Sequenzen

Einleitung

(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).

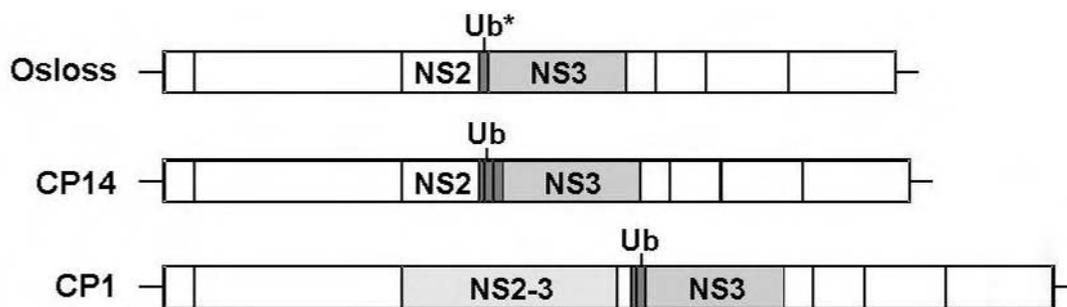


Abbildung 5: Zp BVD Viren mit Ubiquitin-Insertionen

Durch RNA-Rekombination entstehen im persistent infizierten Rind Viren mit Insertionen zellulärer Ubiquitin-kodierender Sequenzen oberhalb des NS3 Gens. Diese Insertionen führen zur Prozessierung durch zelluläre UCH, so dass freies NS3 in großen Mengen generiert wird und die Viren zytopathogen sind. Das im Stamm Osloss insertierte Ub-Monomer (*) enthält im Vergleich zum bovinen Ub zwei (laut veröffentlichter Osloss-Sequenz), bzw. einen Aminosäureaustausch (gemäß Sequenzdaten des in dieser Arbeit verwendeten Osloss-Stammes).

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): Threonin an Position 55 und Glycin an Position 76 jeweils zu Serin. Im Unterschied zur veröffentlichten Osloss-Sequenz (Renard et al., 1987; de Moerlooze et al., 1993) trägt das in dieser Arbeit verwendete Osloss-Virus jedoch nur einen dieser Austausche (Ub G76-S). Durch die Ub-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,

Einleitung

während das Ubiquitin-Monomer als C-terminale Fusion am NS2 verbleibt. Somit sollte der Stamm Osloss kein ungespaltenes NS2-3 besitzen. Da dieses jedoch essentiell für die Entstehung infektiöser Viren ist (Agapov et al., 2004), stellt sich die Frage, wie dieses Virus dennoch in der Lage ist zu replizieren. Der Stamm CP14 enthält an der gleichen Stelle wie Osloss eine Insertion von Ubiquitin-Sequenzen, die für zwei komplette und ein unvollständiges Ub-Monomer kodieren. Dadurch erfolgt eine vollständige Prozessierung von NS2-3 und das Virus ist für die Verpackung von einem Helfervirus abhängig, das NS2-3 *in trans* bereitstellt (N. Tautz, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit soll die Frage der Virionmorphogenese des Stammes Osloss weiter untersucht werden.

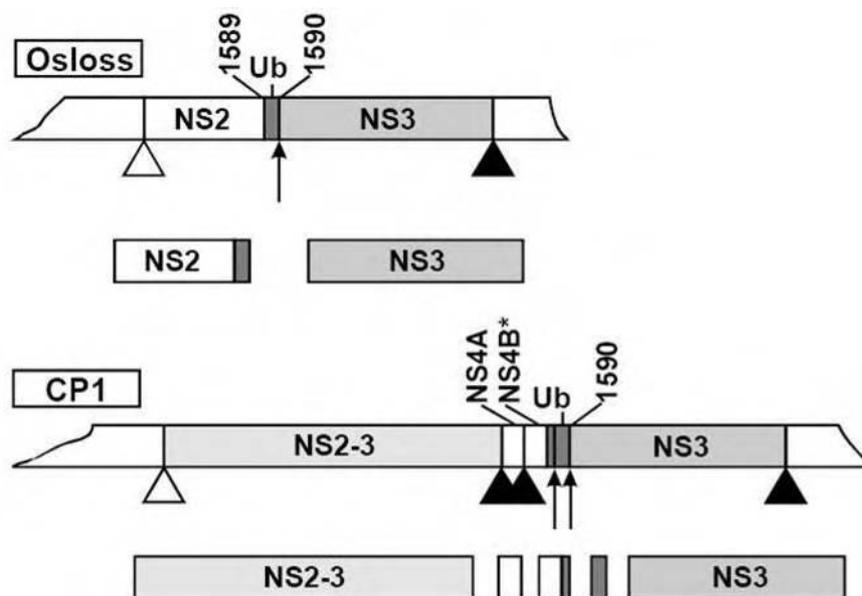


Abbildung 6: Prozessierung der NS2-3 Region der Stämme Osloss und CP1

Weißer Dreiecke symbolisieren Spaltung durch die zelluläre Signalase, schwarze Dreiecke Spaltstellen der NS3-Protease und Pfeile kennzeichnen Prozessierung durch UCH. Die Nummerierung entspricht den Aminosäurepositionen im Polyprotein des BVDV-1 Stammes SD-1. NS2-3 des Stammes Osloss wird durch zelluläre UCH gespalten und somit freies NS3 generiert. Vermutlich steht Osloss daher kein ungespaltenes NS2-3 zur Verfügung. Durch Duplikationen im Genom von CP-1 entsteht bei diesem Stamm sowohl freies NS3 als auch ungespaltenes NS2-3.

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. Der für NS4B kodierende Sequenzabschnitt ist 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

Einleitung

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. Zusätzlich entsteht jedoch aus der NS2-3-kodierenden Region des vorderen Abschnitts des Genoms ungespaltenes NS2-3, so dass CP1 nicht auf ein Helfervirus angewiesen ist.

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(A)-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). Die anderen zellulären Proteine weisen eine Ub-ähnliche Faltung auf.

3.5.2 Zytopathogene Pestiviren mit Duplikationen oder Deletionen

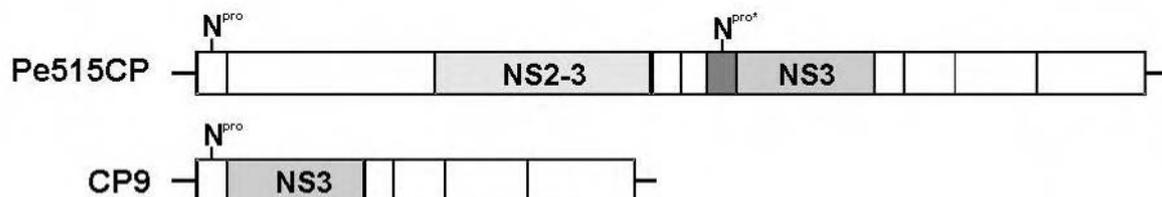


Abbildung 7: Zp BVD Viren mit Duplikationen oder Deletionen im Genom

In den dargestellten Beispielen kommt es durch Rearrangements im viralen Genom zur Freisetzung von NS3 durch die Spaltungsaktivität der viralen Autoprotease N^{pro} . CP9 kann durch eine Deletion der Strukturproteine selbständig keine Viren produzieren, ist aber fähig zur RNA-Replikation, da die virale Replikase (NS3-NS5B) vollständig vorhanden ist.

Duplikationen im viralen Genom können auch ohne Insertion zellulärer Sequenzen zur Freisetzung von NS3 und damit zur Zytopathogenität 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, so dass 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), wenn 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.

3.5.3 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. Es kann aber als sehr wahrscheinlich angesehen werden, dass die Punktmutationen die NS2 Autoprotease aktivieren.

Die Hypothese der Aktivierung der NS2 Autoprotease durch eine Konformationsänderung 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 gleichen Ergebnisse erhielt man auch bei der Untersuchung mehrerer BVDV-Isolate aus Ungarn (Bálint et al., 2005). Diese Viren hatten an der selben Stelle, an der auch die Insertion des Stammes CP7 liegt, eine 15 AS große Duplikation aus dem Bereich der Spaltstelle zwischen NS4B und NS5A.

3.5.4 Zytopathogene Pestiviren mit Jiv-Insertionen

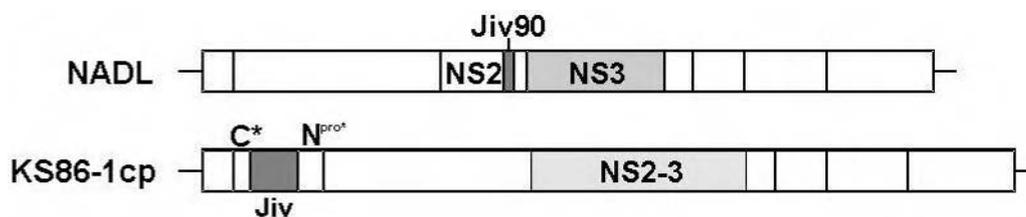


Abbildung 8: Zp BVD Viren mit Jiv-Insertionen

Indem sie durch RNA-Rekombination Sequenzen der zellulären Jiv-mRNA in ihr Genom integrieren, werden manche BVD Viren unabhängig vom limitierten Jiv-Pool und spalten NS2-3 permanent. Die NS2 Protease kann dabei sowohl in cis durch eine Jiv-Insertion im NS2 (z.B. NADL) als auch in trans durch eine Jiv-Insertion in einem anderen Genombereich (z.B. KS86-1cp) aktiviert werden.

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 1543 (BVDV 6082c, GenBank AF28180; abweichende Angaben in: Ridpath und Neill, 2000) (siehe Abbildung 9). 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 im Bereich der zweiten Jiv-Bindedomäne (Tautz und Thiel, 2003).

BVDV

NADL	1536	90 aa	
C86	1532	177 aa	
2324_94	1538	140 aa	
5.19516	1538	132 aa	
5569	1542	116 aa	
Indiana	1537	104 aa	
869	1538	100 aa	
7923	1537	104 aa	
88055	1536	90 aa	
A2146	1538	96 aa	
ND 8799c	1538	100 aa	
Galena 16425c	1538	151 aa	
OkSt 94-050-297c	1538	124 aa	
SD1630c	1538	146 aa	
5912c	1529	102 aa	
296c	1533	138 aa	
6082c	1543	131 aa	

BDV

Cumnock	1531	129 aa	
Moredun	1531	109 aa	
Giraffe-1	1532	98 aa	

Abbildung 9: NS2 von zp Pestiviren mit Jiv-Insertionen

Mittlerweile wurden viele zp Pestiviren mit Insertionen von Jiv-Sequenzen im Nichtstrukturprotein NS2 isoliert. Die Insertionen variieren dabei leicht in ihrer Größe und in ihrer Position. Für Jiv kodierende Sequenzen grau unterlegt; Nummerierung gemäß AS-Positionen im Polyprotein von BVDV-1 Stamm SD-1

Die Insertionen sind in ihrer Größe sehr variabel. 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 Zytopathogenität 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.

Bisher wurden fünf 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), CP8 (Müller et al., 2003), 799cp und 839cp (Kameyama et al., 2006) besitzen Jiv-Insertionen in der Region der Strukturproteine und können dadurch die NS2-3-Spaltung *in trans* aktivieren. Kürzlich konnte diese *trans*-Aktivierung der NS2 Protease durch Einfügen der CP8-Insertion in den CSFV-Stamm Alfort-p447 auch bei Schweinepestviren nachgewiesen werden. Der Biotyp dieses Virus änderte sich dadurch von nzp zu zp und das Virus war im Wirt attenuiert (Gallei et al., 2008).

3.6 Das Jiv-Protein

Das für Jiv kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 5 des Rindes. Jiv ist das bovine Ortholog des Proteins DnaJC14 (DnaJ [Hsp40] homolog, subfamily C, member 14) und wird demzufolge der Familie der J-Domänen-Proteine zugerechnet. Diese sind eine Gruppe von zellulären Chaperonen, 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 Regulation von Proteinfaltungsprozessen. 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.

Einleitung

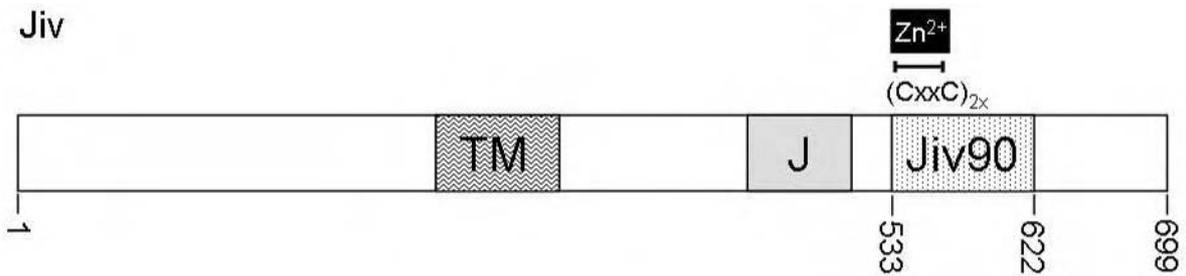


Abbildung 10: Schematische Darstellung des zellulären Proteins Jiv

Im TM bezeichneten Bereich wird eine Transmembrandomäne mit zwei Membrandurchgängen vorhergesagt. Die J-Domäne (J) befindet sich N-terminal des mit pestiviralem NS2 interagierenden Jiv90. Letzteres beinhaltet zwei Cystein-Motive eines putativen Zn²⁺-Fingers. Die Nummerierung entspricht den AS-Positionen.

Es gibt bei vielen Tierarten und beim Menschen eine Vielzahl von J-Domänen-Proteinen. Bei allen wurde durch bioinformatische Analysen neben der J-Domäne noch mindestens eine Transmembrandomäne und ein Motiv für die Bindung eines Zink-Ions identifiziert. Von J-Domänen-Proteinen der Unterfamilie A ist bekannt, dass sie häufig zwei Zink-Ionen binden.

Das Jiv-Ortholog 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). Daneben wird es auch als LYST(Lysosomal Trafficking Regulator)-Interacting Protein 6, kurz LIP6, beschrieben (Tchernev et al., 2002).

Das orthologe 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., 2001). Es wird daher auch als DRiP78 (*dopamine-receptor interacting protein 78*) bezeichnet. Diese Funktion wird durch eine Protein-Protein-Interaktion über eine Proteindomäne, welche Jiv90 umfasst, mit einem bei vielen GPCRs konservierten polyaromatischen Motiv vermittelt. Es wurde auch ein Einfluss von DRiP78 auf die Expression des Typ 1 Angiotensin II Rezeptors (AT₁) an der Zelloberfläche beschrieben (Leclerc et al., 2002). Seine genaue Rolle beim Export der Rezeptoren ist jedoch noch unklar. Neuere Untersuchungen schreiben DRiP78 eine Rolle als Chaperon bei der Assemblierung von G Proteinen zu (Dupré et al., 2007). Dabei wurden spezifische Interaktionen mit der Gy Untereinheit und mit PhLP (Phosducin-Like Protein), welches selbst als Chaperon beim Zusammensetzen von G β und Gy Untereinheit fungiert, nachgewiesen.

Über die Funktion von Jiv in der Zelle ist noch wenig bekannt. In natürlichen Wirtszellen, wie z.B. in MDBK-Zellen, werden unter normalen Bedingungen nur sehr geringe Mengen

Einleitung

des Jiv-Proteins exprimiert. Die exprimierten Mengen sind so gering, dass ein direkter Proteinnachweis bislang nicht gelungen ist; die Jiv-mRNA ist jedoch stets nachweisbar. Aus der Gesamt-RNA aus MDBK-Zellen gelang der Nachweis von zwei Jiv-kodierenden mRNAs. Die beiden mRNAs wurden als cDNAs kloniert und sequenziert. 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). Auffällig ist der phylogenetisch konservierte upstream Open Reading Frame (ORF, offene Leserahmen) bei Jiv zu RNAs verschiedener Spezies, der auf eine posttranskriptionelle Translationskontrolle hinweist.

Der Jiv90-Bereich des bovinen Jiv-Proteins (AS 533-622) ist für die stabile Interaktion mit dem NS2 von Pestiviren verantwortlich. Durch Co-Immünpräzipitationsstudien konnte das mit NS2 interagierende Jiv-Peptid auf 20 Aminosäuren (AS 574-593) eingegrenzt werden. Dieses Peptid bindet an beide Jiv Bindungsstellen im NS2. Jiv, bzw. sein Fragment Jiv90, kann sowohl *in cis*, d.h. im Kontext von NS2-3, als auch *in trans* die NS2-3-Spaltung induzieren und stellt einen essentiellen Kofaktor der NS2 Protease dar, den diese in stöchiometrischen Mengen benötigt. Zur Induktion der NS2-3 Spaltung genügt bereits ein 75 AS großer Teil von Jiv90 (AS 544-618), jedoch führt nur das vollständige Jiv90 zur maximalen Spaltungseffizienz. Eine Mutagenesestudie, in welcher Aminosäuren im Jiv90 durch Alanin ersetzt wurden, zeigte, dass nur eine Aminosäure essentiell für die Spaltungsinduktion ist. Wird das Tryptophan an AS-Position 572, bzw. Position 39 im Jiv90, durch Alanin substituiert (W39-A), so erfolgt keine Induktion der NS2-3-Spaltung (Lackner et al., 2005).

Im Fall einer nzp BVDV-Infektion limitiert die intrazelluläre Jiv-Menge die Zahl der pro Zelle freigesetzten NS3 Moleküle und damit die Zahl der aktiven Replikationskomplexe. Der Verbrauch des zellulären Jiv-Pools erklärt somit die zeitliche Regulation der Aktivität der NS2 Protease und das Umschalten von RNA-Replikation zu Virionmorphogenese (Lackner et al., 2005; Lackner et al., 2006; Rinck et al., 2001). Erhöht man die Menge des intrazellulären Jiv-Proteins massiv, etwa durch Jiv-Überexpression in MDBK Zellen, greift der Regulationsmechanismus in Form einer Limitierung der viralen Replikation durch den Verbrauch des zellulären Kofaktors Jiv nicht mehr. In diesen Zellen kommt es im Verlauf einer nzp BVDV-Infektion nicht zum Einbruch der viralen RNA-Replikation. Die Replikation erfolgt über den gesamten Zeitraum der Infektion auf einem 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 (Rinck et al., 2001). Entsprechend sind die Vorgänge während einer nzp BVDV-Infektion in Zellen mit einem durch RNA-Interferenz reduzierten Jiv-Spiegel (Jiv-„knockdown“-Zellen). In diesen Zellen sinkt die Aktivität der NS2 Protease und damit die Freisetzung von NS3 bereits 2 Stunden früher als in den Vergleichszellen auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau ab. Zudem findet man in Jiv-„knockdown“-Zellen im Vergleich zu den Ausgangszellen nach Infektion mit nzp BVDV eine um 90 % reduzierte Menge viraler RNA und einen um 1,5 \log_{10} -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 (Lackner et al., 2005).

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 nicht im Detail geklärt. Fest steht, dass Jiv90 mit zwei Bindungsdomänen in NS2 interagiert und so Protease- und Substratdomäne zu einer aktiven NS2 Protease assemblieren kann (Lackner et al., 2006).

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Replikation zumindest mancher nzp BD-Virusstämme von Jiv abhängig ist.

3.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit den pestiviralen Proteinen NS2-3 und NS2 und dem mit ihnen interagierenden zellulären Protein Jiv.

Gemäß unserer Arbeiten ist die Regulation der viralen NS2 Autoprotease durch den zellulären Kofaktor Jiv für den Lebenszyklus und die Fähigkeit des BVDV persistierende Infektionen zu etablieren von entscheidender Bedeutung. Dieser ausgefeilte Regulationsmechanismus unter Einbeziehung viraler und zellulärer Faktoren sollte nun auf biochemischer sowie struktureller Ebene untersucht werden. Dazu müssen zuerst die beteiligten Proteine Jiv und NS2 in größeren Mengen und in gereinigter Form gewonnen werden. Nachfolgend können diese zur Produktion von Antikörpern und zur Untersuchung ihrer Struktur genutzt werden.

Einleitung

Parallel dazu sollte die Funktion des ungespaltenen NS2-3 für die Virionmorphogenese untersucht werden. Als Modellvirus wurde der BVDV-1 zp Stamm Osloss verwendet, der eine Ubiquitin-Insertion zwischen NS2 und NS3 besitzt und daher kein ungespaltenes NS2-3 zur Verfügung haben sollte. Um herauszufinden wie dieses Virus dennoch fähig ist zu replizieren, sollte mittels reverser Genetik eine lebensfähige Virus-Chimäre erzeugt und analysiert werden, deren Genom aus Sequenzen des Osloss-Stammes und eines nzp Virus besteht.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

1 kb-DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid:N,N'-Methylen-bisacrylamid 29:1; 40% (w/v)	AppliChem, Darmstadt
Agarose ultraPURE™	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Biotin (B-4639)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	BioRad, München
Bovines Serum-Albumin (BSA)	NEB, Schwalbach
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R 250	Merck, Darmstadt
DMEM-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraacetat)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Fluka, Schweiz
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
F-10 Nut. Mix. Medium Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
F-12 Nut. Mix. Medium Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	PAA, Österreich
Freund'sches Adjuvans, incomplete	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Fluka, Schweiz
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HAT Medium Supplement 50x, Hybri-Max	Invitrogen, Karlsruhe
HT Medium Supplement 50x, Hybri-Max	Invitrogen, Karlsruhe
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	ICN, Eschwege
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Low Melting Agarose (LMA)	Gibco-BRL
Magermilchpulver	Fluka, Schweiz
Methanol	Fluka, Schweiz
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt
N-octyl-β-D-glucopyranosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP-40 (Nonidet P 40, Nonylphenyl-polyethylenglycol)	Fluka, Schweiz

Material und Methoden

NZCYM	Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide	Operon, Köln
OPI Medium Supplement Hybri-Max	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange-G	Fluka, Schweiz
Paraformaldehyd	Fluka, Schweiz
Penicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenolrot	Fluka, Schweiz
Proteinmarker, prestained	NEB, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protino® Ni-TED Resin	Macherey-Nagel, Düren
Roti-Blot® A und Roti-Blot® K Western Blot Puffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol®	Roth, Karlsruhe
SDS	ICN, Eschwege
SequaGel® XR Monomer Solution und SequaGel® Complete Buffer (für Sequenzgele)	National diagnostics, USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Superfect Transfektions-Reagenz	Qiagen, Hilden
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	AppliChem, Darmstadt
Tricin	ICN, Eschwege
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Schweiz
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Türk's Färbelösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser, doppelt destilliert	Roth, Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	ICN, Eschwege
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

Die hier nicht alle im Einzelnen aufgelisteten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

4.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Dialyse-Schläuche	Pierce; Biomol
Elektroporationsküvetten (2 mm Spaltbreite)	Sigma-Aldrich
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturgefäße	Falcon
Handschuhe rotiprotect® LATEX und rotiprotect® NITRIL	Roth
HiTrap™ IMAC FF, 1 ml, affinity columns	GE Healthcare
HiTrap™ Protein G HP, 1 ml, affinity columns	GE Healthcare
Kanülen	Braun
Kryoröhrchen	Nalgene
Macrosep Omega Centrifugal Filter Devices, 3K und 10K	Pall
Mikrotiterplatten	Nunc
Nitrozellulose-Blotting-Membran BioTrace NT™	Pall
Pipettenspitzen	Biozym
Pipettenspitzen, gestopft	Nerbe plus
Plastikspritzen	Braun
Protino® Columns (14 ml)	Macherey-Nagel
Protino® Ni-TED 2000 packed columns	Macherey-Nagel
QIAshredder™ Homogenisatorsälchen	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf; Sarstedt
Reaktionsgefäße für PCR-Anwendungen	Biozym
Röntgenfilme Biomax™	Kodak
Sterilfilter Minisart™ (0,29 und 0,45 µm)	Sartorius
TSP-Platten (Transferable Surface Plate)	Nunc

4.1.3 Verwendete Geräte

Absaugereinrichtung	Werkstatt des MZI, JLU Gießen; KNF
ÄKTA purifier (FPLC)	Amersham Pharmacia Biotech
Brutschränke für Bakterienkulturen	GFL; Bachofer
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Forma Scientific; Labotect
Digitalkamera FView® und AxioCam	Soft Imaging System (SIS); Zeiss
DNA-Sequenzierer: LI-COR 4000 L	Licor
Elektroporationsapparatur: GenePulserII	BioRad
ELISA-Reader: Spectra II	SLT
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Brand
Fluorometer: Qubit	Invitrogen
Fuoreszenz-Mikroskope	Zeiss (Axiovert 35; Axio Observer Z.1)
Gel-Dokumentationssystem	MWG
Gelelektrophoresekammern für Agarosegele (DNA und RNA)	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Glaswaren	Schott
Heizblöcke	Eppendorf; Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Kryobox	Nalgene
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
Lichtmikroskope	Will; Zeiss
Magnetrührer	IKA; Colora Messtechnik

Material und Methoden

Minishaker: Vibrax VXR	IKA
Nass-Blot-Apparatur	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Neubauer-Zählkammer	Assistent
pH-Meter	Knick
Photometer: GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Pipetten: pipetman	Gilson
Pipetten, Mehrkanal	Biohit
Pipettierhilfe PipetBoy Acu	Integra Biosciences
Proteingelelektrophoresekammern	Hoefer; Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Pumpe, peristaltisch	LKB Bromma
Reinstwasseranlage: Purelab UF Plus	USF
Röntgenfilmentwicklungsmaschine: Curix 60	Agfa
Schüttler	Janken und Kunkel; GFL
Semi-Nass-Blot-Apparatur (Semi-dry)	BioRad
Sonicator: Labsonic	Braun
Spannungsquellen	Biometra
Sterilbank	Kendro; Thermo Scientific
Thermocycler	Techne; Finnzymes
Thermostatschrank: Lovibond	Liebherr
Tischzentrifuge (1,5 und 2 ml)	Heraeus (Biofuge pico); Eppendorf (5415D)
Tischzentrifuge (15 und 50 ml)	Heraeus (Biofuge primo); Eppendorf (5804R)
Tischzentrifuge, gekühlt	Heraeus (Biofuge fresco); Eppendorf (5415R)
Ultrazentrifugen	Beckman; Kontron
Vortexer	IKA
Waagen	Mettler-Toledo; Sartorius
Wasserbad	H. Kretschmer, Gießen; GFL
Western Blot Image Analyzer: LAS-4000mini	Fujifilm
Zentrifugen	Beckman (Avanti); Heraeus (Minifuge)

4.1.4 Verwendete Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Antarctic Phosphatase	NEB, Schwalbach
HPR I (Ribonuclease Inhibitor Human Placenta)	TaKaRa, Frankreich
Klenow-Fragment	NEB, Schwalbach
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; NEB, Schwalbach; Promega, Mannheim; TaKaRa, Frankreich
RNase A	Roche, Mannheim
RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	NEB, Schwalbach
T4 RNA-Ligase	NEB, Schwalbach
Taq DNA-Polymerase	NatuTec, Frankfurt
Transcriptor Reverse Transcriptase	Roche, Mannheim
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.1.5 Verwendete Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, USA
Nucleobond® AX 100 Säulen zur DNA Präparation aus Bakterien	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® RNA II Total RNA Isolation zur RNA Präparation aus eukaryontischen Zellen	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy® zur RNA Präparation aus eukaryontischen Zellen	Qiagen, Hilden
Montage™ DNA Gel Extraction Kit zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Millipore, USA
Qiaquick® Gel Extraction Kit zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
Quant-iT™ DNA BR assay kit zur DNA-Messung	Invitrogen, Karlsruhe
Quant-iT™ RNA assay kit zur RNA-Messung	Invitrogen, Karlsruhe
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices zur Aufreinigung von PCR-Produkten und zur DNA-Konzentration und Entfernung von Salzen aus Reaktionsansätzen	Millipore, USA
pGEM®-T Vektor System I zur Klonierung von PCR Produkten	Promega, USA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus für die Auswertung von Western Blots	PerkinElmer Life Sciences, USA
MAXIscript™ SP6 zur in vitro-Transkription von Plasmid-DNA in RNA	Ambion Inc., USA
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit	Amersham, Freiburg
Maus-Hybridoma-Subtyping Kit	Boehringer, Mannheim

4.1.6 Verwendete Antikörper

Code4 (mAk 8.12.7)	Monoklonaler Antikörper gegen NS3 (α NS3-mAk); 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))
Anti Flag M2	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen das Flag-Epitop „DYKDDDDK“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Anti GST	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen Glutathion-S-Transferase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Anti Myc	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen das c-Myc-Epitop „EQKLISEEDL“ (Cell Signaling Technology, Inc.)
Anti Penta-His	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen das Penta-His-Epitop „HHHHH“ (Qiagen, Hilden)
Anti Ub (13A4)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gerichtet gegen Ubiquitin von <i>S. cerevisiae</i> ; zur Verfügung gestellt von G. Roman-Sosa (Institut für Virologie, JLU Gießen)
Cy3-konjugierter Anti-Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugiert (Dianova, Hamburg)
Peroxidase-konjugierter Anti-Maus-IgG	Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen IgG der Maus und mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova, Hamburg)

4.1.7 Verwendete Basis-Plasmide

pCITE-2A	Enthält die IRES des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) nach einem T7 RNA Polymerase Promotor; die IRES verstärkt die cap-unabhängige Transkription im MVA-T7pol Vaccinia Virus Expressionssystem; bezogen von Novagen, Madison, USA
pGST	Basiert auf pCITE-2A und kodiert zwischen EMCV-IRES und Polylinker zusätzlich für Glutathion-S-Transferase (Tautz et al., 2000)
pGEM-T	Zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen; bezogen von Promega, Madison, USA
pC/E2-NS4A	Basiert auf pCITE-2A und kodiert nach einer fremden Signalsequenz (Harada et al., 2000) für die Aminosäuren 693 bis 2343 des Polyproteins von cp BVDV CP7 (NS2-NS4A i+) (Rinck et al., 2001)
pN/E2-NS4A	Entspricht pC/E2-NS4A, allerdings wurde die CP7-spezifische 27 nt große Insertion im NS2 deletiert (CP7 i-) (Rinck et al., 2001); kodiert für NS2-NS4A i-
pFlagNS2	Basiert auf pCITE-2A und kodiert hinter dem Startkodon (M) für das Flag-Epitop (DYKDDDDK) gefolgt von einem Leucin und NS2 von BVDV CP7 i- (AS 1137-1589) (Rinck et al., 2001)
pET28a	Zur bakteriellen Protein-Expression; bezogen von Novagen
pET26Ub	Basiert auf pET26b (Novagen) und kodiert hinter dem Startkodon (M) für Ubiquitin von <i>S. cerevisiae</i> ; erhalten von J. J. Arnold, Pennsylvania State University, USA (Gohara et al., 1999)
pUb	Basiert auf pET28a und kodiert hinter dem Startkodon (M) für den HexaHis-Tag (HHHHHH) gefolgt von Ub von <i>S. cerevisiae</i> (diese Arbeit)
pTf-Ub	Basiert auf pUb und kodiert zwischen HexaHis-Tag und Ub für den <i>E. coli</i> Trigger Factor (diese Arbeit)
pMistic	Basiert auf pUb und kodiert anstelle von Ub für Mistic von <i>B. subtilis</i> (diese Arbeit)
pRK793	Bakterielle Expression der TEV Nuclear Inclusion Protease a (His-TEV[S219V]-Arg) (Kapust et al., 2001)
pGEX-2T	Zur bakteriellen Protein-Expression; kodiert für Glutathion-S-Transferase; bezogen von Amersham
pTf16	Kodiert für <i>E. coli</i> Trigger Factor; bezogen von TaKaRa
pLitmus28, -38	Zu Konierungen genutzt; bezogen von NEB
pTRE	Zu Konierungen genutzt; bezogen von Clontech
pBluescript II SK(-)	Zu Konierungen genutzt; bezogen von Stratagene

4.1.8 Verwendete PCR-Primer

Verwendung für PCR, RT-PCR, gerichtete Mutagenese und Sequenzierung

unterstrichen Base, die von der Template-Sequenz abweicht

kursiv zusätzliche Restriktionsenzym-Schnittstelle

4.1.8.1 NCP7/Osloss Virus-Chimäre

Vorwärts-Primer (sense)

Name	Sequenz
3'-AatII	cgacgctc <u>cat</u> ggtggac
B1	ctcgtatacatattggac
B3	aaatctctgctgtacatggcacatg

Material und Methoden

B5	tgctccgacacaaaagat
B7	gtacaacattgaacctg
B9	tgacaccaatgccgagga
B10	attggtggccttatgagaca
B11	gcatgcaccttcaactacacaagaaca
B12	agtagttgaagtttggtg
B13	tccagatggtttgcccta
B14	ctacacaagaacattaaa
B17	aaaccctgagctgacca
B19	attgaagagatatcaggg
B36	tgagacaagcagctgtcg
B37	ccacaatatacaaaactt
B38	cagtccagacaattggc
B39	ggtgggctcccgcacat
B40	aaccagttgctaaactag
B42	gttgggatcacttagtt
B43	acatcaactatacaagg
B44	agccttgaagctctcag
B45	gggagttattagagcagg
B46	gctattgctacgttgccc
B47	gtgaggcaccagggtaat
B48	aattgttagagatctttc
B49	tgatgattggcaatcagg
B51	tcaatagggttgcaagga
B53	gccagagacaactccatc
B54	ctagcaaaaactggccatt
B54.5	cttatggcagctgtcgggtgc
B56	acgtccacggttggactag
BVK7	tttacgcgtccggttattttccacatatt
ncp710985sbfl	<u>actcctgcagg</u> tagagatctacggcttattggtg
ncp7xhol	ttggaggacaagcctcgagatgccacg
NS2OsNot	aatgcggccgccacgggaag
os nsi	aatgcatccactaaaatcagtgcaggtgatactgctaatggttggagggatggcaaaggcagaaccagg
os5120+	cggtgatctagaacacctag
Os5478+	accacaccaagggctccg
OSC1512A	ccacgggaagcccatcaccg gg gggatgactctagcgg
OsE2Kpnl	<u>ggt</u> accagtttgcaaaccggctttactacgcc
OsH1447AFspl	ggccttataataaagg <u>ctaagg</u> <u>tcgca</u> accagaccgtagc
OsI4617	ggtgatagcagcactcatagagc
OsI4996	ccttcaggcaggaacatagc
OsI6078	actacagaactcccaaaggc
OsI6596	accacaagaaacatggcag
OsI7118	tgaagacctaccagcagcag
osl7640sbfl	<u>tca</u> <u>cctgcagg</u> acagaatcatggaatccatctcag
oslKasl	agaaccaggcgcccagagcttcctag
OsNs3Age	accggttggcctacacacaccaagggcggc

Material und Methoden

OsNS4ANsi	gaatcatggaatccatctcagattatgcat
OsQcdelNsi	catagtaatgca <u>cc</u> actaaaatcagtgac
QCoslR1274Q	cagttgtc <u>acacag</u> tggaaagttgac
QCoslubiWT	cgctcgaggggtggtgggcctgccg

Revers-Primer (anti-sense)

Name	Sequenz
200R	gggcatgccctcgccac
380R	aactccatgtgccatgtacag
5'-Pvul-r	ctccgatcgtgtcagaag
B2R	ctcctctttctccaaaca
B10R	tcaccagacaaaccaaga
B19R	gaagtcagcccataggg
B40R	gtgccgtgtgtgtcccc
B50R	ggttaaaatccttaaggc
B58R	cctcacaagaggattcca
B60R	cataatatatacaaatacag
B61R	gggctgtaaggtcttc
IRES-UbiBgIIIrev	<u>agatctg</u> catggtattatcatcggttttcaaaggaaaaccac
ncp711090xhol-r	<u>atgctcga</u> gttatgacgggcacctccacatag
ncp712260xhol-r	<u>tatctcga</u> gtaagggtttcctagccaaccg
ncp7ns2Ubirev	<u>agatctg</u> catccttaggatccatcctaggtgttctag
NS2OslstopMlurev	<u>acgcgtc</u> tattttaagatccatcctaggt
os not rev	tggcggccgcatttagggcagttgccacccttc
OSC1512Arev	ccgctagagtcaccc <u>cgcg</u> gatgggctcccgtgg
OsH1447AFspl-r	gctacggctcgggt <u>gcgc</u> accttagcctttattataagggcc
Osl5531rev	cctcctcacttttagcaatgcg
Osl7628rev	tggaggtgtacagcagctc
oslEaglrev	gtggcggccgcatttagggcagttg
oslKaslrev	taggaagctctgggcgcctggttctg
OsNS4ANsirev	<u>gagct</u> atgcataatctgagatggattccatgattctgtcc
Osp7Nsirev	<u>atgca</u> tactatgatgtggtatataagtataacc
OsQcdelNsirev	gtcactgatttagtgggtgcattactatg
QCoslR1274Q-r	gtcaactttc <u>actgtgtg</u> acaactg
QCoslubiWT-r	cggcaggcccacc <u>acc</u> ctcagacg

4.1.8.2 Jiv Expressionskonstrukte

Vorwärts-Primer (sense)

Name	Sequenz
5-Ndel-tig	<u>catatg</u> caagtttcagttgaaaccactcaaggccttg
BamHI-5'-Jiv90	<u>ggatcc</u> atgtgcagccgatgccaggg
chisdelta	catttggttcacggatgtggcaccaccaccacc
Jiv265+	ccatggctggggttctgag
Jiv339BsmbI+	<u>cgtctc</u> catggataaagccacctggatc
Nco-5'-Jiv90	<u>ccatgga</u> atgtgcagccgatgccaggg

Material und Methoden

NcoJiv117	<u>ccatgggtatgaaacgaatggcagaaaatgagc</u>
pet28ncodel	gaaggagatataca <u>atgggcagcagc</u>
PstJiv90	<u>ctgcagatgtgcagccgatgccag</u>
QCflagmut	gactgcaggactacagggaggaggatgacaaggccatg
Ubi-N-his2	<u>ccgcggtggacatcaccatcaccatcac</u>

Revers-Primer (anti-sense)

Name	Sequenz
3'-Jiv90-Xho	<u>ctcgagcatccgtgaaccaaagatg</u>
3-Ndel-tig	<u>catatgcgctgctggttcacagctcgttgaaag</u>
chisdelta-rev	ggtggtggtggtgccacatccgtgaaccaaag
cldeIC60rev	<u>ctgcagctacagcctattacactcagcacagtatc</u>
Jiv194EcoRI-r	<u>gaattcaacgttgaagggcctcctc</u>
Jiv5pstlrev	<u>ctgcagctaagcacagtatctggccatg</u>
Jiv90stopEcoRI	<u>gaattcacatccgtgaaccaaagatgagatg</u>
pet28ncodel-r	gctgctgccattgtatatctcctc
pQE30rev	gttctgaggtcattactgg
QCflagmut-r	catggcctgtcatcctcctccctgtagtctgcagtc

4.1.8.3 NS2 Expressionskonstrukte

Vorwärts-Primer (sense)

Name	Sequenz
bsmbimistic	<u>cgtctcgcagatgtttgtacatttttgaaaaacatcaccgg</u>
bsmbINS2-1382	<u>cgtctcgcagatggcttacttaaccctg</u>
Nco1532NS2	<u>ccatgggtaactttgaaggac</u>
QChisXmistic	gcaccatcaccatcaccat <u>ggaccggaccggacc</u> aatgtttgtacatttttg
saciimistic	<u>ccgcggtggcatgtttgtacatttttgaaaaacatcaccgg</u>
SaciiNS2M1382	<u>ccgcggtggcatggcttacttaaccctggactttatg</u>
TEVE/Q2xQC	cctgtacttcc <u>aaggggagaacctgtacttccaagggg</u> ccatgg

Revers-Primer (anti-sense)

Name	Sequenz
cp7kpnrev	ggtctacctgctctaggtaccctggg
mysticnc03'	<u>ccatggcttcttttctccttcttcagatactgagatg</u>
NS2-1535BsmBI-rev	<u>cgtctccattcctcaaagttaccttccc</u>
QchisXmistic-r	caaaaaatgtacaaaacatt <u>gggccggtccgggtcc</u> atggtgatggtgatggtgc
TEVE/Q2xQC-r	ccatggcccctt <u>ggaagtacaggttctcccctt</u> ggaagtacagg

4.1.8.4 IR-Primer

Mit Fluoreszenzfarbstoff (IRD-800) markierte Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz
IR B6	ccctggtttctttcaag
IR B8	cacagctcactacctgt
IR B10	attggtggccttatgagaca
IR B10R	tcaccagacaaaccaaga

Material und Methoden

IR B12R	gcatcacat(c)gggcaa(g)ag
IR CITE440	atgctttacatgtgttagtgcg
IR GST-3'	cagggctggcaagccacgtttg
IR M13	gtaaaacgacggccagt
IR M13R	ggaaacagctatgacccatg
IR T3rev	aattaaccctcactaaaggg
IR T7	gtaatacgactcactatagggc
IR T7 pET	taatacgactcactatagggg
IR T7Term-rev	gctagttattgctcagcggtag

4.1.9 Verwendete Jiv-Expressionsplasmide

4.1.9.1 Expression in *E. coli*

Name	Kodierender Bereich		
	Jiv Sequenz (AS)	Fusionspartner	Tags
pGEX-Jiv90	533-622	GST	His
pUb-Flag-Jiv90	533-622	Ub	His, Flag
pUb-TEVTEV-Flag-Jiv90	533-622	Ub	His, Flag
pUb-TEVTEV-Flag-Jiv117	506-622	Ub	His, Flag
pUb-TEVTEV-Flag-Jiv194	506-699	Ub	His, Flag
pUb-TEVTEV-Flag-Jiv265	435-699	Ub	His, Flag
pTf-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv265	435-699	Trigger Factor, Ub	His, Flag
pTf-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv339	361-699	Trigger Factor, Ub	His, Flag

4.1.9.2 Expression in BHK-21

Name	Kodierender Bereich		
	Fusionspartner	Jiv Sequenz (AS)	
pGST-Jiv90	GST	533-622	Lackner et al., 2005
pGST-Jiv90 ΔC5	GST	533-617	
pGST-Jiv90 ΔC10	GST	533-612	
pGST-Jiv90 ΔC20	GST	533-602	
pGST-Jiv90 ΔC30	GST	533-592	
pGST-Jiv90 ΔC40	GST	533-582	
pGST-Jiv90 ΔC50	GST	533-572	
pGST-Jiv90 ΔC60	GST	533-562	
pGST-Jiv90 ΔN5	GST	538-622	
pGST-Jiv90 ΔN10	GST	543-622	
pGST-Jiv90 ΔN20	GST	553-622	
pGST-Jiv90 ΔN30	GST	563-622	
pGST-Jiv90 ΔN40	GST	573-622	
pGST-Jiv90 ΔN50	GST	583-622	
pGST-Jiv90 ΔN60	GST	593-622	
pGST-Jiv10 (ΔN20/ΔC60)	GST	553-562	diese Arbeit
pGST-Jiv90 AA 19/20	GST	533-622 K551+S552→AA	Lackner et al., 2005
pGST-Jiv90 AA 22/23	GST	533-622 R554+Y555→AA	
pGST-Jiv90 AA 24/25	GST	533-622 C556→A	
pGST-Jiv90 AA 26/27	GST	533-622 E558+C559→AA	

Material und Methoden

pGST-Jiv90 AA 28/29	GST	533-622 N560+R561→AA	
pGST-Jiv5 (Δ N20/ Δ C65)	GST	553-557	diese Arbeit

4.1.10 Verwendete NS2-Expressionsplasmide

Name	Kodierender Bereich		
	NS2 Sequenz (AS CP7)	Fusionspartner	Tags
pET26Ub-NS2 o. TM	1382-1589	Ub	-
pTf-Ub-TEVTEV-Flag-NS2 o. TM	1382-1589	Trigger Factor, Ub	His, Flag
pMistic-TEVTEV-StrepII-Flag-NS2	1137-1589	Mistic	His, Flag, StrepII

4.1.11 Verwendete Gesamtklone

pNCP7-5A	Zur Herstellung infektiöser RNA genomischer Länge von nzp BVDV NCP7 (Becher et al., 2000)
----------	---

Per RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Osloss-infizierten MDBK Zellen konnten cDNA-Fragmente gewonnen und in pNCP7-5A kloniert werden, die den jeweiligen Gen-Abschnitten des BVDV-1 zp Virus Osloss entsprechen. Somit wurden chimäre Gesamtklone erzeugt, die dann linearisiert, transkribiert und in MDBK Zellen elektroporiert wurden.

pNCP7/Osl Ub	Basiert auf pNCP7-5A; NotI-Agel von Osl (Bereich um Ub)
pNCP7/Osl NS2-Ub	Basiert auf pNCP7-5A; NS2-Agel von Osl
pNCP7/Osl E2-Ub	Basiert auf pNCP7-5A; E2-Agel von Osl
pNCP7/Osl Ub-NS4A	Basiert auf pNCP7-5A; NotI-NS4A von Osl
pNCP7/Osl E2-NS4A	Basiert auf pNCP7-5A; E2-NS4A von Osl
pNCP7/Osl NS2-4A	Basiert auf pNCP7-5A; NS2-NS4A von Osl
pNCP7/Osl NS2-4A H/A C/A	Basiert auf pNCP7/Osl NS2-4A; mit Punktmutationen H1447→A und C1512→A in NS2
pNCP7/Osl NS2-4A H/A C/A Ub wt	Basiert auf pNCP7/Osl NS2-4A H/A C/A; bovines wt Ub

4.1.12 Verwendete *E. coli* Stämme

HB101	Für Standard-Klonierungen
DH5 α	Für Klonierungen in pGEM-T, da dieser Stamm eine β -Galaktosidase-Blau/Weiß-Selektion erlaubt
GM33	Für Klonierungen; Dam- und Dcm-Methylierungs-negativ
BL21+pLys	Für Protein-Expressionen; mit Plasmid zur Expression von T7 Lysozym
BL21-RIL	Für Protein-Expressionen; enthalten zusätzliche Kopien der tRNA Gene argU, ileY und leuW

4.1.13 Verwendete eukaryontische Zellen

MDBK	Madin Darby Bovine Kidney Zellen, bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
BHK-21	Baby Hamster Kidney Zellen, Klon BSR, erhalten von J. Cox, Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tübingen
PT	Schaf-Nierenfibroblasten, von R. Riebe, Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald / Insel Riems
Sp2/0	Maus-Myelomzelllinie

4.1.14 Verwendete Viren

CP7	Zp BVDV-1 Stamm CP7, erhalten von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA (Corapi et al., 1988)
-----	---

Material und Methoden

NCP7	Nzp BVDV-1 Stamm NCP7, erhalten von E. J. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaka, New York, USA (Corapi et al., 1988)
Osloss	Zp BVDV-1 Stamm Osloss, erhalten von B. Liess, Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover (Renard et al., 1985)
NADL	Zp BVDV-1 Stamm NADL (National Animal Disease Laboratory), erhalten von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Collett et al., 1988b)
MVA	Rekombinantes Vaccinia Virus MVA (Modified Vaccinia Ankara)-T7pol, erhalten von G. Sutter, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (Sutter et al., 1995); Vermehrung am Institut für Virologie der JLU Gießen durch K. Müller

4.1.15 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung	Verwendung	Zusammensetzung (Lösungsmittel ist ddH ₂ O, sofern nichts Anderes angegeben ist)
10x LongRun-Konzentrat	Sequenzierung	162 g Tris; 27,5 g Borsäure; 9,3 g EDTA-Na ₂ ; mit ddH ₂ O auf 1 l
Anodenpuffer	SDS-PAGE	200 mM Tris/HCl pH 8,9
Blockierlösung	ELISA	10 % FCS (filtriert); 0,05 % Tween 20; in PBS
Borax-Puffer	Nassblot	10 mM Na-Tetraborat Dekahydrat
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 Hypoxanthin; 0,1 mg/l Biotin; 44 mM NaHCO ₃
Coating Puffer	ELISA	0,1 M Na-Carbonat pH 9,5 (700 ml 0,1 M NaHCO ₃ + 300 ml 0,1 M Na ₂ CO ₃)
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Gelfärbung	0,25 % (w/v) Coomassie Blau; 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
dNTP-Lösung	PCR	10 mM; jeweils 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Entfärbelösung	Coomassie-Gelfärbung	45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Entwickler	Silber-Gelfärbung	60 g/l Natriumcarbonat (wasserfrei), 0,05 % (v/v) 37 % Formaldehyd-Lösung, 4 mg/l Natriumthiosulfat
Fixierlösung	Silber-Gelfärbung	50 % (v/v) Ethanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (v/v) 37 % Formaldehyd-Lösung
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
HAT/HT Medium	Hybridomzellkultur	490 ml Hybridom Medium; 10 ml HAT/HT Supplement
Hepes Medium	Hybridomzellkultur	5 ml 1 M Hepes-Lösung; 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin; ad 500ml mit DMEM
Hybridom Medium	Hybridomzellkultur	200 ml DMEM; 100 ml F-10; 100 ml F-12; 75 ml FCS; 5 ml OPI; 5 ml 200 mM Glutamin; 5 ml 1M Hepes; 1,75 ml 50 mM β-ME; 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin
Kathodenpuffer	SDS-PAGE	100 mM TrisHCl pH 8,25; 100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
LB Medium	Flüssigkultur für Bakterien	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

Material und Methoden

LEW Puffer	Aufreinigung rekombinanter Proteine	300 mM NaCl; 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 % (v/v) Glycerin; 5 mM β-ME; pH 7,9
Low Melting Agarose	Plaque-Reinigung	1,5 g LMA auf 50 ml mit ddH ₂ O
Myelom Medium	Myelomzellkultur	450 ml DMEM; 75 ml FCS; 5 ml 200 mM Glutamin; 5 ml 1 M HEPES; 1,75 ml 50 mM β-ME; 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin
NS2-Puffer	Aufreinigung rekombinanter Proteine	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 300 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerin
NZCYM	Flüssigkultur für Bakterien	22 g Pulver auf 1 l mit ddH ₂ O
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 ⁺⁺	Immun-fluoreszenz	0,49 mM MgCl ₂ ; 0,68 mM CaCl ₂ in PBS
PBS-Tween	Western-Blot	0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Probenpuffer	Agarosegel-Elektrophorese	0,1 % (w/v) Orange-G; 30 % (v/v) Glycerin
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 X-100; 0,1 % BSA
SDS-Lysepuffer	SDS-PAGE	2 % (w/v) SDS; 6 M Harnstoff; 10 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Silberlösung	Silber-Gelfärbung	2 g/l Silbernitrat, 0,075 % (v/v) 37 % Formaldehyd-Lösung
Stop-Lösung	Sequenzierung	20 mM EDTA pH 8,0 und 300 mg/l Bromphenolblau in deionisiertem Formamid
TAE-Puffer	Agarosegel-Elektrophorese	2 % (v/v) modifiziertes TAE-Puffer-Konzentrat (50x Modified Tris-Acetate EDTA buffer, Millipore); 100 µg/l Ethidiumbromid
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
TMB Stock	ELISA	100 mg TMB; 40 ml DMSO
TMB Substrat	ELISA	1 ml TMB Stock; 300 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3; 1,5 µl 30 % H ₂ O ₂ ; auf 10 ml mit ddH ₂ O
Trocknerlösung	Silber-Gelfärbung	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Glycerin
Trypsin-Lösung	Zellkultur	2,5 g/l Trypsin; 16 mg/l Phenolrot; 3,3 mM EDTA in PBS

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit DNA

Einige Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden in Zusammenarbeit mit den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Bettina Schmidt, Martina Hell, Stefanie Schwindt und Sylvaine Jacobi hergestellt. Vorläufer-Plasmide waren zum Teil aus vorherigen Arbeiten von Dr. G. Rinck, Dr. T. Lackner und Dr. A. Müller bereits vorhanden.

4.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Präparation kompetenter *E. coli* Bakterien erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 10 ml LB Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. 1 ml der Bakteriensuspension diente am nächsten Morgen zum Beimpfen von 100 ml LB⁺⁺ Medium. Die Inkubation unter Schütteln bei 37°C erfolgte solange, bis die optische Dichte OD₆₀₀ einen Wert von 0,4 bis 0,55 erreichte. Die Bakteriensuspension wurde unter gelegentlichem Schwenken etwa 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 3.000 xg und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml kaltem TfBI resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in 4 ml TfBII gelöst. Die Suspension der kompetenten Bakterien wurde in 50 µl und 200 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

4.2.1.2 Glycerinkultur von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 10 ml LB Medium (evtl. zusätzlich Antibiotika) mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Bakterien wurden dann 10 min bei 3.000 xg und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml LB Medium resuspendiert. 700 µl dieser Suspension wurden in einem Kryoröhrchen mit 1 ml Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

4.2.1.3 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 Zellen (Birnboim und Doly, 1979) und anschließender Präzipitation der Plasmid-DNA. Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, vermitteln entweder eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin oder Kanamycin. Mit einer Einzelkolonie von einer Antibiotikumhaltigen Agarplatte (1,5 % Agar-Agar in LB Medium; 50 mg/l Ampicillin, bzw. Kanamycin)

wurden 3 ml eines Antibiotikum-haltigen (100 mg/l Ampicillin, bzw. 50 mg/l Kanamycin) LB Mediums beimpft. Die Flüssigkultur wurde unter Schütteln bei 37°C für mindestens sechs Stunden oder über Nacht inkubiert. 1,5 ml der gewachsenen Kultur wurden bei 16.000 xg für 30 s abzentrifugiert und das Pellet danach in 200 µl eiskaltem P1 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 200 µl P2 vermischt und unter Schütteln 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl P3 erfolgte die Zentrifugation bei 16.000 xg und 4°C für 10 min. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und bei 16.000 xg und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol auf dem Heizblock bei 50°C getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

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

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im größeren Maßstab zum Zwecke der weiteren Verwendung wurden die Anionen-Austauscher-Säulen Nucleobond® AX 100 und die mitgelieferten Puffer (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Im Regelfall wurde von einem Flüssigkulturvolumen von 50 ml ausgegangen; bei der Präparation von Plasmiden, welche das komplette pestivirale Genom in Form von cDNA enthalten (Gesamtklone) wurde das Volumen der Flüssigkultur 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 und Mischen lief die filtrierte Lösung durch eine mit 2,5 ml N2 äquilibrierte Säule. Nach dem Ablauf der Lösung wurde die Säule mit 10 ml N3 gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 3 ml N5 eluiert. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 3 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 16.000 xg und 4°C für 30-45 min. Nach dem Waschen mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol und Trocknen des Pellets auf dem Heizblock bei 50°C wurde die DNA in 180 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 2 µl der DNA-Lösung mit 98 µl ddH₂O verdünnt und die Absorption durch diese Lösung, gegen reines Wasser als Referenz, bestimmt. 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 50 ergab sich die DNA-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 2,5.

4.2.1.5 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, die z.B. durch Phagenbefall eingebracht werden kann. Diese unerwünschte Fremd-DNA wird fragmentiert und dadurch unschädlich gemacht; zelleigene DNA ist durch entsprechende DNA-Modifikationen (Methylierungen) vor dem Abbau geschützt. Die Endonukleasen bilden zusammen mit den Methylasen so genannte Restriktions-Modifikations-Systeme. Sowohl zur Analyse von DNA als auch für Klonierungszwecke wurden in dieser Arbeit Restriktionsenzymverdau durchgeführt. Die hierfür verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Die Reaktionsbedingungen zum Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen richteten sich bezüglich der Auswahl des Puffers, der Inkubationstemperatur und der Inkubationsdauer nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers und eigenen Erfahrungen. Die Inkubationsdauer betrug für analytische Verdau 30-60 min, für Klonierungen oder Linearisierungen im Allgemeinen 2-2,5 h. Der Enzymanteil im Ansatz sollte dabei 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Enzyme in glycerinhaltigen Puffern aufbewahrt werden und zu hohe Glycerinkonzentrationen 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 200 ng DNA aus Midi-Präparationen oder 1-3 μl der Lösung aus Mini-Präparationen mit ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut. Die Auswahl 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 etc.). Ein analytischer Verdau fand stets im 10 μl -Maßstab statt; hierzu wurde die DNA unter Zugabe von 10 % (v/v) eines passenden Puffers (meist NEB 10xPuffer 1, 2, 3 oder 4) und 1 % (v/v) BSA (NEB) durch Zugabe von 0,1-0,2 μl Restriktionsenzym (je nach Konzentration in U/ μl und Aktivität des Enzyms) für etwa 30 min bei der Enzym-abhängigen optimalen Temperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese und UV-Durchleuchtung (s.u.).

Material und Methoden

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur weiteren Klonierung (präparativer Verdau) wurde mit 3-5 µg Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen in 60 µl Ansätzen nach dem gleichen Schema verfahren. Wenn immer möglich, wurden Klonierungstechniken mit Restriktionsenzymen bevorzugt, bei denen auf beiden Seiten der DNA-Fragmente kompatible 5' oder 3' Überhänge bestehen blieben (sticky-sticky-Klonierung). 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 von sich aus ein solches Ende ohne Überhang erzeugen (z.B. EcoRV) oder der Überhang wurde 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 (10 mM) für weitere 15 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 diesem Fall wurde die Reaktion nach gleichzeitiger Zugabe von Klenow-Fragment und 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 xg für 5 min wurden Phenol-Reste durch die Zugabe von einem Volumen Chloroform zur wässrigen Phase entfernt und das Gemisch erneut zentrifugiert (s.o.). Die DNA wurde durch die Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol und $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Na-Acetat zur wässrigen Phase für 30 min bei -20°C gefällt und anschließend bei 16.000 xg und 4°C ebenso lange abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol und erneuter Zentrifugation (16.000 xg; 5 min) wurde das Pellet getrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

Um die intramolekulare Ligation der Molekülenden eines geschnittenen Vektors ohne Einbau des Inserts zu verhindern wurde bei Bedarf, vor allem aber bei Arbeiten mit glatten DNA-Enden, das geschnittene Vektor-Plasmid dephosphoryliert. Hierzu wurde nach dem Verdau der DNA 1 U Alkalische Phosphatase (CIP, calf intestine phosphatase; 1 U/µl;

Roche, Mannheim) zugegeben und die Reaktion 5 min bei 37°C inkubiert. Alternativ konnte 1 µl Antarctic Phosphatase (NEB) pro µg DNA zugesetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert werden. Der Vorteil letztgenannter Phosphatase besteht in der Möglichkeit sie anschließend durch Erhitzen für 5 min auf 65°C zu inaktivieren.

Die geschnittene DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und die entsprechende Bande unter UV-Durchleuchtung (312 nm) aus dem Gel ausgeschnitten (s.u.).

4.2.1.6 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). Standardmäßig 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 wurden diese im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer vermischt (0,1 % (w/v) Orange-G; 30 % (v/v) Glycerin). 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 25-30 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 Schonung der DNA (Vermeidung von Strangbrüchen) 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 Säulen des „Montage DNA Gel Extraction Kit“, die nach Vorschrift des Herstellers (Millipore) eingesetzt wurden. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 5.000 xg, bei der die festen Gelbestandteile in der Säule zurückgehalten werden, befindet sich die extrahierte DNA im Filtrat und kann direkt weiter verwendet werden.

Größere DNA-Fragmente aus Gesamtklonen wurden ohne direkte UV-Durchleuchtung aus

präparativen Gelen isoliert. Hierzu diente ein parallel gelaufenes Aliquot der geschnittenen DNA als Größenmarker. Nach dem „blinden“ Ausschneiden des Fragmentes auf gleicher Höhe im Gel wurde der Erfolg erst nach der Isolierung im UV-Durchlicht begutachtet.

4.2.1.7 Ligation und Transformation in *E. coli*

Die isolierten Vektoren und Inserts (s.o.) wurden unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (NEB) neu zusammengefügt. 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.

Im Regelfall wurden 2 µl Vektor-DNA-Lösung und 6,5 µl Fragment-DNA-Lösung zusammen mit 1 µl Ligase-Puffer (10x; NEB) und 0,5 µl T4 DNA-Ligase (NEB) vermischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Im Falle einer Ligation mit drei DNA-Fragmenten wurden 1,5 µl Vektor- und jeweils 3,5 µl Fragment-DNA-Lösungen eingesetzt. Zu jeder Ligation wurde parallel auch eine Religations-Kontrolle angesetzt. Diese bestand aus den gleichen Komponenten wie der Ligations-Ansatz, 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 nach dem Auftauen auf Eis zum Ligations- und Religationsansatz pipettiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Die Zellen wurden danach 2 min auf Eis abgekühlt und mit 100 µl LB Medium vermischt. Bei Transformation von Plasmiden mit Kanamycin-Resistenz und bei Gesamtklonen wurde die Bakteriensuspension zuerst noch für 30-40 min bei 37°C geschüttelt, Ampicillin-resistente Zellen jedoch gleich auf einer Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatte (50 mg/l Ampicillin, bzw. Kanamycin) ausplattiert. Die Inkubation bei 37°C über Nacht erlaubte das Heranwachsen von Kolonien.

Zum Zwecke der Retransformation bereits isolierter Plasmide (z.B. zur Vermehrung nach einer Mini-Präparation im Midi-Maßstab) wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren, 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.

4.2.1.8 PCR und RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen selektiven

Material und Methoden

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 Plusstrang-Primer (Vorwärts-Primer) bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNA, während das als Minusstrang-Primer (Revers-Primer) bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen (Denaturierung) lagern sich beide Oligonukleotide bei Absenken der Reaktionstemperatur 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 mehrfach wiederholt, was zur exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes in der Reaktion führt. Durch Verlängerungen an den 5'-Enden der verwendeten Primer können an den Enden des gesuchten Fragmentes auch beliebige Sequenzen in das PCR-Produkt 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.

Standardmäßig wurden PCRs zur späteren Klonierung der Produkte im 50 µl Maßstab durchgeführt. 30 ng des als Template dienenden Ausgangs-Plasmides wurden hierzu mit jeweils 2 µl beider Primerlösungen (10 pmol/µl), 2 µl 10 mM dNTP-Lösung (jeweils 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 µl Puffer (10x Puffer, NatuTec), ddH₂O und 0,5 µl Taq 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. Bei Verwendung des Gerätes der Firma Finnzymes entfiel dieser Schritt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 2 min und dann 30 Zyklen aus Denaturierung (94°C, 30 s), Hybridisierung (50-56°C [4-6°C unter der Primer-Schmelztemperatur], 45 s) und Synthese (72°C, 30 s je kb). Es folgte eine abschließende Elongation von 5 min bei 72°C und die Abkühlung der Reaktion auf 4°C.

Solche PCR-Reaktionen wurden in dieser Arbeit vor allem dazu genutzt, um Verkürzungsstufen von NS2 und Jiv herzustellen, oder um für Epitope kodierende (z.B. His-Epitop) oder andere Sequenzen (Ub, Mistic, Tf, TEV-Schnittstellen, usw.) einzufügen. Sofern möglich, wurden die Primer für das 5' und 3' Ende des PCR-Produktes so gestaltet,

Material und Methoden

dass der spätere Einbau in den Expressionsvektor so unkompliziert und mit so wenigen zusätzlich exprimierten Aminosäuren wie möglich vonstatten ging. Die Restriktionsenzym-Schnittstelle von BsmBI wurde gelegentlich verwendet, um am N-terminalen Ende von PCR-Produkten beliebige 5'-Überhänge mit einer Länge von vier Nukleotiden nach Wunsch zu erzeugen, z.B. wenn die Verwendung anderer Enzyme aufgrund intern vorhandener Schnittstellen nicht möglich war. Auf diese Weise konnten bevorzugte Schnittstellen in der Vektor-DNA auch in solchen Fällen zur Klonierung des Fragmentes verwendet und die Zahl zusätzlicher fremder Aminosäuren im exprimierten Protein verringert werden. Das Design der zu bestellenden 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.

Reverse Transkriptionen mit nachfolgender DNA-Amplifikation (RT-PCR) wurden zur Gewinnung von viralen Gensequenzen aus Gesamt-RNA-Präparationen infizierter Zellen durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Startmix (50 pmol Revers-Primer; 1-2 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 sein Template zu erreichen. Nach Zugabe des RT-Mixes aus 8 µl Puffer A, 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor (HPR I, bzw. RNase OUT) und 0,5 µl Reverser Transkriptase (Superscript II RT; 200 U/µl) wurde die Reverse Transkription 40 min bei 37°C durchgeführt, dann 2 min bei 80°C denaturiert und nach 2 min bei 20°C auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe des PCR-Mixes aus 10 µl Puffer B, 50 pmol des zweiten (Vorwärts-)Primers, 1 µl Taq DNA-Polymerase und Auffüllen mit ddH₂O auf insgesamt 50 µl wurde ein normales PCR-Programm mit 30 Zyklen gestartet (s.o.).

Für das Amplifizieren größerer Nukleinsäure-Abschnitte, insbesondere viraler Sequenzen, wurde die Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche) in Verbindung mit dem Expand Long Template PCR Kit (Roche) verwendet. Dieses System ermöglichte eine Reverse Transkription bei höheren Temperaturen (bis 65°C), wodurch die Sekundärstruktur-reiche virale RNA besser amplifiziert werden konnte. Zudem wurden so Genfragmente von bis zu 3,7 kb in ausreichenden Mengen für eine Direktsequenzierung (s.u.) gewonnen. 50 pmol des Revers-Primer und 1-2 µg Gesamtzell-RNA infizierter Zellen wurden dabei mit RNase-

Material und Methoden

freiem ddH₂O ad 13 µl aufgefüllt, für 10 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe des RT-Mixes aus 4 µl Transcriptor RT Reaction Buffer (5x; Roche), 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor (HPR I, bzw. RNase OUT), 2 µl 10 mM dNTP-Lösung und 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche) wurde die Reverse Transkription 30-60 min (je nach Länge der zu synthetisierenden cDNA) bei 50-65°C durchgeführt, dann die Reverse Transkriptase durch 5 min bei 85°C inaktiviert und wieder auf 4°C abgekühlt. Der folgende PCR-Mix bestand dann aus 10 µl des RT-Ansatzes, 5 µl des Expand Long Template Buffer 3 (10x; Roche), 2,5 µl 10 mM dNTP-Lösung, je 20 pmol der beiden Primer, 0,75 µl des Expand Long Template Enzyme Mix (Taq und Tgo DNA-Polymerase) und ddH₂O auf insgesamt 50 µl. Das PCR-Programm begann mit Erhitzen für 2 min auf 92°C, gefolgt von 10 Zyklen aus 10 s 92°C, 30 s 56-65°C (4-6°C unter der Primer-Schmelztemperatur) und 1 min pro 1,5 kb bei 68°C. Danach folgten weitere 20 Zyklen mit von Zyklus zu Zyklus um je 20 s verlängerter Elongations-Zeit. Die Reaktion endete mit einer abschließenden Elongation von 7 min bei 68°C und der Abkühlung auf 4°C.

Das Ergebnis jeder (RT-)PCR wurde durch Agarosegel-Elektrophorese auf Größe und Reinheit des Produktes hin überprüft. Die amplifizierte DNA wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Durchlicht-Kontrolle (312 nm Wellenlänge) aus dem Gel ausgeschnitten und über eine Säule des „Montage DNA Gel Extraction Kit“ (Millipore) zurückgewonnen (s.o.).

RT-PCR-Amplifikate die direkt sequenziert werden sollten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des „Qiaquick® Gel Extraction Kit“ (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde mit dem „Quant-iT™ DNA BR assay kit“ (Invitrogen) und dem Fluorometer Qubit (Invitrogen) bestimmt.

Standard-PCR-Fragmente wurden mit dem pGEM®-T Vektor System I kloniert. Dabei wurden 3 µl der DNA-Lösung mit 1 µl pGEM-T Vektor (54 ng/µl), 5 µl des mitgelieferten 2x Puffers und 1 µl (35 U) der mitgelieferten T4 DNA-Ligase gemischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Der gesamte Ligations-Ansatz wurde zur Transformation von 50 µl einer Suspension mit kompetenten *E. coli* DH5α Bakterien verwendet, die eine β-Galaktosidase-vermittelte blau/weiß-Selektion erlauben. Das Gemisch aus Bakterien und Ligations-Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert; nach dem Hitzeschock (2 min bei 42°C), Abkühlen auf Eis (2 min) und der Zugabe von 100 µl LB Medium wurden die Zellen für 20 min bei 37°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren auf einer Ampicillin-haltigen (50 mg/l) Agarplatte erfolgte die Zugabe von 20 µl einer 4 %igen (w/v) X-Gal-Lösung.

Größere RT-PCR-Amplifikate wurden nicht in den pGEM-T-Vektor ligiert, sondern die aus dem Gel gewonnene DNA wurde mit Restriktionsenzymen an den Enden „nachgeschnitten“ und nach dem Verdau wiederum über ein Agarosegel aufgereinigt und ausgeschnitten. Die Gewinnung der DNA-Lösung erfolgte wieder per „Montage DNA Gel Extraction Kit“ (Millipore) und das Fragment wurde dann über eine „sticky-sticky“-Ligation in den passend geschnittenen Vektor ligiert.

4.2.1.9 Gerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden über die QuikChange™ Methode (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers in die entsprechenden Plasmide eingeführt. Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte ebenfalls nach den Empfehlungen von Stratagene: Zur Generierung einer Mutation werden immer zwei Oligonukleotide benötigt, die jeweils komplementär zum identischen Bereich beider Stränge der DNA-Matrize sind und die gewünschte Mutation tragen. Diese Oligonukleotide 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. Meist enthielten die Oligonukleotide zusätzlich zur eigentlichen Mutation noch eine zusätzliche Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, deren Einbau keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins hatte (silent marker site). Diese Schnittstelle erleichterte später die Analyse auf Vorhandensein der Mutation bei weiteren Klonierungsschritten.

Die beiden Oligonukleotide dienten als Primer in einer PCR-Reaktion mit dem wt-Plasmid als Matrize, in deren Verlauf das gesamte Plasmid mit der gewünschten Mutation amplifiziert werden konnte. Hierzu wurden im 50 µl Ansatz zu ddH₂O 30 ng wt-Plasmid, je 10 pmol von beiden Primern, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 µl 10x Puffer (Pfu-Polymerase, Promega) und 1 µl Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/µl; Promega) gegeben. Im Thermocycler erfolgten nach einmaligem Erhitzen auf 95°C für 30 s dann 20 Zyklen mit 30 s Denaturierung (95°C), 1 min Hybridisierung (50-52°C) und 2 min je kb Plasmidlänge Synthese (68°C). Zum Abschluss wurde die Reaktion nach fünfminütiger Inkubation bei 68°C auf 4°C gekühlt und 5 µl zur späteren Analyse abgenommen. Der Rest wurde für eine Stunde bei 37°C mit 1 µl DpnI (10 U/µl) inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur methylierte, d.h. die aus Bakterien (*E. coli*) stammende DNA, nicht aber die während der PCR in vitro entstandene unmethylierte DNA. Auf diese Weise wird die wt-Matrize zerstört. Nach dem Verdau mit DpnI wurde erneut eine 5 µl Probe aus der Reaktion entnommen

und zusammen mit der ersten Probe über Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Eine kaum 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.

1,5 µl der Reaktion wurden 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.

4.2.1.10 DNA-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. Jede dieser Reaktionen enthält sowohl ddH₂O, Puffer, DNA-Polymerase, den Sequenzier-Primer sowie alle vier dNTPs. In den einzelnen Reaktionsansätzen befinden sich neben diesen regulären dNTPs in einem gewissen Verhältnis auch jeweils eine Sorte ihrer 2'3'-Dideoxy-Analoga (ddCTP, ddATP, ddTTP oder ddGTP). Diese Analoga werden von der Polymerase genauso 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; in der ersten Reaktion sammeln sich alle Fragmente, die mit einem C enden, in der zweiten die mit A, in der dritten die mit T und in der letzten alle mit einem G am Ende. Die Auftrennung der DNA-Moleküle aus den einzelnen Proben in vier benachbarten Spuren eines hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgels erlaubt einen Nachweis der entstandenen Fragmente, auch wenn der Größenunterschied nur ein Nukleotid beträgt. Da der zur Reaktion verwendete 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 softwaregestützt

ausgelesen werden.

Für Standard-Sequenzierungen wurden Plasmid-DNAs aus Mini- oder Midipräparationen verwendet. Pro Plasmid kamen etwa 0,2 µg Midi-DNA je kb Plasmidlänge bzw. 12-15 µl Mini-Plasmid-DNA zum Einsatz. Nach Zugabe von 2 pmol des passenden IRD-800-gekoppelten Primers und Auffüllen mit ddH₂O auf insgesamt 25 µl wurde das Gemisch zu je 6 µl auf vier PCR-Gefäße verteilt und dabei zu jeweils 2 µl G-, A-, T- oder C-Mix aus dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTP™“ (Amersham) pipettiert und nach Mischen im Thermocycler inkubiert (2 min 40°C; 2 min 95°C; 30 Zyklen aus 30 s 94°C, 30 s 50°C und 45 s 70°C; gefolgt von 5 min 70°C und Abkühlen auf 4°C). Die Reaktionen wurden anschließend 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-Sequencer (Licor). 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 Polyacrylamidlösung mittels Spritze durch einen 0,45 µm-Filter zwischen die Platten gegossen. Als Elektrophoresepuffer diente eine 1:10 Verdünnung des 10x LongRun-Konzentrates. Die Polyacrylamidlösung für lange Gele (4 %) bestand aus 32 ml Sequagel® XR (national diagnostics), 8 ml Sequagel-Puffer, 2 ml 10x LongRun-Puffer, 15 ml ddH₂O, 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. Nach dem Auffüllen der Puffer-Tanks mit LongRun-Puffer folgte ein Vorlauf für 30 min (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 1,2 µl der entsprechenden Proben aufgetragen und die Hochspannung zu 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 Gel-Abbild konnte schon während des Laufes betrachtet und später mittels zugehöriger Software (Programm ImageAnalysis)

automatisch oder manuell ausgewertet werden.

Ein Teil der Sequenzierungen wurde nicht selbst, sondern von den kommerziellen Anbietern Qiagen und Agowa durchgeführt. Hierzu wurden die DNA-Lösungen und Primer zu den Firmen gesendet und die Sequenzdaten dann von diesen erhalten.

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, gespeichert und durch einen Ausdruck dokumentiert.

4.2.1.11 Bestimmung der Nukleotidsequenz des chimären Virus

Zur Ermittlung der Nukleinsäure-Sequenz des in dieser Arbeit beschriebenen Virus wurden MDBK Zellen mit Plaque-gereinigtem Virus infiziert (MOI = 0,1) und nach 30-40 h die Gesamt-RNA aus diesen Zellen isoliert. Jeweils 1-2 µg dieser RNA wurden dann eingesetzt, um per RT-PCR insgesamt 9 überlappende Virus-Genom-Fragmente in cDNA zu transkribieren und zu amplifizieren. Die Fragmente wurden in Agarosegelen aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Nach Messung der DNA-Konzentration wurden die Lösungen zur Sequenzierung mit Virus-Sequenz-spezifischen Primern zur Firma Qiagen gesandt und die dann erhaltenen Sequenzdaten ausgewertet. Diese Form der Direktsequenzierung der RT-PCR-Fragmente wurde gewählt, da vorhergehende Versuche der Sequenzierung von in bakterielle Plasmide klonierten Amplifikaten zu sehr heterogenen Sequenzdaten geführt hatten. Die direkte Sequenzierung ohne Klonierung ergab hingegen eine Art Master- oder Konsensus-Sequenz, welche die Nukleotide zeigte, die in der Mehrheit der PCR-Amplifikate vorhanden waren.

Das Fragment 3'-5' wurde gemäß der von Prof. Dr. P. Becher beschriebenen Methode (Becher et al., 2000) erhalten. Die Amplifizierung des 5'- und des 3'-Endes des Virusgenoms gelang dabei durch eine vorhergehende Ligation der Virus-RNA zu einem zirkulären Molekül mit Hilfe der T4 RNA-Ligase (NEB). 1 µl der so behandelten Gesamtzell-RNA-Präparation wurde zur Gewinnung von cDNA mittels Transcriptor Reverse Transcriptase und dem Primer 380R genutzt. 2 µl dieser Reaktion wurden dann als Template in einer Standard-PCR mit Taq DNA-Polymerase und den Primern B54 und

380R eingesetzt, von welcher dann wiederum 2 µl in einer zweiten, so genannten „nested PCR“, mit den Primern B56 und 200R als Template dienten. Das daraus erhaltene etwa 300 bp große Fragment konnte dann direktsequenziert werden.

4.2.2 Arbeiten mit RNA

4.2.2.1 In vitro Transkription

Die in vitro Transkription von RNA auf der Grundlage von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Kits MAXIscript™ (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 Verdau mit einem singular schneidenden Restriktionsenzym (i.d.R. SmaI) linearisiert. Pro Reaktion wurden 5 µg Plasmid-DNA verdaut und anschließend durch die Zugabe von 10 % (v/v) 3 M Natriumacetat-Lösung und zwei Volumen Ethanol bei -20°C für mindestens 15 min gefällt und bei 16.000 xg und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 13,5 µl RNase-freiem ddH₂O resuspendiert. 1 µl der DNA-Lösung wurden durch Agarosegel-Elektrophorese begutachtet und 12 µl davon dann in der Transkriptions-Reaktion eingesetzt, zusammen mit 2 µl Transkriptionspuffer, jeweils 1 µl ATP, CTP, GTP und UTP (je 10 mM) und 2 µl des SP6-Enzym-Mix. Die Transkription fand für eine Stunde 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 erzeugt worden war („run-off transcription“). Der minimale SP6 Promotor besteht aus 18 Nukleotiden (ATTTAGGTTGACACTATAGAAGNG; unterstrichen: minimale Sequenz; **fett**: erstes transkribiertes Nukleotid).

Die Qualität der transkribierten RNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese von 1 µl des Ansatzes beurteilt und die Konzentration konnte mittels „Quant-iT™ RNA assay kit“ (Invitrogen) und dem Fluorometer Qubit (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben gemessen werden. Die RNA wurde in Aliquots bei -70°C gelagert und dann zur Elektroporation in MDBK Zellen verwendet (s.u.).

4.2.2.2 RNA-Isolierung aus Zellen

RNA-Präparationen aus eukaryontischen Zellen wurden entweder mit Hilfe des Systems

Material und Methoden

Nucleospin® RNA II der Firma Macherey-Nagel oder des Systems RNeasy® der Firma Qiagen nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Beispielfhaft wird nachfolgend die Anwendung des erstgenannten Kits beschrieben.

Vor der Präparation wurden die benötigte RNase-freie DNase-Lösung (1 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 Überstandes 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 xg für 1 min. Um in der homogenisierten Lösung die benötigten RNA-Bindungs-Konditionen einzustellen, erfolgte die Zugabe von 350 µl 70 % (v/v) Ethanol bevor das vermischte Lysat auf eine Nucleospin® RNA II Säule geladen und für 30 s bei 8.000 xg zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte die Entsalzung der Silikamembran durch 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) und Zentrifugation bei 11.000 xg für 1 min. Für den Verdau gebundener DNA wurden 10 µl der 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 xg für 30 s) gewaschen. Der zweite Waschschrift wurde mit 600 µl RA3 (8.000 xg für 30 s), der dritte mit 250 µl RA3 (11.000 xg für 2 min) durchgeführt. Die gereinigte RNA konnte dann aus der getrockneten Membran durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem ddH₂O und Zentrifugation für 1 min bei 11.000 xg 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. 2 µl der RNA-Lösung wurden hierzu mit 98 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 und dem Verdünnungsfaktor 50 ergab sich die RNA-Konzentration in µg/µl durch Multiplikation des gemessenen Wertes der Absorption mit dem Faktor 2.

4.2.3 Arbeiten mit Proteinen

4.2.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine in Bakterien erfolgte über ein induzierbares T7 Expressionssystem in *E. coli*, Stamm BL21+pLys (Novagen). Dieser besitzt ein genomisches Integrat eines Fragments des λ -Phagenstamms DE3 und damit das Gen für die RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors. Daneben enthält dieser Stamm ein Chloramphenicol-Resistenz vermittelndes Plasmid pLys welches für das T7 Lysozym kodiert. Die Expression geringer Mengen T7 Lysozyms verhindert eine basale Protein-Expression vor der eigentlichen Induktion und erleichtert die Zelllyse (Studier, 1991). Die für das gewünschte Protein kodierende Sequenz wird in Kanamycin-Resistenz vermittelnde pET Plasmide (Novagen) kloniert, so dass eine Expression über T7 Transkriptions- und Translationssignale stattfindet (Studier et al., 1986; Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1990).

Fast alle in dieser Arbeit bakteriell hergestellten Proteine wurden zur Verbesserung des Expressionslevels und der Löslichkeit als Fusionsproteine exprimiert. Dazu wurden an den N-Terminus ihrer kodierenden Sequenz die Gene von Proteinen angefügt, welche die Expression, Stabilität, Faltung und Löslichkeit von Fusionspartnern gewährleisten. Zu diesem Zweck wurden Ubiquitin von *S. cerevisiae* (Butt et al., 1989; Yoo et al., 1989) (gewonnen aus dem Plasmid pET26Ub), Trigger Factor von *E. coli* (Thapa et al., 2008) (gewonnen per PCR aus dem Plasmid pTf16) und Mistic von *B. subtilis* (Roosild et al., 2005) (gewonnen per PCR aus einer *B. subtilis* Gesamt-DNA-Präparation) genutzt.

Zur Detektion mit mAk und zur Affinitätsreinigung wurden die Fusionsproteine zudem mit Tags versehen. Verwendet wurden: HexaHis-Tag (HHHHHH), Flag-Tag (DYKDDDDK), StrepII-Tag (WSHPQFEK) und c-Myc-Tag (EQKLISEEDL).

Zur Spaltung der Proteine mittels der TEV-Protease wurden zwei aufeinanderfolgende Schnittstellen (ENLYFQGENLYFQG) zwischen die Fusionspartner eingefügt.

BL21+pLys wurden mit dem für das entsprechende Protein kodierenden Plasmid transformiert und auf LB Agarplatten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin und 34 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol ausplattiert. Mit einer Bakterienkolonie wurden 10 ml NZCYM Medium (50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, 34 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol, 1 % Glukose) angeimpft und über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 1 Liter NZCYM Medium, welches 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin und 34 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol enthielt, angeimpft. Die Bakterien wurden unter Schütteln bei 37°C kultiviert bis ein OD_{600} Wert von 1-1,5

Material und Methoden

erreicht wurde. Dann wurde die Proteinsynthese durch Zugabe des Laktose-Analogons Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 0,5 mM Endkonzentration) 4 h lang bei 25°C (Jiv-Derivate, NS2-Verkürzungen, TEV-Protease), bzw. über Nacht bei 18°C (Mistic-NS2) induziert. Die Kultur wurde anschließend 20 min bei 5.000 xg abzentrifugiert und durch dreimaliges Frieren/Tauen des Bakterienpellets die zytosolischen Proteine freigesetzt. Das Pellet wurde in 50 ml LEW Puffer (mit 25-50 mM Imidazol, bzw. ohne Imidazol bei Aufreinigung über Protino Säulen), bzw. NS2-Puffer (Mistic-NS2) resuspendiert und die bakterielle chromosomale DNA durch Ultraschall geschert, wodurch die Viskosität abnahm. Danach wurde das Lysat durch eine „Lowspeed“-Zentrifugation (20 min bei 4.000 xg) vorgereinigt.

In Inclusion Bodies vorliegende unlösliche Proteine (etwa das Mistic-NS2 Fusionsprotein) befanden sich dann in diesem Lowspeed-Pellet und wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Dazu wurde das Pellet in Puffer mit 4 M Guanidinium-HCl resuspendiert und die weitere Aufreinigung erfolgte analog der Aufreinigung des Lowspeed-Überstandes löslicher Proteine.

Lösliche Proteine befanden sich im Überstand der Lowspeed-Zentrifugation. Dieser Überstand wurde 1 h bei 120.000 xg und 4°C ultrazentrifugiert und mit einem 0,45 μ m Filter filtriert. Das geklärte Lysat wurde dann entweder per FPLC-Apparatur über eine 1 ml HiTrap™ IMAC affinity Säule (mit Ni²⁺ oder Co²⁺) oder manuell per Schwerkraft über eine mit Protino® Ni-TED Resin bepackte Säule gereinigt.

Die Aufreinigung von Proteinen per Säulen-Affinitäts-Chromatographie mit immobilisierten Metall-Ionen (IMAC) beruht auf der spezifischen Interaktion von Metall-Ionen und bestimmten, auf der Oberfläche von Proteinen exponierten, Seitenketten von Aminosäuren (meist Histidin). Die Anwesenheit mehrerer AS-Seitenketten nebeneinander, wie etwa im HexaHis-Tag, erhöht die Affinität deutlich. Im Einzelnen werden Schwermetall-Ionen (etwa Nickel²⁺ oder Cobalt²⁺) durch eine chelierende Matrix (an Agarose kovalent gebundenes Nitrilotriacetat (NTA) oder an Silica kovalent gebundenes Tris-carboxymethyl-ethylen-diamin (TED)) immobilisiert. Das His-getaggte Protein wird mit hoher Affinität an der stationären Metall-Matrix gebunden, da die Imidazol-Ringe des Hexa-Histidin-Tags den Chelatkomplex um das Metall-Ion zu einem 6-fach koordinierten Komplex vervollständigen können. Die Elution erfolgt durch Konkurrenz mit aufsteigenden Konzentrationen von Imidazol (bis zu 500 mM).

Im Falle der Aufreinigung per HiTrap Säule und Chromatographie-Anlage (ÄKTApurifier)

wurde die Protein-haltige Lösung mit einer Geschwindigkeit von 0,7 ml/min auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 10 ml Imidazol-haltigem LEW Puffer (25-50 mM) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mittels eines isochratischen Imidazol-Gradienten (Flussrate: 0,7 ml/min), der durch die Mischung von LEW Puffer ohne und mit 500 mM Imidazol entstand. Dabei wurden 1 ml Fraktionen gesammelt.

Bei der manuellen Aufreinigung über Säulen mit Ni-TED Resin lief das geklärte Lysat zweimal durch die äquilibrierte Säule und es wurde mit 10 ml Puffer (LEW bzw. NS2) ohne Imidazol nachgewaschen. Die Elution erfolgte stufenweise mit Pufferlösungen steigender Imidazol-Konzentration (bis 200 mM). Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen aufgefangen.

Von jeder Fraktion wurden 10 µl auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel (s.u.) aufgetragen und nach einer Coomassie-Färbung diejenigen identifiziert, in denen das Protein eluierte. Anschließend wurden die Fraktionen, bei denen die größte Menge reinen Proteins auftrat, vereinigt und gegen LEW Puffer zu einer Imidazol-Endkonzentration von 25 mM über Nacht bei 4°C dialysiert.

4.2.3.2 Expression, Aufreinigung und Spaltung mit der TEV-Protease

Nach der Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde der N-terminale Fusionspartner nicht mehr benötigt und sollte daher abgespalten werden. Dazu wurde eine Protease des Tobacco Etch Virus genutzt, da diese mit hoher Spezifität spaltet, selbst hergestellt und nach der Spaltung über einen Affinitäts-Tag wieder herausgereinigt werden konnte.

Das Plasmid pRK793 trägt ein Ampicillin-Resistenz-Gen und kodiert für eine N-terminal HexaHis- und C-terminal PentaArg(RRRRR)-getaggte Mutante der TEV Nuclear Inclusion a (Nla) Protease. Der Aminosäureaustausch von S zu V an Position 219 führt zu einer Steigerung der Enzymeffizienz und zu einer hundertfachen Verminderung der Selbstinaktivierung (Kapust et al., 2001).

Expression und Aufreinigung der Protease erfolgte gemäß oben genanntem Protokoll zur Aufreinigung rekombinanter Proteine per HiTrap Säule und FPLC-Anlage. Mit folgenden Unterschieden:

Zur Expression wurden BL21-RIL Bakterien in LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 die Protein-Expression mit 1 mM IPTG für 4 h bei 30°C induziert. Die Aufreinigung fand in Puffer mit 100 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 % (v/v) Glycerin und 25 mM Imidazol (pH 7,9) statt

und die gepoolten Eluat-Fractionen wurden mit EDTA und DTT in einer Endkonzentration von jeweils 1 mM versetzt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Spaltung von rekombinanten Proteinen, welche stets zwei aufeinanderfolgende Spaltstellen für die TEV-Protease (AS-Sequenz: ENLYFQG; Spaltung zwischen Q und G) enthielten, erfolgte durch Mischen von Protease- und Protein-Lösung im Verhältnis von 1:50 bis 1:100 und Inkubation bei 16°C über Nacht.

Nach der Spaltung konnten die Protease, der N-terminale Fusionspartner sowie Reste ungespaltenen Proteins durch eine His-Affinitäts-Chromatographie (s.o. und Abbildung 11) aus dem Proteingemisch herausgefungen werden. Das gewünschte Protein befand sich dann im Durchfluß der Säule (subtraktive Aufreinigung).

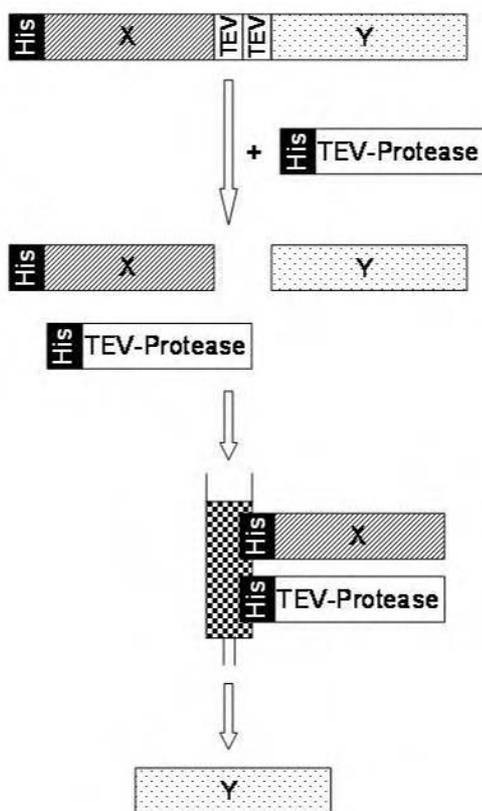


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der subtraktiven Aufreinigung

Ein N-terminal His-getaggttes gereinigtes Fusionsprotein wird durch Inkubation mit einer His-getaggtten Protease an der spezifischen Spaltstelle (TEV) gespalten. Nach der Spaltung wird das Proteingemisch über eine IMAC Säule gegeben, so dass die Protease, das N-terminale Spaltprodukt (His-X) und Reste ungespaltenen Proteins an die Säulenmatrix binden. Das gewünschte Protein (Y) findet sich im Durchfluß.

4.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde über den BCA-Assay (BCA = Bi-chinolin-dicarbonsäure-Assay; BCA Protein Assay Kit; Fa. Pierce) nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Die Inkubation der BSA-Verdünnungsreihe und der zu messenden Probe mit den Reagenzien erfolgte bei 60°C für 30 min. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Extinktion im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand der BSA-Standardkurve berechnet.

Meist genügte es jedoch die Proteinkonzentration über einen Coomassie-Spot-Test abzuschätzen. Dazu wurden je 5 µl einer BSA-Verdünnungsreihe und daneben je 5 µl von Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinlösung auf ein Filterpapier pipettiert und trocknen gelassen. Anschließend wurde das Papier mit Coomassie-Lösung 1 min lang gefärbt und dann wieder entfärbt. Anhand des Vergleiches der Färbintensitäten von Proteinprobe und BSA-Standard konnte dann der Proteingehalt abgeschätzt werden.

4.2.3.4 SDS-PAGE

Für die Durchführung von Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen in Tracingelen (Schägger und Jagow, 1987) kamen für kleine Gele (8,5 x 6,0 cm) Gelapparaturen aus der Werkstatt des MZI (JLU Gießen) und für große Gele (13 x 15 cm) Apparaturen der Firma Hoefer zum Einsatz. 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 hatte eine Konzentration von 40 % (w/v) und Bestand im Verhältnis 29:1 aus Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid.

Die Proben wurden zur Denaturierung in SDS-Lysepuffer mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 10 min auf 94°C erhitzt. Als Molekulargewichts-Größenstandard diente ein auf jedes Gel aufgetragener gefärbter Protein-Marker (Prestained Protein Marker, Fermentas; NEB).

Als Laufpuffer zur Elektrophorese dienten Anoden- und Kathodenpuffer; die angelegte elektrische Spannung betrug bei kleinen Gelen 120 V für etwa 60 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 in der Regel abgebrochen, sobald die Bromphenolblau-Front an der Anoden-Seite des Gels ausgetreten war.

Nach Abbau der Gelapparatur wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel entweder zur Durchführung eines Western Blots verwendet (s.u.) oder mit Coomassie-Lösung gefärbt. Dabei wurde das Gel für 20-30 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung geschüttelt. Das Gel wurde dann unter Vakuum bei 65°C auf Filterpapier getrocknet.

4.2.3.5 Silberfärbung

Alternativ zur Färbung mit Coomassie Blue und zur Überprüfung der Reinheit können

Proteine auch mit Hilfe der sensitiveren Silberfärbung angefärbt werden. Die Silberfärbung beruht auf Anlagerung von Ag^+ -Ionen an Proteine, die beim Entwickeln zu metallischem Silber reduziert werden, wodurch sich weiteres metallisches Silber anlagert. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für mindestens 1 h bei Raumtemperatur fixiert, anschließend dreimal für je 20 min in 30 % (v/v) Ethanol gewaschen, mit 0,2 g/l Natriumthiosulfat für 60 s inkubiert, dreimal mit ddH_2O für je 20 s gewaschen, mit Silberlösung für 20 min imprägniert, erneut zweimal mit ddH_2O gewaschen und dann bis zur gewünschten Färbeintensität (3-10 min) in Entwickler geschwenkt. Die Reaktion wurde nach zweimaligem Waschen für je 2 min mit ddH_2O schließlich für 10 min in Fixierer abgestoppt und das Gel dann in 50 % (v/v) Methanol überführt. Nach 20 min wurde es mindestens 30 min oder über Nacht in Trocknerlösung gelagert und dann zwischen zwei Cellophanblättern getrocknet.

4.2.3.6 Western Blot

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran im elektrischen Feld (Western Blot) wurde entweder in einem halbtrockenen Verfahren (semi-dry) oder im Nass-Verfahren durchgeführt.

Im semi-dry-Verfahren wurde die Elektro-Blot Apparatur Trans-Blot® SD (BioRad) verwendet. Die Puffer Roti-Blot A und K (Roth) wurden hierzu nach den Angaben des Herstellers eingesetzt: 10 % (v/v) Pufferkonzentrat und 20 % (v/v) Methanol in ddH_2O . Die Gele wurden kurz 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 30-45 min, für große bei 60 min.

Der Proteintransfer im Nassblot-Verfahren wurde mit einer von der Werkstatt des MZI, JLU Gießen, hergestellten Kammer durchgeführt. Als Blotting Puffer wurde dabei eine 10 mM Lösung von Na-Tetraborat in ddH_2O (Borax-Puffer) verwendet. Gel, Membran und zwei Filterpapiere wurden kurz in diesem Puffer geschwenkt und dann in der Reihenfolge Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier in eine Haltevorrichtung zwischen zwei dünne

Material und Methoden

Schwämme geklemmt. Die Haltevorrichtung wurde dann in der Blot-Kammer so angebracht, dass die Membran der Anode und das Gel der Kathode zugewandt war. Die Kammer wurde bis zum Rand mit etwa 800 ml Borax-Puffer gefüllt und ein Rührfisch dazugegeben. Der Transfer fand innerhalb einer Stunde bei 4°C auf einem Magnetrührer und bei einem Stromfluss von 400 mA statt.

Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach dem Proteintransfer für mindestens eine Stunde, in der Regel jedoch über Nacht, in einer Lösung aus 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Tween (0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS) unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 min Waschen der Membran mit PBS-Tween erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (verdünnt in PBS-Tween). Nach Inkubation für eine Stunde und dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit PBS-Tween wurde der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus-IgG zugegeben (verdünnt mit PBS-Tween im Verhältnis 1:10.000) und die Membran unter Schwenken eine weitere Stunde mit dieser Lösung inkubiert. Nach erneuten drei Waschvorgängen mit PBS-Tween wurde die Membran mit frisch angesetzter Chemilumineszenz-Lösung (Perkin-Elmer) nach Vorschrift des Herstellers befeuchtet. Nach einer einminütigen Inkubation wurde überschüssige Lösung abgetupft und die Membran mit einer transparenten Folie abgedeckt.

Die Sichtbarmachung der Chemilumineszenz-Signale erfolgte zum Teil durch Exposition von Röntgenfilmen und zum Teil durch digitale Auswertung mittels eines Luminescent Image Analyzer (Fujifilm).

Biomax® Röntgenfilme (Kodak) passender Größe wurden durch direkte Exposition auf der transparenten Folie zunächst für 30 s belichtet und sofort entwickelt. Je nach Intensität des erhaltenen Signals wurden anschließend längere oder kürzere Belichtungszeiten gewählt. Das Bandenmuster des gefärbten Protein-Markers wurde mit einem Filzschreiber von der Membran auf den darüber ausgerichteten entwickelten Film übertragen.

Die computergestützte Auswertung von Western Blots erfolgte mit dem Image Analyzer LAS-4000mini und der mitgelieferten Software gemäß den Angaben des Herstellers (Fujifilm). Die dabei über eine Digitalkamera aufgenommenen Lumineszenz-Bilder konnten auf einem PC bearbeitet und gespeichert werden.

4.2.3.7 Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper (mAk)

Zur Reinigung monoklonaler Antikörper aus dem Hybridomüberstand, etwa für den Einsatz in der Immunpräzipitation, diente die Protein-G-Sepharose Säule „HiTrap Protein G HP

1 ml“ (GE Healthcare). Protein G ist ein Zelloberflächenprotein von Streptokokken der Gruppe G und ein Typ III Fc-Rezeptor, der, ähnlich wie das Protein A aus *Staphylokokkus aureus*, an die Fc-Region von IgG bindet. Im Gegensatz zu Protein A bindet Protein G effizienter an die Fc-Region von Antikörpern der Subklasse IgG₁.

200-350 ml Hybridomüberstand wurden zur Pufferung auf eine Endkonzentration von 10 mM Tris/HCl (pH 7,0) eingestellt und durch 1 mM NaN₃ konserviert. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen und anschließend mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min durch die äquilibrierte Säule gepumpt. Nach einem kompletten Durchlauf der Lösung wurde sie über Nacht über die Säule umgepumpt. Als Waschlösung dienten 10 ml eines 10 mM Tris/HCl-Puffers (pH 7,0). Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 15 ml eines 0,1 M Glycin-HCl Puffers (pH 2,7) und jeweils 1 ml der Elutionslösung wurden in getrennten Reaktionsgefäßen gesammelt, in die jeweils schon 100 µl einer 1 M Tris/HCl-Lösung (pH 9,0) vorgelegt waren. Auf diese Weise erfolgte eine schnelle Abpufferung des pH-Wertes in einen neutralen Bereich zur Schonung der eluierten Antikörper.

Jeweils 10 µl jeder Fraktion wurden mit 10 µl SDS-Probenpuffer vermischt, 10 min bei 94°C inkubiert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit Coomassie-Lösung für 20 min und anschließender Entfärbung mit häufig gewechselter Entfärbelösung über mehrere Stunden wurden die Elutions-Fraktionen mit der höchsten Antikörper-Konzentration bestimmt und gepoolt. Der gereinigte Antikörper wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.2.4 Arbeiten mit Zellen

4.2.4.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken

Alle Zellkultur-Arbeiten fanden unter einer Sterilbank (Holten Laminar Air Flow, Safe 2000, Kendro; MSC-Advantage, Thermo Scientific) statt. MDBK, BHK-21 und PT Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bei 37°C, 5 % CO₂ und 96 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Als Zellkulturmedium diente CCM-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 3 bis 4 Tagen passagiert. Hierzu wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit 2 ml Trypsin-Lösung kurz abgespült. Nach Abnahme der Flüssigkeit und Inkubation mit 1 ml Trypsin-Lösung bei 37°C für 2-3 min konnten die Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Schalenrand gelöst und vereinzelt werden. Nach

Material und Methoden

Resuspendieren in 10 ml Zellkulturmedium wurde $\frac{1}{30}$ dieser Suspension in einer neuen Schale mit 10 ml Medium gemischt und wieder bei den oben genannten Bedingungen inkubiert.

Um Zellen der gewünschten Dichte für Experimente am nächsten Tag zur Verfügung zu haben, wurden diese nach der Trypsinbehandlung dichter ausgesät. In jede Vertiefung einer 6-well Platte (3,5 cm Durchmesser) wurde hierzu etwa $\frac{1}{25}$ (BHK) oder $\frac{1}{20}$ (MDBK) der Zellsuspension einer 10 cm Schale mit dichtem Monolayer verwendet und auf 2 ml/well Gesamtvolumen mit Medium verdünnt. Die zur Elektroporation von MDBK Zellen benötigten dicht bewachsenen 10 cm Schalen konnten durch Aussäen dieser Zellen am Vortag im Verhältnis 1:3 erhalten werden.

Wurden für bestimmte Experimente exakte Zellmengen benötigt, wurden die Zellen nach der Trypsinierung in 10 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

$$\text{Zellen/ml} = n \times V \times 1,25 \times 1000$$

(V = Verdünnungsfaktor = 10)

berechnet werden.

4.2.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden von jeder Zelllinie Kryokulturen angelegt, die in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut wurden. Nach dem Ablösen der Zellen einer 10 cm Schale mittels Trypsin-Lösung wurden diese mit 10 ml Medium in ein 15 ml Gewebekulturröhrchen überführt und für 2 min bei 400 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1,8 ml reinem FCS resuspendiert. In 2 Kryoröhrchen wurde jeweils 100 μ l DMSO vorgelegt und 900 μ l 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 wurden die Zellen schonend um 1°C pro min bis auf -70°C abgekühlt, bevor sie schließlich in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden konnten.

4.2.4.3 T7-Vaccinia-Expression

Durch Infektion von BHK-21 Zellen mit rekombinantem Vaccinia Virus 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 es durch die T7 Polymerase des Vaccinia Virus nur zu einem uneffizienten capping der transkribierten RNAs kommt, wurden in dieser Arbeit Plasmide zur T7-Vaccinia-Expression 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 verwendeten BHK-21 Zellen wurden am Vortag im 6-well-Format so ausgesät, dass am nächsten Tag ein optisch zu 70-90 % dichter Monolayer vorlag (s.o.). Die Infektion mit Vaccinia Virus MVA-T7pol erfolgte in 1 ml FCS-freiem Medium für 1 h im Brutschrank mit einer MOI von 3. Zur Transfektion der Expressionsplasmide wurde Superfect® Transfektions-Reagenz nach der Vorschrift des Herstellers (Qiagen) verwendet. Bei dieser Methode 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. 2 µg Plasmid-DNA, bei Doppeltransfektionen pro Plasmid 1,5 µg, wurden hierzu 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 Vaccinia-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 anschließend zu den Überständen der Zellen pipettiert und durch Schwenken der Platte verteilt. Nach 2-4 h Inkubation im Brutschrank wurde der Zellüberstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und dann über Nacht mit Medium mit FCS und Penicillin/Streptomycin inkubiert.

Zur weiteren Analyse mittels Western Blot wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in jeweils 250 µl SDS-Lysepuffer unter Zusatz von 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol lysiert und das Lysat bei -20°C gelagert. Dabei wurden standardmäßig Vaccinia-infizierte, nicht transfizierte Zellen als Negativkontrolle verwendet.

4.2.4.4 Infektion von MDBK Zellen

MDBK Zellen wurden infiziert um entweder Virus-RNA zu gewinnen oder um virale Proteine im Western Blot oder in der Immunfluoreszenz nachzuweisen. Dabei wurden

standardmäßig nicht-infizierte Zellen als Negativkontrolle parallel analysiert.

Zur Infektion wurden am Vortag in 3,5 cm Schalen ausgesäte MDBK Zellen verwendet, die zum Zeitpunkt der Infektion eine Dichte von 60-80 % zeigten. Nach dem Abnehmen des Überstandes und dem Waschen mit 2 ml PBS wurden die Zellen bei einer MOI von 5 (WB, IF), bzw. 0,1 (RNA-Gewinnung) mit dem jeweiligen Virus in FCS-freiem Medium infiziert. Nach einer Stunde wurde der Überstand wieder durch 2 ml FCS-haltiges Medium ersetzt.

Zur weiteren Analyse mittels Western Blot wurden die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten in jeweils 250 µl SDS-Lysepuffer unter Zusatz von 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol lysiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.4.5 Elektroporation von MDBK Zellen

Die Elektroporation ist neben der Lipofektion (s.o.) eine zweite Methode zur Transfektion eukaryontischer Zellen. Infolge eines kurzen elektrischen Impulses wird die Zellmembran kurzzeitig durchlässig und extrazellulär vorhandene RNA oder DNA kann ins Zytoplasma gelangen. Zum Einbringen von RNA in MDBK Zellen ist die Elektroporation erfahrungsgemäß die geeignetste Methode und kam für diesen Zweck zur Anwendung (Tautz et al., 1999).

Für eine Elektroporation wurden vergleichbare Mengen an RNA, in der Regel etwa 1 µg, und ein Drittel der Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm Zellkulturschale (etwa 1×10^6 Zellen) verwendet. Der Zellrasen wurde hierzu durch Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt, und in 10 ml FCS-haltigem Medium resuspendiert, um Reste von Trypsin zu inaktivieren. Nach Zentrifugation bei 300 xg für 2 min wurde das Pellet zweimal mit PBS gewaschen und schließlich wieder in 1,2 ml PBS aufgenommen. Pro Elektroporationsansatz wurden jeweils 400 µl dieser Zellsuspension auf eine Elektroporationsküvette (Elektroden-Abstand: 2 mm) verteilt. Sofort nach Zugabe der RNA erfolgte der elektrische Impuls (0,18 kV, 950 µF) und die elektroporierte Zellsuspension wurde in eine 3,5 cm Zellkulturschale ausgesät, mit 1,6 ml FCS-haltigem Zellkulturmedium aufgefüllt und im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen etwa für einen Western Blot lysiert oder für einen Immunfluoreszenztest fixiert wurden. Als Negativkontrolle wurde standardmäßig eine Elektroporation ohne RNA-Zugabe durchgeführt.

Zum Test auf Replikation und Translation der elektroporierten RNA und zum Nachweis der Entstehung infektiöser Viren wurde jede elektroporierte Zellsuspension in zwei wells ausgesät und dann nach 24 h und nach 48 h jeweils ein well fixiert und in der Immunfluoreszenz (s.u.) mit dem mAk Code4 als Primärantikörper untersucht. Zeigte sich

dabei eine Ausbreitungstendenz der positiven Zellen im Vergleich der beiden Zeitpunkte, so war dies ein Hinweis auf Bildung infektiöser Virionen. Um dies zu bestätigen wurde der Zell-Überstand des 48 h-wells steril filtriert und auf eine neue 3,5 cm Schale nicht-infizierter MDBK Zellen gegeben. Nach 48 h wurde ein erneuter Code4-Immunfluoreszenztest durchgeführt, um das Erfolgen einer Infektion zu überprüfen.

4.2.4.6 Immunfluoreszenz

Zum Zwecke der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Zellen wurden diese nach Waschen mit PBS⁺⁺ zunächst durch Zugabe von 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS⁺⁺ und Inkubation bei 4°C für 20 min fixiert. Nach dem Waschen mit PBS⁺⁺ erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen durch Zugabe von 0,5 % (w/v) N-octyl- β -D-Glucopyranosid in PBS⁺⁺ und Inkubation bei 4°C für 7 min. Die Zellen wurden danach erneut mit PBS⁺⁺ gespült. Die Primärantikörper, mAk aus Maus-Hybridomen, wurden mit PBS⁺⁺ verdünnt und für eine Stunde 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-gekoppelte Anti-Maus-IgG in einer Verdünnung in PBS⁺⁺ von 1:500 verwendet und ebenfalls für eine Stunde bei 37°C auf den Zellen belassen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ konnten die erhaltenen Präparate im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet werden. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mittels Digitalkamera und zugehöriger PC-Software.

4.2.4.7 Bestimmung des Virus-Titers von Zellkulturüberständen

Angewendet wurde das Verfahren der Endpunktverdünnung. Um den Titer von Zellkulturüberständen nach Elektroporation viraler RNA oder nach Virusinfektion zu bestimmen, wurden MDBK Zellen mit seriellen Verdünnungen des virushaltigen Überstandes in 96-well Mikrotiterplatten inkubiert und die Etablierung einer Infektion später per Immunfluoreszenztest beurteilt.

Beginnend mit jeweils 50 μ l einer Vorverdünnung des Überstandes in Zellkulturmedium von 1:10 oder 1:100 wurde der Verdünnungsfaktor in zwölf Stufen von well zu well jeweils um den Faktor 3 erhöht. Hierzu wurden in alle wells 100 μ l Zellkulturmedium vorgelegt und jeweils 50 μ l von einer Stufe zur nächsten übertragen; 50 μ l aus der letzten Stufe wurden verworfen. Für jede Titerbestimmung wurde diese Verdünnungsreihe in vierfacher Ausführung durchgeführt.

Anschließend wurden MDBK Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm Zellkulturschale durch

Material und Methoden

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 (s.o.). Diesem Ergebnis entsprechend wurde die Suspension anschließend durch Verdünnung mit Medium auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen je ml eingestellt.

100 µl der verdünnten Zellen (2×10^4 Zellen) wurden zu jedem well der Virus-Verdünnungsreihe pipettiert. Nach Inkubation im Brutschrank (37°C; 5 % CO₂; 96 % relative Luftfeuchtigkeit) für drei Tage wurden die Zellen in einer Immunfluoreszenz-Analyse auf das Vorhandensein des viralen Proteins NS3 und damit auf Virusinfektion hin untersucht (s.o.). Als Primärantikörper diente dabei der mAk Code4 in einer Verdünnung von 1:20 in PBS⁺⁺.

Titerberechnungen bei Endpunktverdünnungsverfahren erfolgen stets mit Hilfe statistischer Schätzverfahren. In dieser Arbeit fand die Formel nach Spaermann und

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

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 µl eingesetzt wurden, muss dieser Wert mit 20 multipliziert werden, um die Anzahl infektiöser Viren je ml zu erhalten (GKID₅₀).

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

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

$\sum R_i$ 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 $\sum R_i = 1 + \frac{3}{4} = 1,75$)

4.2.4.8 Plaquereinigung

Zur biologischen Klonierung eines Virus wurden MDBK Zellen in 6-well Gewebekulturschalen mit virushaltigem Überstand in fortlaufender Verdünnung von 1:10 infiziert. Nach 1 h im Brutschrank wurden diese Ansätze mit 3 ml 0.6 % Low Melting

Agarose enthaltendem Medium pro well überschichtet und 4-5 Tage inkubiert. Nach dem Auftreten eines zytopathischen Effekts wurde Material von Plaques, die in der höchsten Verdünnungsstufe aufgetreten waren und isoliert lagen, mit Pipettenspitzen ausgestochen und durch mehrstündiges Schütteln (3-4 h) in jeweils 1 ml frischem Medium bei 4°C resuspendiert. Dieses so erhaltene infektiöse Material wurde dann erneut zur Infektion von nicht infizierten Zellen gemäß obigem Schema genutzt und so eine Plaquereinigung in der Folge noch zweimal wiederholt. Das so gewonnene biologisch klonierte Virus wurde dann in größeren Gewebekulturschalen vermehrt und der aus dem Kulturüberstand gesammelte Virusstock titriert und bei -80°C in Aliquots weggefroren.

4.2.5 Produktion monoklonaler Antikörper

Die Arbeiten für die Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden nach Harlow, Howard und Lindl durchgeführt (Harlow und Lane, 1999; Howard und Bethell, 2001; Lindl, 2002).

4.2.5.1 Immunisierung von Mäusen

Als Antigen für die Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen das Jiv-Protein wurde bakteriell exprimiertes, gereinigtes His-Ub-Flag-Jiv90 verwendet.

Drei weibliche, sechs Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden mit je 25-50 µg Protein pro Immunisierung intraperitoneal inokuliert. Dabei wurden jeweils 100 µl der Proteinlösung vermischt mit 100 µl Freundschem Adjuvans injiziert. Die Immunisierungen erfolgten an den Tagen 0 („Priming“), 14, 28 und 49 („Boost“). An den Tagen 0 und 42 wurde den Tieren Blut entnommen und Serum gewonnen, das mittels Western Blot auf Antikörper gegen bakterielles His-Ub-Flag-Jiv90 und gegen in BHK-21 Zellen exprimiertes GST-Jiv90 getestet wurde. Die Prä-Immun- und Immunseren wurden dabei jeweils 1:5.000 und 1:10.000 verdünnt als Primärantikörper eingesetzt. Die Maus mit dem stärksten spezifischen Signal und dem schwächsten Hintergrund im Blot wurde dann ab Tag 61 noch dreimal im Abstand von je 24 Stunden intraperitoneal ohne Adjuvans immunisiert und am Tag 64 zur Gewinnung der Milzzellen euthanasiert.

4.2.5.2 Gewinnung und Ausplattierung von Feeder-Zellen

Das klonale Wachstum einzelner frisch fusionierter Hybridome ist meist unzureichend. Die Hybridome sind empfindlich gegenüber Zelltoxinen und benötigen u.a. Wachstumsfaktoren wie IL-6 sowie Spurenelemente wie Selen. Das Wachstum kann durch die Kokultivierung mit "Feeder"-Zellen, wie z.B. Thymozyten, Fibroblasten oder Makrophagen, deutlich verbessert werden.

Einen Tag vor der Fusion (Tag 63) wurden Peritoneal-Exsudat-Zellen von einer nicht

immunisierten Balb/c Maus als Feeder-Zellen gewonnen. Die Euthanasie der Maus erfolgte nach der Betäubung mit CO₂ durch cervikale Dislokation. Die Maus wurde in 70 % Ethanol getaucht und auf Styropor fixiert. Die Haut wurde vom Xyphoid bis zur Inguinalregion gespalten und die abdominale Muskelschicht frei präpariert, ohne die Bauchhöhle zu eröffnen. 4 ml Hepes Medium wurden unter das Peritoneum gespritzt. Der Bauch wurde leicht massiert, um die Flüssigkeit zu verteilen und sie dann mit einer Spritze abzusaugen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei 300 xg für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 145 ml HAT Medium aufgenommen und auf vierzehn 96-well Mikrotiterplatten (100 µl Zelllösung/Vertiefung) verteilt.

4.2.5.3 Gewinnung der Splenozyten (Milzzellen)

Die Tötung der Maus erfolgte durch cervikale Dislokation nach Betäubung mit CO₂ am Tag 64. Zur Entnahme der Milz wurde die Maus auf dem Rücken fixiert. Nach Desinfektion mit 70 % Ethanol wurde die Haut vom Xyphoid bis zur Inguinalregion durchtrennt und die Bauchmuskulatur frei präpariert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Milz steril entnommen und in eine Petrischale mit 10 ml Hepes Medium gegeben. Das noch anhaftende Fett- und Bindegewebe wurde entfernt und die Milzkapsel an einem Pol eröffnet. Durch diese Öffnung wurde die Milzpulpa vorsichtig herausgespült. Hierzu wurde die Kanüle einer mit Hepes Medium gefüllten 10 ml Spritze am entgegengesetzten Pol der Milz durch die Kapsel gestochen und bei geringem Druck gespült. Der Vorgang wurde bis zu einer deutlichen Entfärbung der Milz wiederholt. Die gewonne Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach kurzer Zeit (etwa 2 min) sedimentierten die größeren Gewebestücke und der Überstand wurde in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Die Splenozyten wurden bei 300 xg für 5 min zentrifugiert und zweimal mit Hepes Medium gewaschen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot 1:10 mit Türk's-Färbelösung versetzt und in einer Zählkammer nach Neubauer unter einem inversen Lichtmikroskop ausgezählt. Die Auszählung berücksichtigte 4 große Quadrate der Kammer. Gezählt wurden nur lebende Zellen ohne sichtbare Blaufärbung. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl (Zellen/ml) ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times V \times 2,5 \times 1000$$

n = Zellen in 4 Großquadraten

V = Verdünnungsfaktor

4.2.5.4 Fusion von Splenozyten und Myelomzellen

Zur Fusion wurde die Myelomzelllinie Sp2/0 verwendet. Durch Verschmelzung dieser Tumorzellen mit den Milzlymphozyten der immunisierten Maus entstehen Hybridomzellen, die einerseits Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren und andererseits in Zellkultur unbegrenzt vermehrt werden können. Die Myelomzellen wurden per Trypanblau-Färbung gezählt und dann im Verhältnis 1:3 zu den Splenozyten gegeben. Das Zellgemisch wurde bei 300 xg für 4 min pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit HEPES Medium gewaschen. Anschließend wurde dem Pellet über einen Zeitraum von einer Minute unter leichtem Schwenken in einem 37°C Wasserbad 1 ml PEG 1500 Lösung (Polyethylenglykol) zugegeben. Danach erfolgte zur Verdünnung des PEG die Zugabe von zunächst 1 ml HEPES Medium über einen Zeitraum von 60 s, dann weiteren 3 ml HEPES Medium innerhalb von 90 s und schließlich 10 ml HEPES Medium in 2 min. Die fusionierten Zellen wurden bei 300 xg für 5 min pelletiert, in 145 ml HAT Medium resuspendiert und auf 14 Mikrotiterplatten mit Feeder-Zellen verteilt (100 µl/Vertiefung). Die Platten wurden 11 Tage im Brutschrank bis zum ersten Screening inkubiert.

4.2.5.5 Selektion von Hybridomzellen

Die bekannteste Methode für die Selektion von Hybridomzellen ist die Verwendung von Myelomzelllinien, denen das Enzym Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) fehlt. Bei Kultivierung dieser Zellen in HAT Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) blockiert Aminopterin die Biosynthese von Nukleotiden und die Tumorzellen sterben ab. Milzlymphozyten produzieren HGPRT und können, wenn das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin supplementiert ist, auf einem alternativen Weg Nukleotide synthetisieren (Harlow und Lane, 1999). Dadurch können sich also nur Hybridzellen, die so genannten Hybridome, im Selektionsmedium vermehren.

Zur Selektion wurden die fusionierten Zellen in HAT Medium kultiviert. Im Abstand von 2 bis 3 Tagen wurden die Platten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf das Wachstum von Zellkolonien kontrolliert, um den geeigneten Zeitpunkt für die Untersuchung der gewachsenen Hybridomzellkolonien auf die Produktion von Antikörpern zu ermitteln. Nach 11 Tagen Selektion wurde das erste Screening durchgeführt und danach von HAT Medium auf HT Medium umgestellt.

4.2.5.6 Screening von Hybridomzellen

Das erste Screening fand statt, nachdem die Klone etwa 30 % des Bodens der

Material und Methoden

Vertiefungen bedeckten. Dazu wurden 100 µl Medium aus jeder Vertiefung abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Zum Testen dieser Hybridom-Überstände wurde ein indirekter ELISA etabliert. Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nutzt die hohe Spezifität der Bindung von Antikörpern an ihr Antigen. Er basiert auf der Immobilisierung von Protein auf einer Trägeroberfläche und anschließendem Nachweis des gebundenen Zielproteins durch einen Antikörper. Dieser kann entweder direkt an ein Enzym gekoppelt sein oder durch einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper detektiert werden (indirekt). Eine durch das konjugierte Enzym katalysierte Farbreaktion kann dann photometrisch gemessen werden. Die optimale Proteinkonzentration für den ELISA-Test wurde mit Hilfe eines negativen Serums (Prä-Immunsersum einer Maus) bzw. eines positiven Serums (Serum der immunisierten Maus) bestimmt.

Hierfür wurde das entsprechende gereinigte Protein (His-Ub-Flag-Jiv90) in „Coating“ Puffer verdünnt, so dass eine Reihe mit folgenden Konzentrationen entstand: 0,25 ng/µl, 0,5 ng/µl, 0,75 ng/µl, 1 ng/µl, 1,25 ng/µl und 1,5 ng/µl. In einem Doppelansatz wurden von jeder Verdünnung 100 µl auf die Vertiefungen einer 96-well Platte verteilt. Diese wurde mit einer „TSP“-Platte abgedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Bei den TSP-Platten handelt es sich um Platten mit 96 Projektionen, deren Flächen mit Protein beschichtet werden können und die wie ein Deckel auf eine Mikrotiterplatte passen. Nach der Inkubation wurden sowohl die 96-well Platten als auch die TSP-Platten dreimal in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Danach wurden pro well 125 µl einer Blockierlösung (10 % FCS) zugegeben und beide Platten 1 h bei 37°C inkubiert, bevor sie wieder dreimal mit PBS-Tween (0,1 %) gewaschen wurden. Danach verdünnte man das positive und negative Serum jeweils 1:10.000 in HAT Medium und pipettierte 100 µl davon zu jeder Proteinverdünnung. Die Platten wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden beide Platten dreimal gewaschen und die TSP-Platte auf eine Platte mit „U“-förmigen Vertiefungen transferiert, in der bereits 50 µl Ziege Anti-Maus IgG Meerrettich-Peroxidase konjugierter Antikörper vorlagen, der 1:5.000 in PBS-Tween (0,1 %) verdünnt war. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die TSP-Platte abermals dreimal gewaschen und auf eine 96-well Mikrotiterplatte gesetzt, in der jeweils 100 µl frisch angesetztes TMB-Substrat vorgelegt waren. 15-20 min nach Inkubation mit dem Substrat im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 µl 1 M H₂SO₄-Lösung gestoppt. Im ELISA-Reader wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge 620 nm).

Als optimale Proteinkonzentration stellte sich 1,5 ng/µl heraus. Bei diesem Wert blieb die OD des positiven Serums noch konstant und unterschied sich von der des negativen Serums um den Faktor 30.

Das abgenommene Medium wurde mit Hilfe des indirekten ELISAs auf die Produktion spezifischer Antikörper untersucht, indem die Hybridom-Überstände als Erstantikörper dienten. Als Positivkontrolle diente Hybridom-Überstand des Anti Ubiquitin mAk produzierenden Hybridoms 13A4, als Negativkontrolle Überstand des Code4 Hybridoms. Die Vertiefungen, deren Überstände eine OD ≥ 1 erreichten, wurden vorläufig als positiv bewertet, d.h. solange bis das Ergebnis in einem zweiten Screening, zwei Tage später, bestätigt werden konnte. Die stabile Produktion spezifischer Antikörper wurde dann schließlich durch weitere Screenings, Immunfluoreszenztests und Western Blots in den darauf folgenden Tagen nachgewiesen.

4.2.5.7 Klonierung positiver Hybridome

Um die Monoklonalität der Zellkolonien zu gewährleisten wurden diese zweifach rekloniert. Zuvor wurden zur Sicherung der Zellen jeweils zwei Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Reklonierung wurde die "limited-dilution"-Methode angewandt. 96-well Platten wurden mit 50 µl Hybridom Medium je Vertiefung beschickt. Zellen aus den als positiv identifizierten Vertiefungen wurden vorsichtig resuspendiert und 50 µl der Zellsuspension in die erste Vertiefung A1 überführt. Ausgehend von der ersten Vertiefung wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in den Vertiefungen A1 bis H1 hergestellt. Danach wurden je 50 µl Hybridom Medium in die vorgenannten Vertiefungen zugegeben. Ausgehend von dieser ersten Reihe wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe über zwölf Reihen mit einer Mehrkanalpipette hergestellt. Abschließend wurden weitere 150 µl Hybridom Medium in jede Vertiefung pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 8 bis 10 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

Zur Identifikation positiver Klone wurden der ELISA analog zum Screening und Western Blots verwendet. Die Hybridome wurden erneut rekloniert und von zwei Subklonen jedes Hybridoms wurden zwei Replikas in flüssigem Stickstoff eingefroren (ca. 10⁶ Zellen/ml).

4.2.5.8 Gewinnung der mAk

Klone, die stabil Antikörper gegen das entsprechende Protein produzierten, wurden auf Kulturschalen mit 25 cm Durchmesser expandiert. Der Kulturüberstand der Hybridome wurde abgenommen, 10 min bei 4.000 xg geklärt und der zellfreie Überstand bei -20°C

eingefroren.

4.2.5.9 Isotypisierung der mAk

Zur Isotypisierung der Antikörper wurde ein Isotyp-Bestimmungs kit (Maus-Hybridoma-Subtyping Kit, Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Nachweis basiert auf einem ELISA-Format und ermöglicht eine schnelle und sensitive Bestimmung der Subtypen und Isotypen muriner monoklonaler Antikörper (IgA, IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃) sowie der leichten Ketten (κ und λ) per Farbreaktion.

4.2.5.10 Bestimmung des Epitops

Zuerst wurde der Hybridom-Überstand als Primärantikörper in einem Western Blot (s.o.) eingesetzt, um N- und C-terminale Verkürzungen von Jiv90, fusioniert an GST und per T7-Vaccinia-System in BHK-21 Zellen exprimiert, zu detektieren. Dadurch konnte das Epitop auf einen 10 AS großen Bereich eingegrenzt werden. Anschließend erfolgte die Bestätigung durch T7-Vaccinia-Expression einer GST-Fusion dieser 10 AS und Nachweis im Western Blot.

Eine weitere Eingrenzung erfolgte durch einen Western Blot mit GST-Jiv90-Mutanten, bei denen jeweils zwei aufeinanderfolgende Aminosäuren durch zwei Alanin ersetzt waren („Alanin-Scan“). Hier zeigten sich nur 5 AS als essentiell für die Bindung des Jiv-mAk. Diese 5 AS wurden dann ebenfalls an GST fusioniert per T7-Vaccinia-System exprimiert.

5 Ergebnisse

5.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Nach dem Test diverser bakterieller Expressionssysteme konnte schließlich sowohl für Jiv als auch für NS2 ein Protokoll zur rekombinanten Expression und Aufreinigung der Proteine in *E. coli* etabliert werden.

5.1.1 Expression und Reinigung von Jiv

Erste Expressionsversuche des 90 AS großen Fragmentes des J-Domänen-Proteins Jiv (Jiv90) in *E. coli* führten entweder zu kaum detektierbaren Mengen oder zu ausschließlich unlöslichem Protein. Jiv90 wurde dabei alleine oder als Fusion an den Intein-Tag (New England Biolabs), Maltose Bindendes Protein (MBP) oder Glutathion-S-Transferase (GST) (Abbildung 12) und in den *E. coli* Stämmen ER2566, JM109, BL21 oder Rosetta exprimiert.

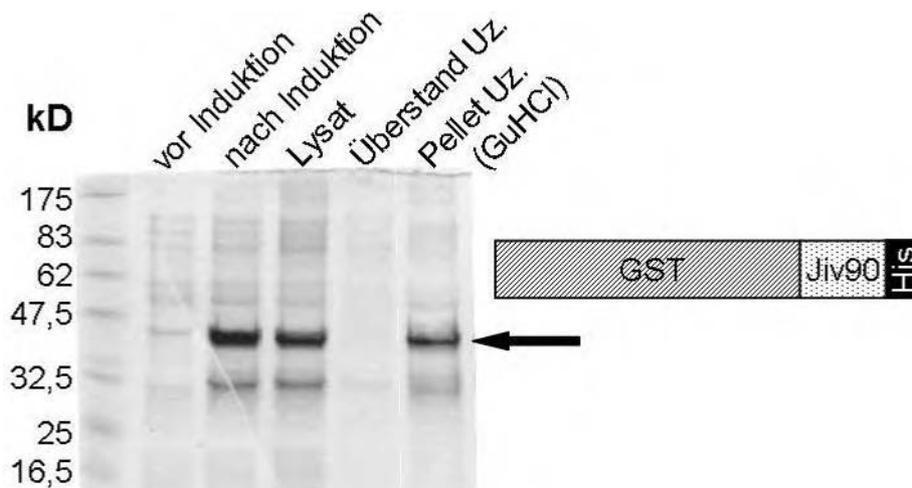


Abbildung 12: Expression von GST-Jiv90-His in BL21 (SDS-PAGE und Coomassie-Färbung)

Als C-terminale GST-Fusion konnten große Mengen Jiv90 produziert werden. Nach Ultrazentrifugation des Lysats fand sich das Protein nicht im Überstand (Überstand Uz.), konnte aber zum Teil aus dem Pellet in Puffer mit 6M GuHCl resolubilisiert werden. Eine Aufreinigung des denaturierten Proteins über den C-terminalen His-Tag per IMAC gelang jedoch nicht.

Um eine ausreichende Menge löslichen Jiv90 zu erhalten, musste dieses fusioniert an den C-Terminus von Ubiquitin exprimiert werden. Mit dem Plasmid pUb-Flag-Jiv90 transformierte BL21+pLys produzieren nach Induktion mit IPTG große Mengen des Proteins His-Ub-Flag-Jiv90, welches zum Teil in löslicher Form vorliegt (Abbildung 13 A). Das Fusionsprotein konnte über Nickel-Ionen-Säulenchromatographie gereinigt werden (Abbildung 13 B+C) und wurde zur Immunisierung von BALB/c Mäusen verwendet (s.u.).

Ergebnisse

Weiterhin wurde dieses Protein im anschließenden Screening der gewonnenen Hybridome mittels indirektem ELISA als Antigen eingesetzt.

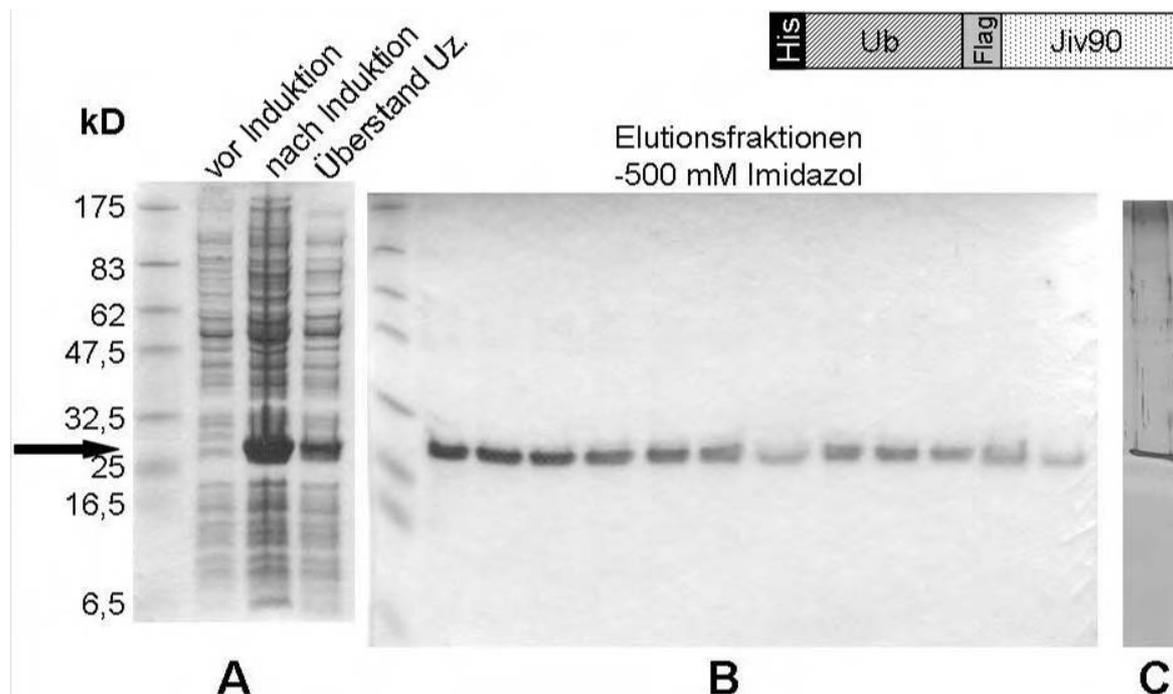


Abbildung 13: Expression und Aufreinigung von His-Ub-Flag-Jiv90 (SDS-PAGE)

A: Coomassie-Färbung; Expression und Lyse; Überstand Uz.: Zellysat-Überstand nach Ultrazentrifugation

B: Coomassie-Färbung; Elutionsfraktionen (Imidazol-Gradient) der Aufreinigung mittels Ni²⁺-IMAC-Säule (GE Healthcare HiTrap)

C: Silberfärbung; Vereinigte Elutionsfraktionen

Zur Untersuchung der Struktur von Jiv90 sollte der Fusionspartner His-Ub vom gereinigten Protein abgespalten werden. Versuche mit einer Ubiquitin C-terminalen Hydrolase verliefen nicht zufriedenstellend, da einerseits nur 50 % des Proteins gespalten werden konnten und andererseits die Protease nicht in reiner Form und nur ohne Tag zur Verfügung stand, so dass sie nach Spaltung nicht herausgereinigt werden konnte. Daher wurden zwei Schnittstellen der „Nuclear Inclusion Protease a“ des Tobacco Etch Virus zwischen His-Ub und Flag-Jiv90 eingefügt. Diese Veränderung führte zu einer herabgesetzten Löslichkeit des exprimierten Proteins. Dennoch konnten ausreichende Mengen His-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv90 per Ni²⁺-Säulenchromatographie gereinigt (Abbildung 14) und durch Zugabe der selbst hergestellten und gereinigten TEV-Protease gespalten werden (Abbildung 15 A). Eine anschließende subtraktive Aufreinigung durch erneute Ni²⁺-Säulenchromatographie führte zum Herausfangen von His-Ub, TEV-Protease und der Reste des ungespaltenen Proteins. Das abgespaltene Flag-Jiv90 fand sich im Durchfluß der Säule, erwies sich jedoch als sehr instabil (Abbildung 15 B und Abbildung 16).

Ergebnisse

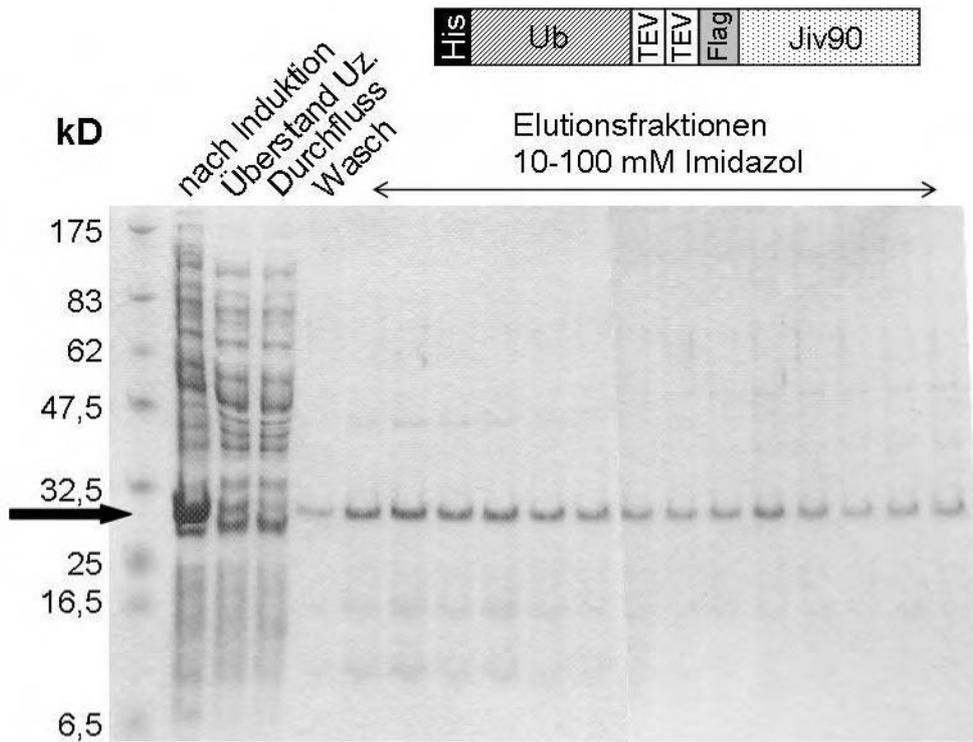


Abbildung 14: Expression und Aufreinigung von His-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv90

SDS-PAGE und Coomassie-Färbung; Expression und Aufreinigung mittels Ni^{2+} -IMAC-Säule (Macherey-Nagel Protino)

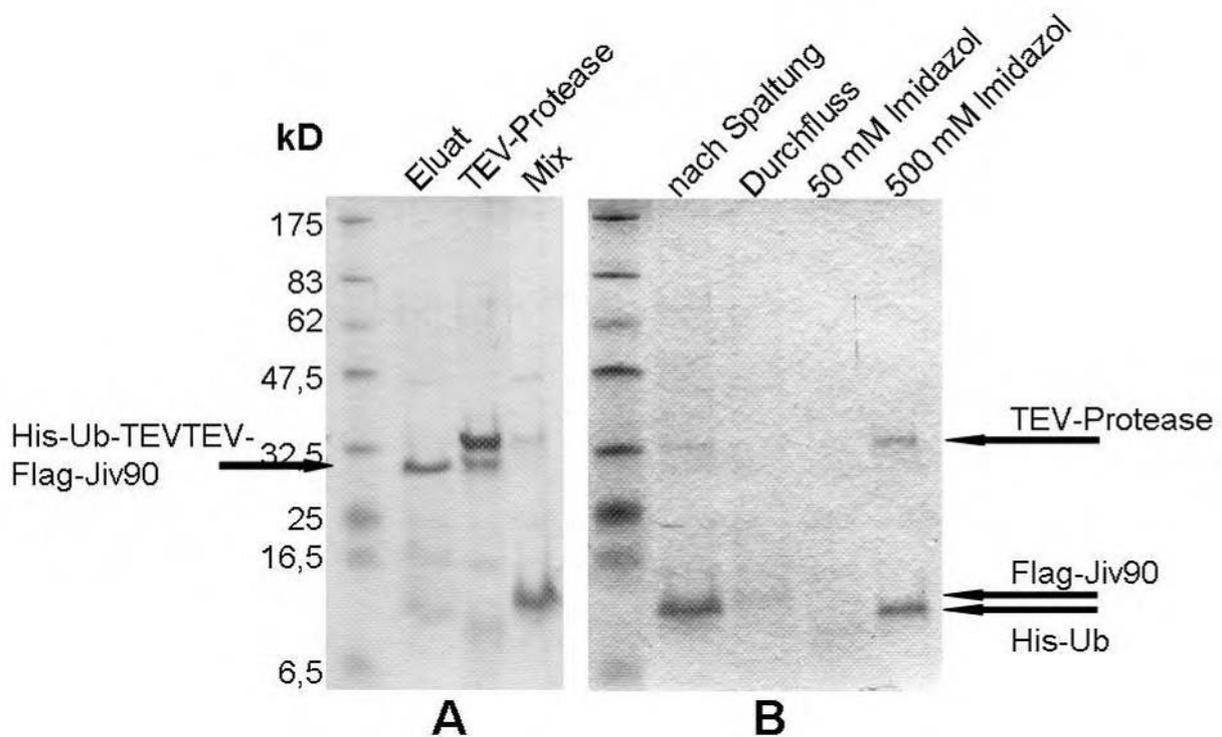


Abbildung 15: Spaltung und subtraktive Aufreinigung von His-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv90

Spaltung des Eluates mittels TEV-Protease (A) und Aufreinigung der Spaltprodukte per IMAC-Säule (B). Im Durchfluss Flag-Jiv90, das sehr instabil und daher in der Coomassie-Färbung nur schwach zu erkennen ist.

Ergebnisse

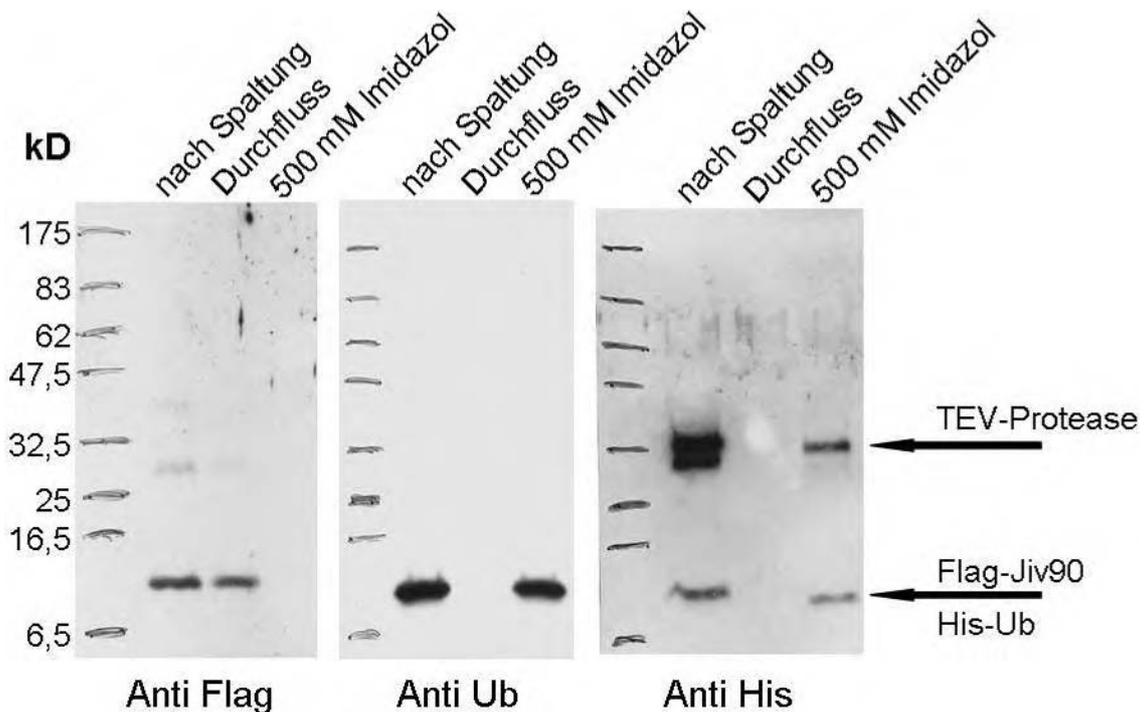


Abbildung 16: Subtraktive Aufreinigung von Flag-Jiv90

In Western Blots mit drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern lässt sich die Aufreinigung der Spaltprodukte gut nachvollziehen. Flag-Jiv90 wird per Anti Flag mAk im Durchfluss der Säule, His-Ub und die His-getaggte Protease per Anti Ub, bzw. Anti His mAk im Eluat der Säule detektiert.

Um eine höhere Stabilität nach Abspaltung zu erreichen, wurde das Jiv-Fragment im Fusionsprotein verlängert; zuerst zu Jiv117, dann Jiv194 und schließlich Jiv265 (siehe dazu Abbildung 17). Die exprimierten Fusionsproteine waren jedoch nahezu komplett unlöslich. Unter denaturierenden Bedingungen (LEW-Puffer mit 8 M Harnstoff) aufgereinigtes His-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv194, konnte durch Dialyse gegen Puffer ohne Harnstoff zu einem großen Teil rückgefaltet und dann mittels TEV-Protease gespalten werden (Abbildung 18). Das Flag-Jiv194 Spaltprodukt erwies sich nach subtraktiver Reinigung jedoch ebenfalls als instabil (Abbildung 19). Generell ist festzustellen, dass die Jiv-Fragmente mit zunehmender Länge stabiler wurden, dass aber gleichzeitig die Löslichkeit der Ub-Fusionsproteine abnahm. Exprimiertes His-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv265 war vollständig unlöslich.

Ergebnisse

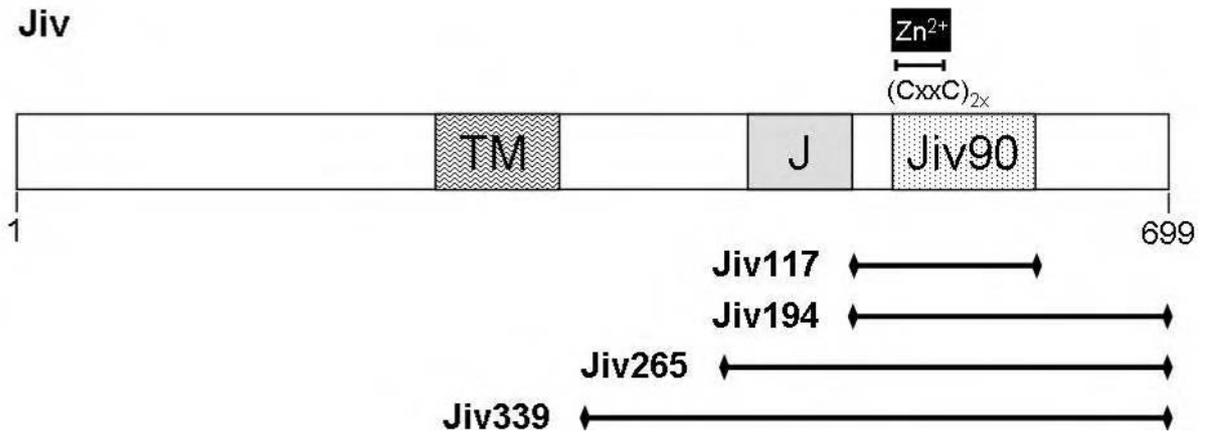


Abbildung 17: Schematische Darstellung der exprimierten Jiv-Fragmente

Ausgehend von Jiv90 stellt Jiv117 eine N-terminale Verlängerung bis zur J-Domäne dar und Jiv194 umfasst zusätzlich den C-Terminus von Jiv. Ein Hinzufügen der J-Domäne führte zu Jiv265 und schließlich Jiv339 besteht aus der C-terminalen Hälfte des Proteins ab der putativen Transmembrandomäne.

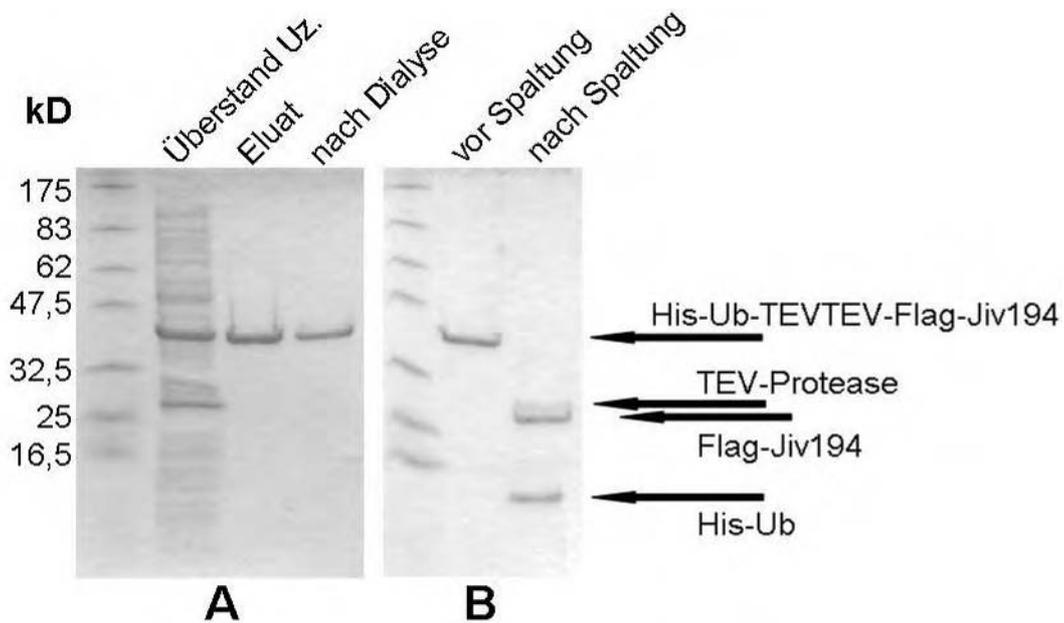


Abbildung 18: Aufreinigung, Rückfaltung und Spaltung von His-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv194

SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

A: Aufreinigung des Zelllysats-Überstandes unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) per IMAC-Säule und Rückfaltung des Eluat-Pools per Dialyse gegen Puffer ohne Harnstoff

B: Spaltung des rückgefalteten Proteins mittels TEV-Protease

Ergebnisse

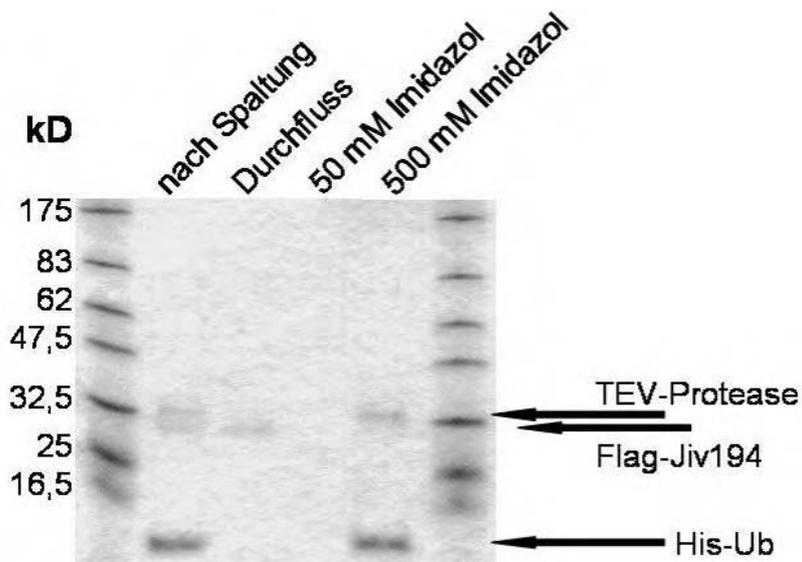


Abbildung 19: Subtraktive Aufreinigung von Flag-Jiv194

In der Coomassie-Färbung findet sich Flag-Jiv194 als schwache Bande im Durchfluss der Säule. Die anderen Proteine lassen sich von dieser durch Zugabe von Imidazol wieder eluieren. Auffällig ist die im Vergleich zu Abbildung 18 B bereits deutliche Abnahme der Intensität der Flag-Jiv194 Bande.

Erst das Einklonieren der Gensequenzen des *E. coli* Trigger Factors (Tf) zwischen His-Tag und Ubiquitin führte zur Gewinnung löslichen rekombinanten Proteins in Form von His-Tf-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv265. Dieses konnte per Cobalt-Ionen-Säulenchromatographie gereinigt und per TEV-Protease zu etwa 80-90 % gespalten werden (Abbildung 20 und Abbildung 21 A). Eine zweite, subtraktive Reinigung der Spaltprodukte über eine Cobalt-Säule führte zu einer Abreicherung der His-getaggten Proteine, jedoch noch nicht zu einer ausreichenden Reinheit des Flag-Jiv265 (Abbildung 21 B).

Eine weitere N-terminale Verlängerung des Jiv-Fragments um den Bereich zwischen der putativen Transmembrandomäne und der J-Domäne (Jiv339) führte lediglich zu einer Verschlechterung der Löslichkeit des Tf-Ub-Fusionsproteins und nicht zu einer verbesserten Reinigungseffizienz nach Spaltung.

Ergebnisse

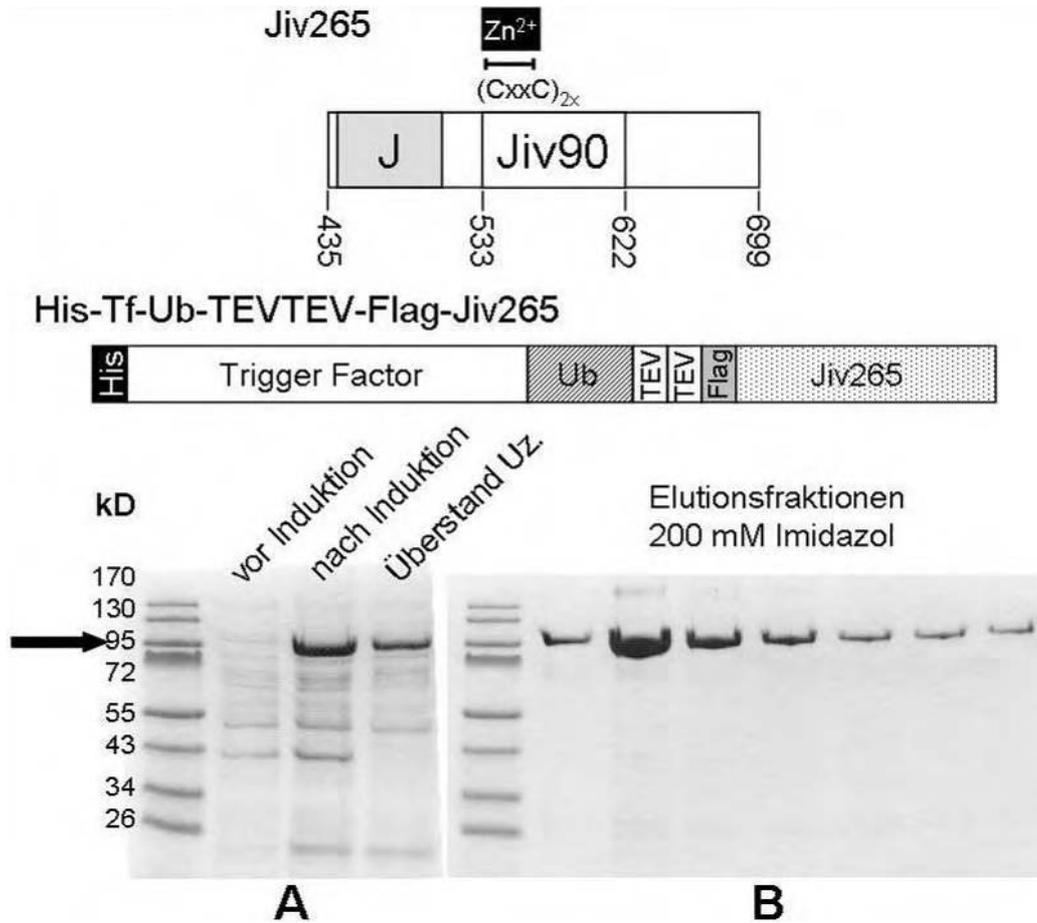


Abbildung 20: Expression und Aufreinigung von His-Tf-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv265

Jiv265 entspricht AS 435-699 des Jiv-Proteins und beinhaltet J-Domäne und Jiv90. Das Fusionsprotein mit Tf und Ub wird zum großen Teil löslich exprimiert (A) und lässt sich per IMAC-Säule (Macherey-Nagel Protino) aufreinigen (B). SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

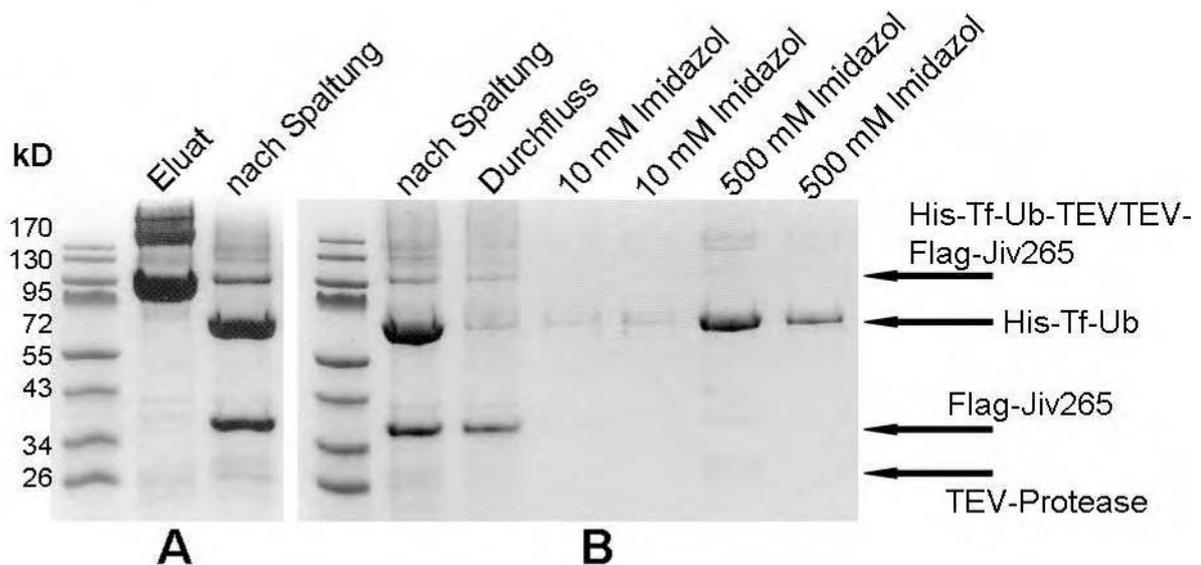


Abbildung 21: Spaltung und subtraktive Aufreinigung von His-Tf-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv265

SDS-PAGE; Coomassie-Färbung

Nach Spaltung mittels TEV-Protease bleibt ein kleiner Teil des Proteins ungespalten (A). B: Im Durchfluss der IMAC-Säule finden sich neben einem Großteil des Flag-Jiv265 auch noch Reste des His-Tf-Ub und des ungespaltenen Proteins. Ein geringer Teil des Flag-Jiv265 scheint an die Säule zu binden und lässt sich von dieser eluieren. Somit ist die subtraktive Reinigung in diesem Fall nicht zu 100 % effizient.

5.1.2 Expression und Reinigung von NS2

Die bekannte Zytotoxizität des NS2 Proteins für *E. coli*, verbunden mit seiner hydrophoben N-terminalen Hälfte, verhinderte bisher eine Expression in prokaryontischen Zellen. Auch C-terminal an Ubiquitin fusioniert wurden keine im Western Blot nachweisbaren Proteinmengen gebildet. Eine Expression des vollständigen NS2 des BVDV-1 zp Stammes CP7 in *E. coli* war nur durch C-terminale Fusion an das *Bacillus subtilis* Protein Mystic möglich. Mystic ist bekannt dafür, dass es seine Fusionspartner unter Umgehung normaler zellulärer Transportwege selbsttätig in Membranen einlagert und damit zytotoxische Effekte verhindern kann (Roosild et al., 2005).

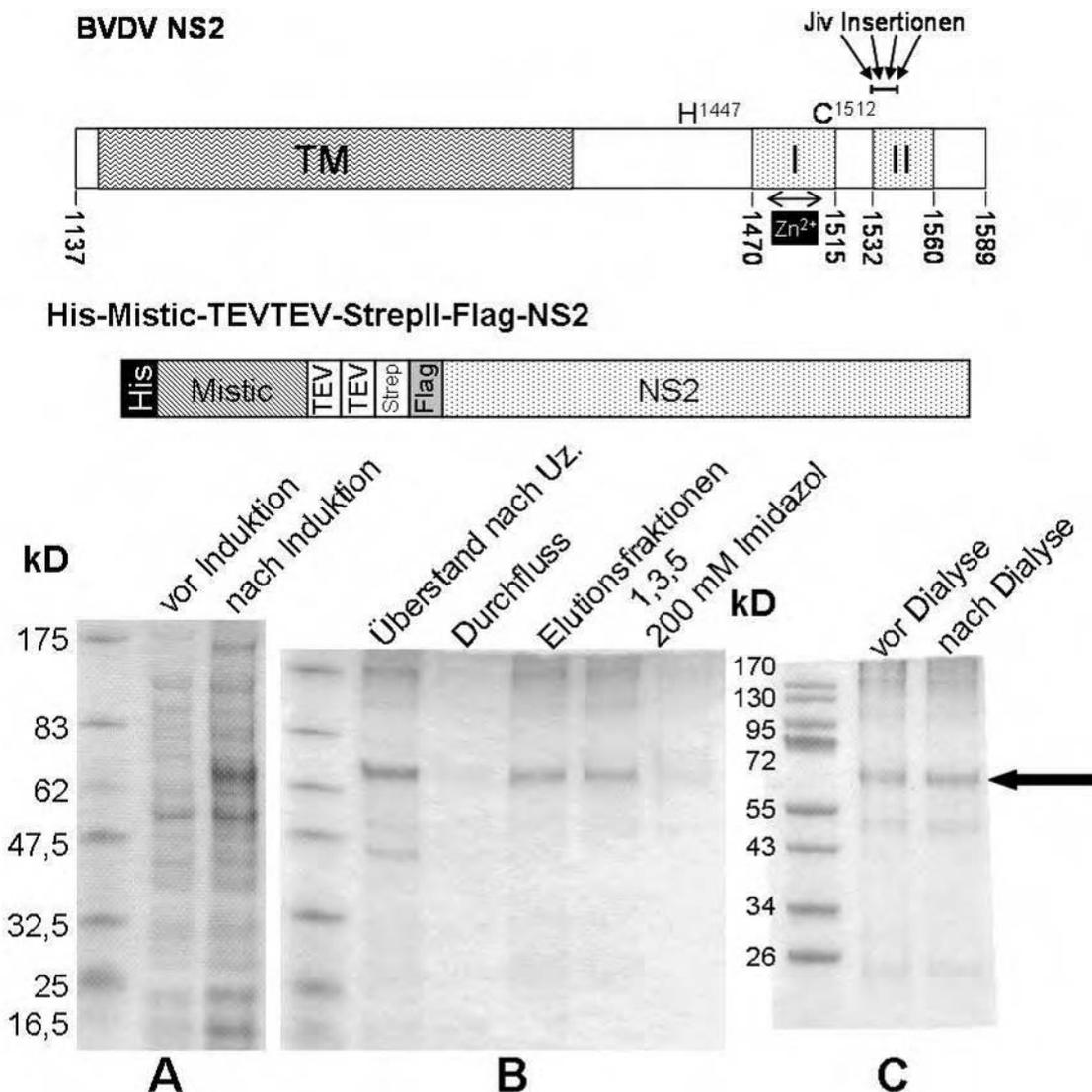


Abbildung 22: Expression, Aufreinigung und Rückfaltung von His-Mistic-TEVTEV-StrepII-Flag-NS2

Die Nummerierung entspricht den Aminosäurepositionen im Polyprotein des BVDV-1 Stammes SD-1. NS2 des BVDV-1 Stammes CP7 konnte in voller Länge nur als Fusion an das *B. subtilis* Protein Mystic exprimiert werden (A). Die Aufreinigung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (4 M GuHCl) per IMAC-Säule (B) und das Protein konnte rückgefaltet werden, indem man es zuerst gegen Puffer mit 8 M Harnstoff und dann gegen Puffer ohne denaturierendes Agens dialysierte (C). SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Ergebnisse

Das Fusionsprotein konnte nicht in löslicher Form gewonnen werden und eine Resolubilisierung durch Zusatz von LDAO (wie beschrieben in: Roosild et al., 2005) oder anderen Detergenzien (Triton X-100, CHAPS, Na-Taurodeoxycholat, ZWITTERGENT® 3-12, MEGA-10, Deoxy Big CHAP, Tween 20, Lubrol PX, Dodecyl-Glucopyranosid) war nicht erfolgreich. Daher wurde ein Protokoll zur Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (4 M GuHCl) etabliert. Die Rückfaltung des gereinigten Proteins erfolgte nach Dialyse gegen Puffer mit 8 M Harnstoff durch eine weitere Dialyse gegen Puffer ohne denaturierendes Agens (Abbildung 22). Es zeigte sich jedoch, dass das Fusionsprotein weder im denaturierten noch im rückgefalteten Zustand stabil ist.

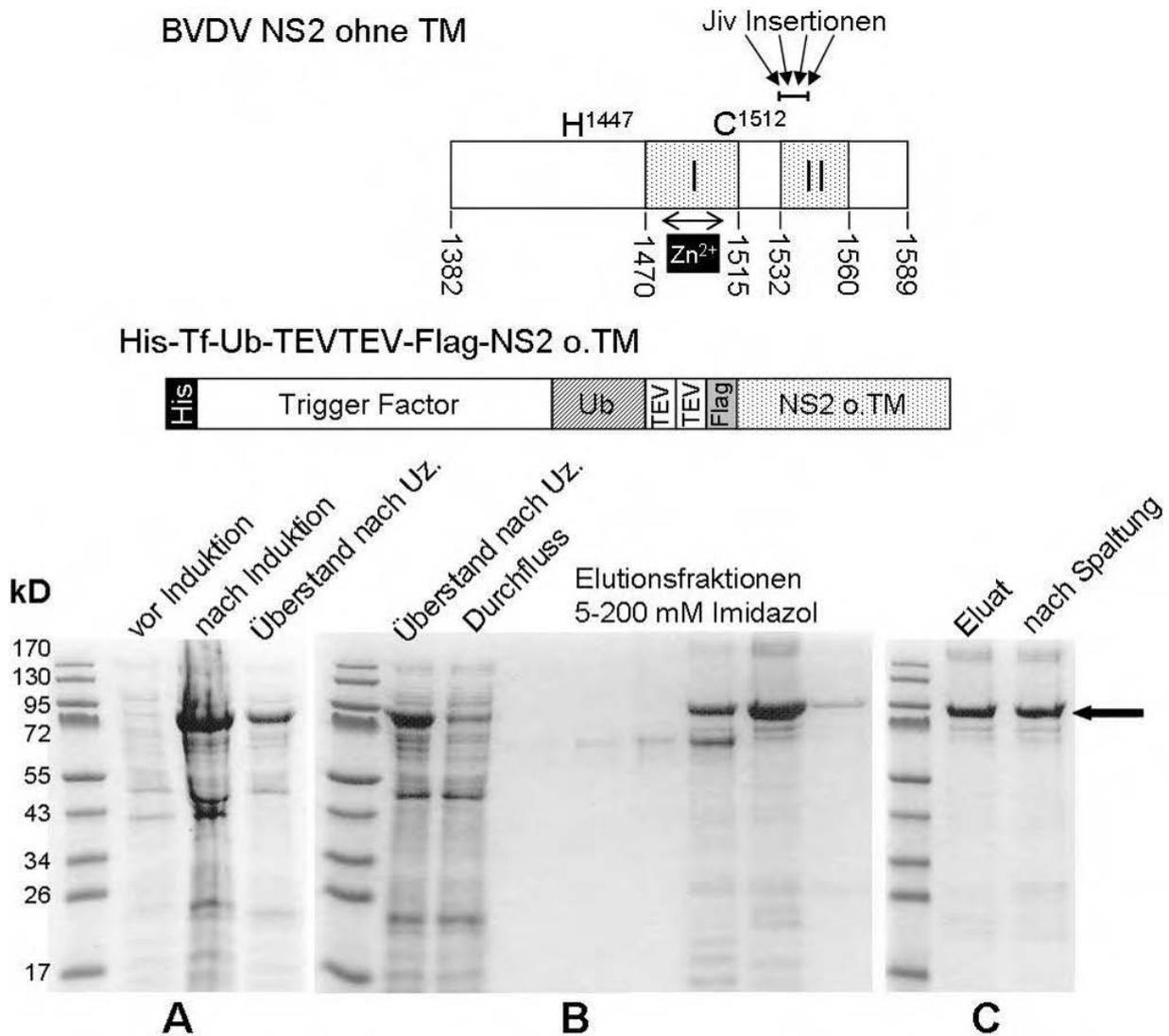


Abbildung 23: Expression, Aufreinigung und Spaltung von His-Tf-Ub-TEVTEV-Flag-NS2 o. TM

NS2 o. TM ist ein C-terminales Fragment von NS2 (AS 1382-1589) und beinhaltet das aktive Zentrum der Protease, den Zn^{2+} -Finger und die Jiv-Bindedomänen. Die Nummerierung entspricht den Aminosäurepositionen im Polyprotein des BVDV-1 Stammes SD-1. Als Fusion an Tf und Ub wird das NS2-Fragment zum großen Teil löslich exprimiert (A) und kann über eine IMAC-Säule gereinigt werden (B). Allerdings findet nach Zugabe der TEV-Protease keine Spaltung statt (C). SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Ergebnisse

N-terminal verkürztes NS2 (NS2 ohne TM), welches aus AS 1382-1589 (bezogen auf Aminosäurepositionen im BVDV-1 Stamm SD-1) des Polyproteins des BVD Virus CP7 besteht und keine der putativen Transmembrandomänen enthält, konnte als Fusion an Trigger Factor und Ubiquitin (pTf-Ub-TEVTEV-Flag-NS2 o. TM) analog zu His-Tf-Ub-TEVTEV-Flag-Jiv265 bakteriell und in löslicher Form produziert werden. Allerdings war das gereinigte Protein nicht mehr durch die TEV-Protease spaltbar (Abbildung 23).

5.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Rekombinant in *E. coli* exprimiertes und gereinigtes His-Ub-Flag-Jiv90 wurde zur Immunisierung von drei weiblichen BALB/c Mäusen genutzt. Nach drei Immunisierungen (42 Tagen) wurden die Seren im Western Blot auf Bildung von Antikörpern gegen das bakterielle Protein und gegen eukaryontisch exprimiertes GST-Jiv90 getestet. Alle drei Seren reagierten positiv und die Maus mit dem stärksten spezifischen Signal, bei gleichzeitig niedrigem Hintergrund, wurde für die Gewinnung der Milzzellen zum Zwecke der Fusion mit Myelomzellen ausgewählt (Abbildung 24).

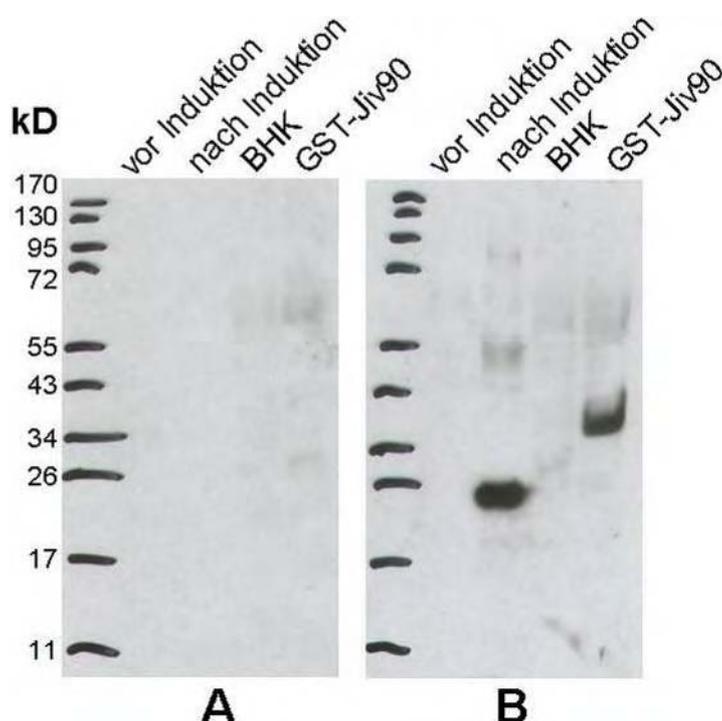


Abbildung 24: Detektion von Jiv90 mittels Mäuseserum im Western Blot

In BL21+pLys exprimiertes His-Ub-Flag-Jiv90 (nach Induktion) und in BHK-21 Zellen per T7-Vaccinia-System exprimiertes GST-Jiv90 wurde im jeweiligen Zellysate geblottet und mit Mäuseserum (1:10.000) als Primärantikörper nachgewiesen. A: Serum der Maus vor Beginn der Immunisierung; B: Serum der selben Maus nach drei Immunisierungen mit gereinigtem His-Ub-Flag-Jiv90

Die fusionierten Zellen wurden nach 11 Tagen Selektion zum ersten Mal und nach zwei weiteren Tagen zum zweiten Mal per indirektem ELISA mit His-Ub-Flag-Jiv90 als Antigen gescreent. Es konnten schließlich vier Hybridome gefunden werden, die dauerhaft spezifische Antikörper gegen His-Ubi-Flag-Jiv90 bildeten. Diese wurden vermehrt, zweimal durch Endpunktverdünnung kloniert und kryokonserviert. Durch Western Blots mit verschiedenen bakteriell und eukaryontisch exprimierten Proteinen, konnte bestimmt werden, gegen welche Teile des injizierten Proteins die gebildeten Antikörper gerichtet waren. Zudem konnten die mAk isotypisiert werden (Tabelle 1).

Ergebnisse

Tabelle 1: Charakterisierung der erzeugten Hybridomzelllinien

Hybridom	Subtyp	leichte Kette	Antigen
4.7F	IgG _{2a}	κ	His
9.4E	IgG ₁	κ	Jiv90
10.3A	IgG ₁	κ	Flag
10.10F	IgG _{2b}	κ	Ub

Es konnte also eine Hybridom Zelllinie gewonnen werden, die einen Jiv-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) erzeugt. Der mAk konnte erfolgreich in Western Blot, Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation zum Nachweis von pro- und eukaryontisch exprimiertem Jiv und Jiv90 eingesetzt werden (Abbildung 25).

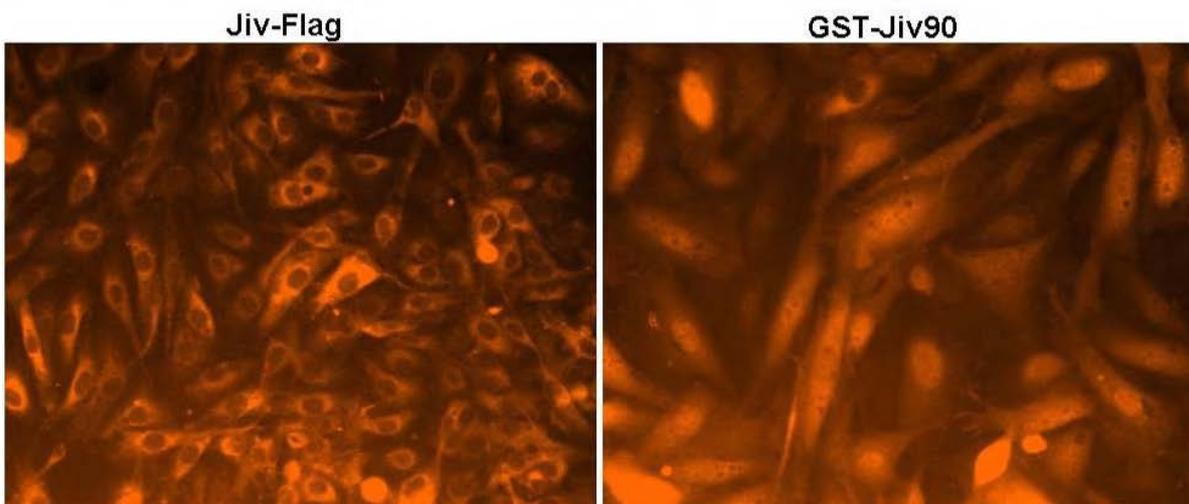


Abbildung 25: Detektion von Jiv und Jiv90

Induziert mit Doxyzyklin wurde Jiv-Flag, bzw. GST-Jiv90 in PT Tet On Zellen exprimiert und mit Überstand des Hybridoms 9.4E als Primärantikörper im Immunfluoreszenztest nachgewiesen. Dabei zeigt sich für das vollständige Jiv eine typische ER-Färbung. Jiv90 hingegen beinhaltet keine Transmembrandomäne und lokalisiert daher nicht am ER. Entsprechend sind die positiven Signale in der Zelle diffus verteilt.

Durch Western Blots mit per T7-Vaccinia-System produzierten Verkürzungen von Jiv90 konnte das Epitop des Jiv mAk bis auf zehn Aminosäuren eingegrenzt werden (Abbildung 26). Diese zehn Aminosäuren (SARYCAECNR) sind in den Jiv-Orthologen von Mensch, Schimpanse, Rhesusaffe und Ratte zu 100 % konserviert.

Auf gleiche Weise exprimierte Doppel-Alanin-Mutanten zeigten, dass nur 5 dieser 10 AS für die Bindung des mAk essentiell sind (Abbildung 27). Die Expression dieser 5 AS alleine an GST fusioniert konnte jedoch im Western Blot nur mit dem gegen GST gerichteten mAk nachgewiesen werden (Abbildung 28). Das Epitop des Jiv mAk kann somit vorerst auf 10 AS eingegrenzt werden.

Ergebnisse

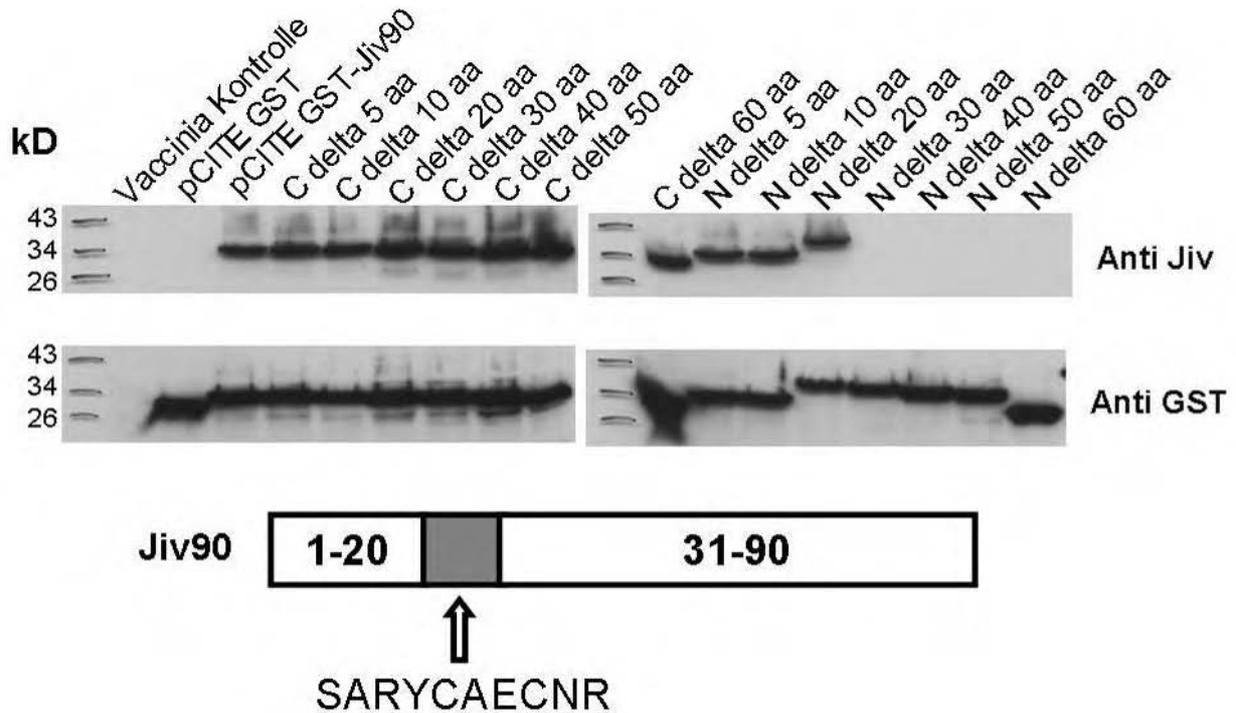


Abbildung 26: Eingrenzung des Epitops des Jiv mAk

Per MVA T7-Vaccinia-Virus-System in BHK-21 als GST-Fusion exprimierte N-terminale (N delta) und C-terminale (C delta) Verkürzungen von Jiv90 werden im Western Blot mit Anti Jiv und Anti GST mAk detektiert. Dabei zeigt sich, dass ein N-terminal um 20 AS verkürztes Jiv90 und ein C-terminal um 60 AS verkürztes Jiv90 noch vom Jiv mAk erkannt werden. Das Epitop des mAk befindet sich also innerhalb der AS 21 bis 30.

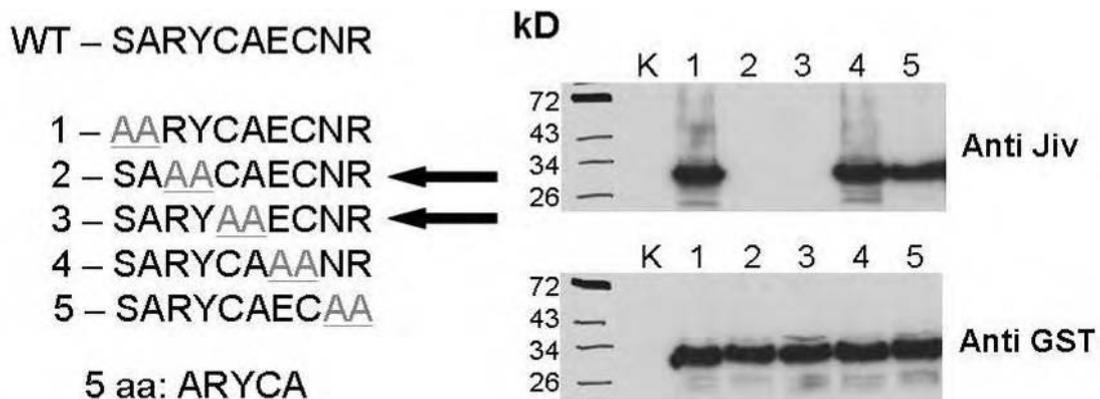


Abbildung 27: Bestimmung der für die Ak-Bindung wichtigen AS

Per MVA T7-Vaccinia-Virus-System in BHK-21 als GST-Fusion exprimierte Doppel-Alanin-Mutanten von Jiv90 werden im Western Blot mit Anti Jiv und Anti GST mAk detektiert. Dabei zeigt sich, dass nur ein Bereich von 5 AS nicht verändert werden darf, um die Bindung des Jiv mAk zu gewährleisten. K: Mit Vaccinia-Virus MVA T7 infizierte BHK-21

Ergebnisse

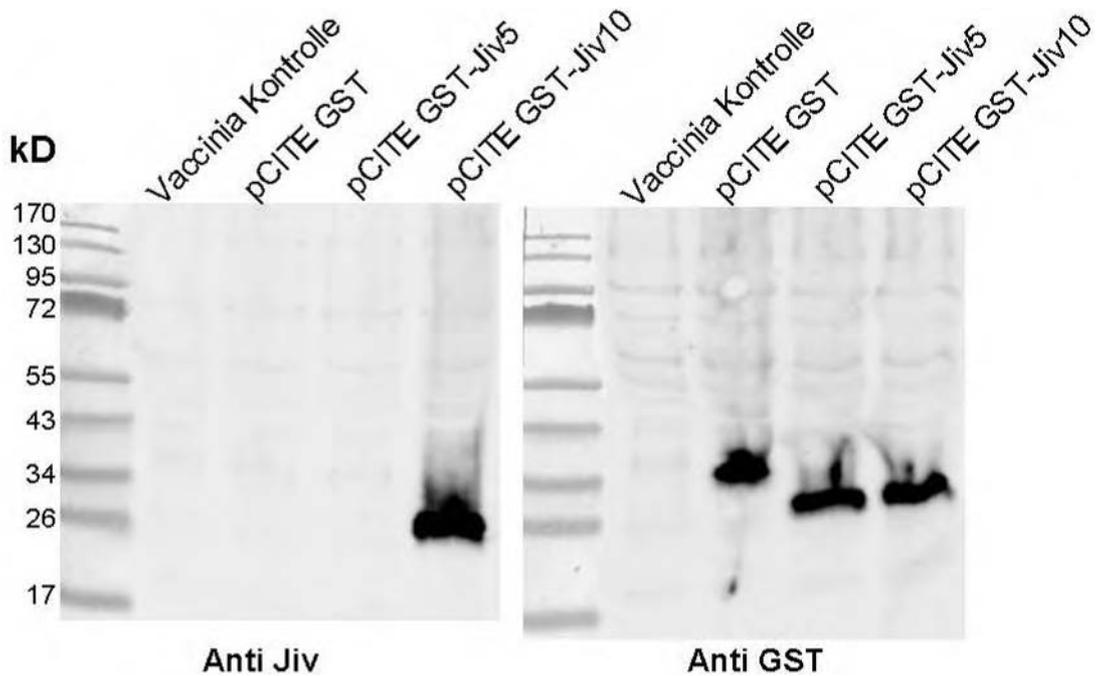


Abbildung 28: Bestimmung des Epitops des Jiv mAk

Per MVA T7-Vaccinia-Virus-System in BHK-21 als GST-Fusion exprimierte Fragmente von Jiv90 (Jiv5: ARYCA; Jiv10: SARYCAECNR) werden im Western Blot mit Anti Jiv und Anti GST mAk detektiert. Dabei zeigt sich, dass Jiv10 erkannt wird, jedoch am nur 5 AS großen Jiv-Fragment keine Antikörper-Bindung mehr erfolgt.

Desweiteren konnte mit diesem mAk das Protein NS2-3, genauer gesagt die Jiv90 Insertion im NS2, des zp BVDV-1 Stammes NADL per Immunfluoreszenz und im Western Blot detektiert werden (Abbildung 29 und Abbildung 30).

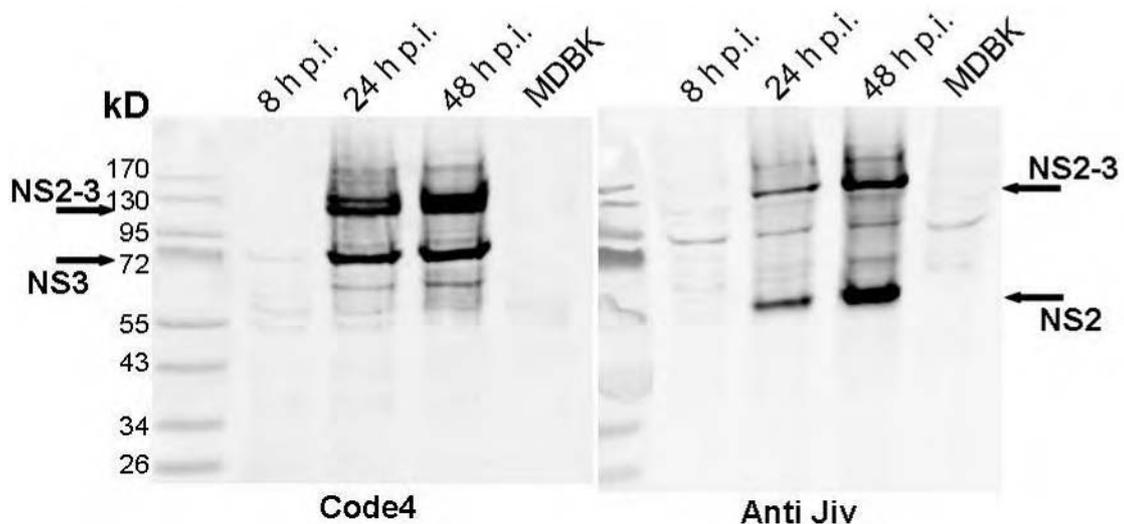


Abbildung 29: Detektion von NS2-3, NS2 und NS3 des BVD Virusstammes NADL im Western Blot

Das Lysat NADL infizierter (MOI = 1) MDBK Zellen wurde nach verschiedenen Zeitpunkten post infectionem mit Code4 und Anti Jiv mAk auf die Bildung der Proteine NS2-3, NS2 und NS3 untersucht. MDBK: nicht infizierte Zellen

Ergebnisse

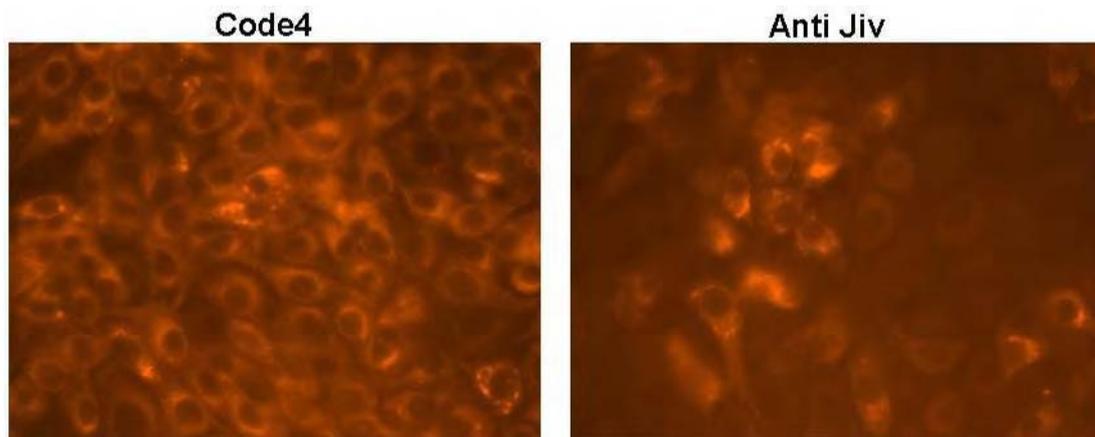


Abbildung 30: Detektion von NS2-3, NS2 und NS3 des Stammes NADL im Immunfluoreszenztest

Mit NADL infizierte (MOI = 5) MDBK Zellen wurden 24 h p.i. fixiert und mit Code4, bzw. Anti Jiv mAk im Immunfluoreszenztest untersucht. Mit beiden Antikörpern konnte eine Infektion nachgewiesen werden.

Versuche mit diesem Antikörper das endogene zelluläre Jiv in verschiedenen Zelllinien nachzuweisen waren bisher nicht erfolgreich. Er wurde zudem anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt, die damit die physiologische Funktion von DRiP78 untersuchen wollen.

5.3 Erzeugung und Charakterisierung eines chimären Virus mit einer Ubiquitin-Insertion zwischen NS2 und NS3

Zur Untersuchung der Funktion des ungespaltenen NS2-3 bei der pestiviralen Virionmorphogenese wurde der zp BVDV-1 Stamm Osloss als Modellvirus ausgewählt, da er eine Ubiquitin-Insertion zwischen NS2 und NS3 besitzt und daher kein ungespaltenes NS2-3 zur Verfügung haben sollte. Um herauszufinden wie dieses Virus dennoch fähig ist zu replizieren, sollte eine lebensfähige Virus-Chimäre erzeugt und analysiert werden, deren Genom aus Sequenzen des Osloss-Stammes und eines nzp Virus besteht.

												Generierung infektiöser Viren	
NCP7-5A												++++	
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2		NS3	NS4A	NS4B	NS5A		NS5B
NCP7/Osloss Ub													-
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A		NS5B
NCP7/Osloss NS2-Ub													-
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A		NS5B
NCP7/Osloss E2-Ub													-
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A		NS5B
NCP7/Osloss Ub-NS4A													-
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A		NS5B
NCP7/Osloss NS2-4A												+	
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A	NS5B	
NCP7/Osloss E2-NS4A												+	
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A	NS5B	
NCP7/Osloss NS2-4A H/A C/A												+	
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2 ^{**}	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A	NS5B	
H1447-A + C1512-A Mutation: Inaktivierung der NS2 Autoprotease													
NCP7/Osloss NS2-4A H/A C/A Ub wt												+	
N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	p7	NS2 ^{**}	Ub	NS3	NS4A	NS4B	NS5A	NS5B	
Ub wt: Ubiquitin-Sequenz entspricht der AS-Sequenz des bovines Ub													

Abbildung 31: Schematische Darstellung des kodierenden Bereiches der cDNA-Konstrukte

Weiß unterlegte Bereiche entsprechen der Sequenz des nzp Stammes NCP7, schwarze der Sequenz des zp Stammes Osloss. Wenn die Osloss-Sequenzen mindestens die Proteine NS2-NS4A umfassen, können nach Elektroporation in MDBK Zellen infektiöse Viren im Überstand nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Rolle der NS2 Protease und der Mutation im Osloss Ub bei der Virionmorphogenese wurden mutierte Konstrukte hergestellt, die sich jedoch völlig identisch zu NCP7/Osloss NS2-4A verhielten.

Ergebnisse

Durch die Anwendung revers genetischer Methoden konnten mehrere cDNA-Klone chimärer BVD-Viren erzeugt werden, die auf der infektiösen cDNA des nzp Stammes NCP7 basieren und unterschiedlich lange Anteile der Gensequenzen des zp Stammes Osloss umfassen. Dazu wurden per RT-PCR aus der Gesamt-RNA Osloss infizierter MDBK Zellen virale Genomfragmente amplifiziert, sequenziert und in den NCP7 cDNA Gesamtklon pNCP7-5A kloniert. Diese chimären cDNA Genome wurden in vitro transkribiert und die Transkripte in MDBK Zellen elektroporiert. Durch Immunfluoreszenz (IF)-Tests von elektroporierten Zellen nach 24 h und 48 h mit Code4 als Primärantikörper konnte gezeigt werden, ob die transfizierte RNA zur Bildung von Virusprotein führte und ob eine Ausbreitung der positiven Signale im Vergleich von 24 h zu 48 h stattfand. Letzteres galt als erster Hinweis auf die Bildung infektiöser Viren. Bestätigt wurde dies dann durch Inkubation von MDBK Zellen mit den steril filtrierten Überständen der elektroporierten Zellen. Zeigten sich in einem nach 48 h durchgeführten Code4 IF-Test positive Zellen, so war das transfizierte chimäre Genom fähig zur Bildung infektiöser Virionen.

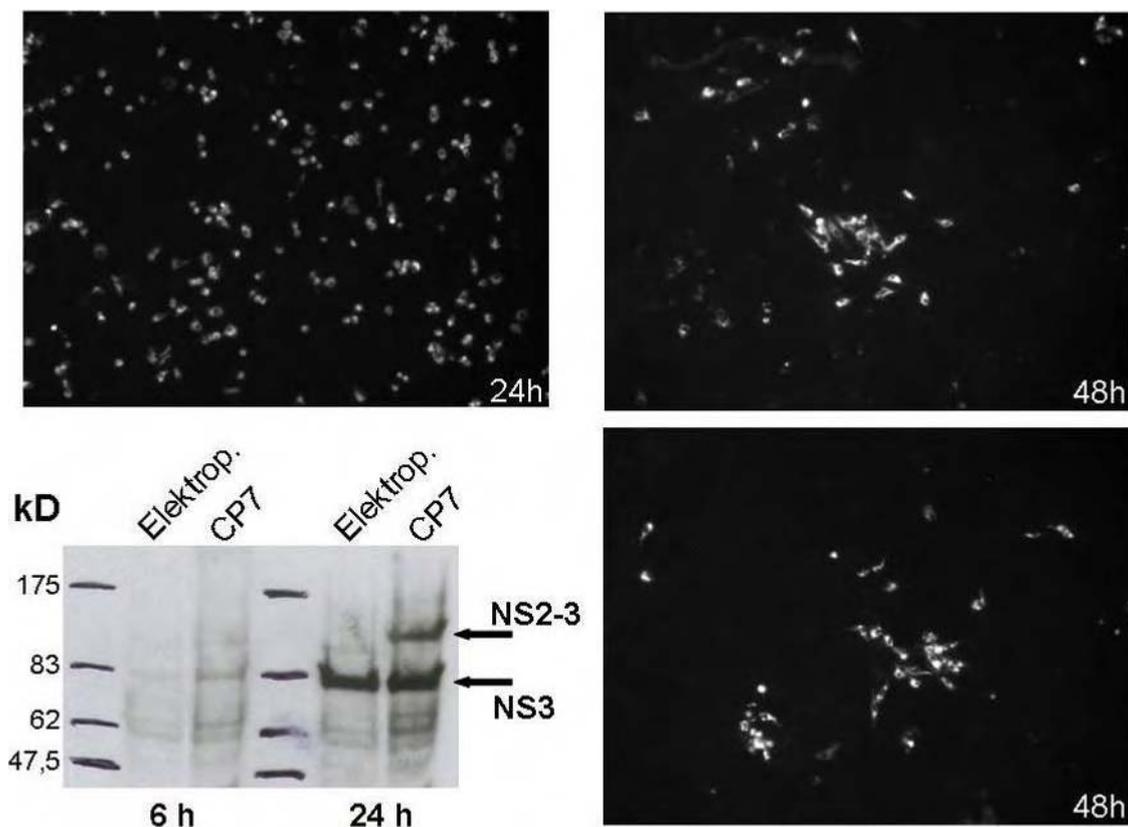


Abbildung 32: Elektroporation des Transkripts der chimären cDNA pNCP7/OsI NS2-4A in MDBK

Nach 24 h sind im Immunfluoreszenztest mit Code4 mAk viele positive Einzelzellen zu erkennen. Nach 48 h bilden sich an mehreren Stellen Gruppen positiver Zellen, was ein Hinweis auf eine Ausbreitung infektiöser Viren ist. Im Western Blot mit Code4 mAk kann die Expression von NS2-3 und NS3 nach Elektroporation im Vergleich zu mit zp BVDV-1 CP7 infizierten MDBK Zellen untersucht werden. Dabei zeigt sich, dass in den mit NCP7/OsI NS2-4A transfizierten Zellen (Elektrop.) kein ungespaltenes NS2-3 detektiert werden kann.

Ergebnisse

Es stellte sich heraus, dass ein NCP7 Genom, welches zu BVDV Osloss-Sequenzen umfasst, die für NS2 und das darauf folgende Ubiquitin kodieren, keine infektiösen Virionen bildet. Erst wenn der Anteil des Osloss Genoms mindestens den kompletten Bereich NS2-Ub-NS3-NS4A umfasst, kommt es überhaupt zur Bildung infektiöser Virionen (pNCP7/Osl NS2-4A). Dieser Prozess war aber sehr ineffizient. Die mit Elektroporations-Überstand infizierten Zellen zeigten nur wenige (1-3) positive Infektionsherde mit jeweils mehreren fluoreszierenden Zellen (Abbildung 33). Zudem konnten mit dem Überstand dieser Zellen keine weiteren MDBK Zellen infiziert werden.

Zur Untersuchung der Rolle der NS2 Protease wurden per gerichteter Mutagenese Chimären mit zwei Mutationen im NS2-Gen generiert, die beide zum Verlust der Proteaseaktivität führen (H1447-A und C1512-A) (Lackner et al., 2004). Nach Elektroporation verhielt sich die mutierte Chimäre vollkommen identisch zum Ausgangsvirus. Dieser Befund spricht stark gegen eine Rolle der NS2 Protease bei Virionmorphogenese und RNA-Replikation.

Ebenso konnte eine besondere Bedeutung der Punktmutation (G76S) des Osloss-Ub im Vergleich zum bovinen Ub ausgeschlossen werden. Ein chimärer cDNA-Gesamtklon, welcher die Mutation in der Ub-Sequenz nicht trägt (pNCP7/Osl NS2-4A H/A C/A Ub wt) verhielt sich nach Elektroporation völlig identisch zum Klon pNCP7/Osl NS2-4A H/A C/A.

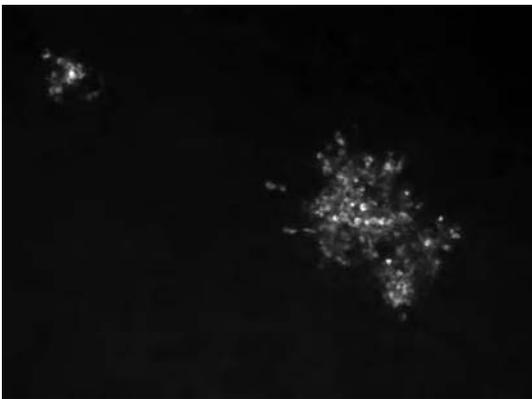


Abbildung 33: Infektion von MDBK Zellen mit Elektroporations-Überstand

Nach 48 h Inkubation von MDBK Zellen mit sterilisiertem Überstand elektroporierter Zellen (pNCP7/Osl NS2-4A; 48 h nach Elektroporation) sind im Immunfluoreszenztest mit Code4 wenige Infektionsherde sichtbar.

Durch Passagierung von MDBK Zellen, die mit chimärem Virus aus Elektroporations-Überstand infiziert wurden, konnte ein Virus erzeugt werden, welches annähernd normale Virustiter erreicht. Von Passage zu Passage konnte zunehmend ein zytopathischer Effekt beobachtet werden. Es bildeten sich typische Plaques, die Zellen lösten sich schließlich ab und der Zellrasen wurde löchrig. Eine Titration des Zellüberstandes nach der vierten Passage ergab einen Virustiter von 2×10^5 Viren / ml. Ein nach der sechsten Passage gewonnener Virus-Stock hatte einen Titer von 4×10^5 Viren / ml und wurde durch anschließende dreimalige Plaquereinigung biologisch kloniert. Nach der Reinigung

Ergebnisse

erreichte das klonierte Virus einen Titer von 2×10^7 Viren/ml und nach einem Vermehrungsschritt konnte ein Virus-Stock mit einem Titer von 3×10^7 Viren/ml erhalten werden.

Zur Untersuchung der NS2-3 Prozessierung des Virus nach Elektroporation und nach Passagierung wurde nach verschiedenen Zeitpunkten gewonnenes Zelllysate von elektroporierten, bzw. infizierten Zellen im Western Blot mit Code4 mAk untersucht. Hierbei war weder nach Elektroporation (Abbildung 32), noch nach Infektion ungespaltenes NS2-3 detektierbar (Abbildung 34). Auch wenn die Existenz geringer Mengen ungespaltenen NS2-3 auf diese Weise nicht ausgeschlossen werden kann, so zeigt sich doch ein deutlicher Unterschied in der NS2-3-Prozessierung der Virus-Chimäre und anderer zp BVDV-1 Stämme (siehe auch Abbildung 29).

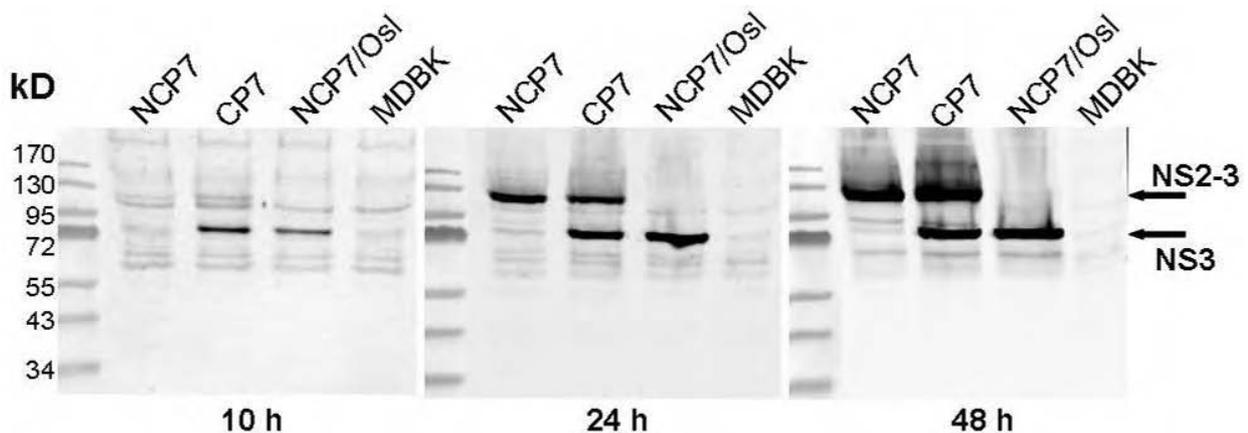
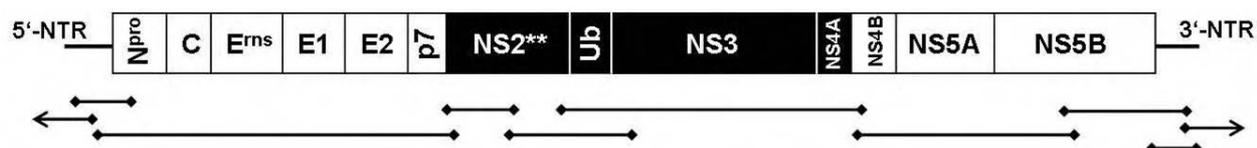


Abbildung 34: Vergleich der NS2-3 Expression verschiedener BVD Viren im Western Blot

MDBK Zellen wurden mit NCP7, CP7 und der Plaque-gereinigten Virus-Chimäre jeweils mit einer MOI = 1 infiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten p.i. wurde Zelllysate geerntet und im Western Blot mit Code4 mAk untersucht. Der nzp Stamm NCP7 zeigt dabei nahezu ausschließlich ungespaltenes NS2-3, der zp Stamm CP7 größere Mengen NS3 und zu späteren Zeitpunkten zunehmend NS2-3 und die NCP7/Osloss Virus-Chimäre nur NS3. MDBK: nicht infizierte Zellen

Auf Basis von Gesamt-RNA infizierter MDBK Zellen wurden per RT-PCR insgesamt 9 überlappende Genom-Fragmente des Plaque-gereinigten Virus amplifiziert und deren DNA Sequenz bestimmt werden (Abbildung 35). Durch eine Direktsequenzierung der RT-PCR-Amplifikate wurde eine Konsensus-Sequenz gewonnen und so mehrere Sequenzveränderungen im passagierten Virus lokalisiert. Im Vergleich zum Ausgangsklon NCP7/Osloss NS2-4A H/A C/A wurden sieben Änderungen der Nukleotidsequenz gefunden, die zu Aminosäure-Austauschen führten und eine Mutation im 3' nichttranslatierten Bereich (Tabelle 2).

Ergebnisse



Fragment	Nukleotide (bezogen auf pNCP7/Osl NS2-4A)	Größe (kb)
5'	1884-2356	472
XhoI-KasI	2071-5676	3.605
KasI-FspI	5586-6608	1.022
FspI-AgeI	6474-7389	915
Sall-NsiI	6854-9697	2.843
NsiI-ClaI	9495-13181	3.686
ClaI-AatII	13073-14351	1.278
3'	14140-14356	216
5'-3'	14338-2096	251

Abbildung 35: RT-PCR-Fragmente zur Sequenzierung des Virusgenoms

Schematische Darstellung des Genoms der Virus-Chimäre und Lage der 9 überlappenden RT-PCR-Fragmente. Weiß unterlegte Bereiche entsprechen der Sequenz des nzp Stammes NCP7, schwarze der des zp Stammes Osloss. Zur Amplifizierung der äussersten Enden des Genoms war eine nested RT-PCR mit zirkularisierter Virus-RNA nötig. Der Revers-Primer basenpaarte folglich im 5'-Ende und der Vorwärts-Primer im 3'-Ende des Virusgenoms. Das entsprechende Amplifikat „5'-3'“ wird durch die beiden Pfeile symbolisiert.

Tabelle 2: Nukleotidaustausche der Konsensus-Sequenz im Vergleich zum Ausgangsklon

Sieben Austausche in der kodierenden Sequenz führen zu AS-Austauschen in den Proteinen E^{ms}, E2, p7, NS2, NS3 und NS5A. Zudem findet sich eine Mutation im 3' nichttranslatierten Bereich. Nukleotidangaben entsprechend der Sequenz von pNCP7/Osl NS2-4A; AS-Positionen entsprechend Polyprotein von NCP7

nt	Lokalisation	Basen	Aminosäure	Mutation
2367	N ^{pro}	ccg-cca	P-P	-
3451	E^{ms}	aca-tca	T-S	T403-S
3579	E ^{ms}	att-ata	I-I	-
4540	E2	ttg-ctg	L-L	-
4707	E2	gtt-gtc	V-V	-
4892	E2	ccg-ctg	P-L	P883-L
5555	p7	acc-atc	T-I	T1104-I
6047	NS2	cga-caa	R-Q	R1268-Q
7523	NS3	tta-tca	L-S	L1684-S
10317	NS4B	gag-gaa	E-E	-
10912	NS5A	tat-cat	Y-H	Y2814-H
11423	NS5A	aat-agt	N-S	N2984-S
14324	3' NTR	a-c	-	3' NTRmut

Ergebnisse

Um diejenigen Mutationen identifizieren zu können, welche für die gesteigerte Produktion infektiöser Viren relevant sind, wurden die zuvor genannten acht Austausche zuerst einzeln in den Ursprungs-cDNA-Klon rückkloniert. Es zeigte sich, dass alle Einzelmutanten nach Elektroporation keine deutlichen Unterschiede zum Ursprungs-Konstrukt zeigten. Wenn man die entsprechenden Überstände auf neue MDBK Zellen gab, führten jedoch zwei der Einzel-Mutanten, der Austausch in NS2 und in stärkerem Maße der Austausch in der 3`NTR, zu mehr fluoreszierenden Infektionsherden und damit zu einer geringen Erhöhung der Menge infektiöser Viren im Vergleich zum Ausgangsklon. Die Kombination dieser beiden Mutationen in einer cDNA hatte dann schließlich eine sehr deutliche Steigerung der Produktion infektiöser Viren zur Folge. Bereits nach Elektroporation waren mehr positive Zellen vorhanden und es zeigte sich ein zytopathischer Effekt, der ein Ausdünnen des Zellrasens zu 48 h nach Elektroporation bewirkte (Abbildung 36). Wurde der Elektroporations-Überstand auf neue Zellen gegeben, so zeigte sich ebenso ein deutlicher ZPE und die wenigen nach 48 h verbliebenen Zellen waren nahezu komplett positiv. Der Ausgangsklon und die Einzelmutanten führten nur zu wenigen positiven Zellfoci und zu keinem ausgeprägten ZPE (Abbildung 37).

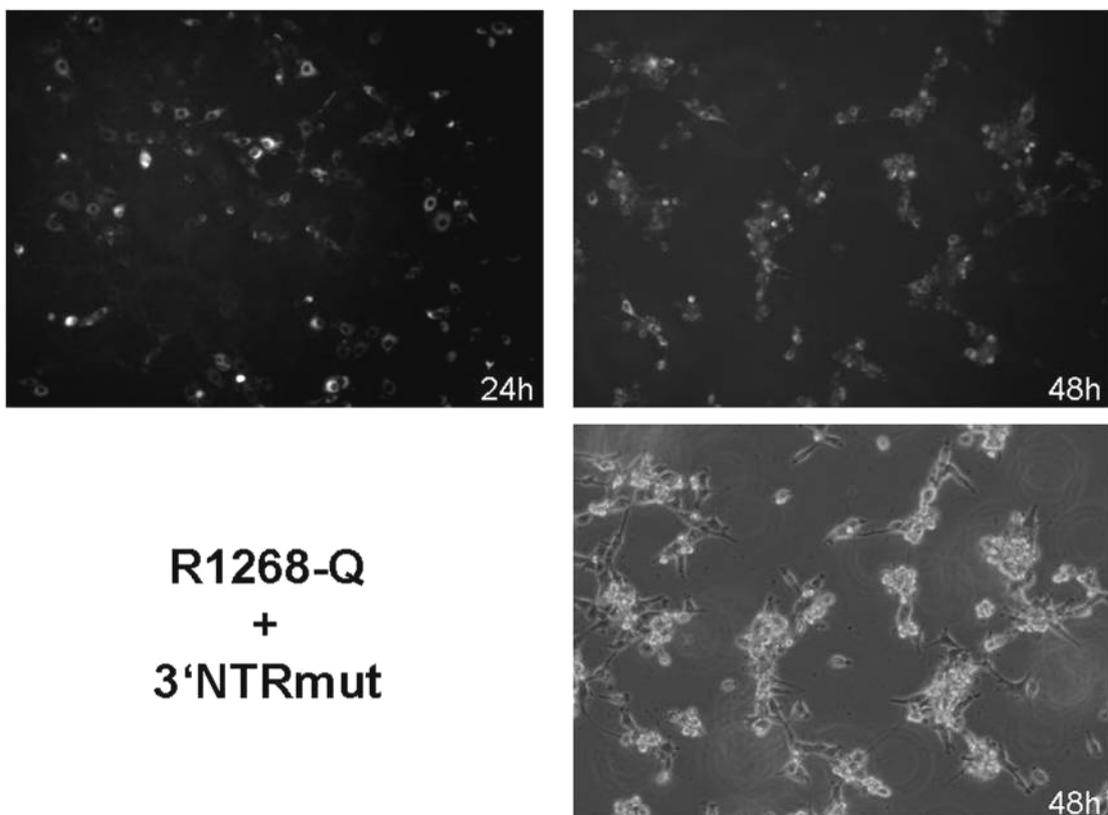


Abbildung 36: Elektroporation der Doppelmutante, Immunfluoreszenz mit Code4 mAk
Nach 24 h sind viele Einzelzellen, nach 48 h nahezu alle verbliebenen Zellen positiv.
Unteres Bild: Durchlichtaufnahme des darüber befindlichen IF-Bildausschnittes.

Ergebnisse

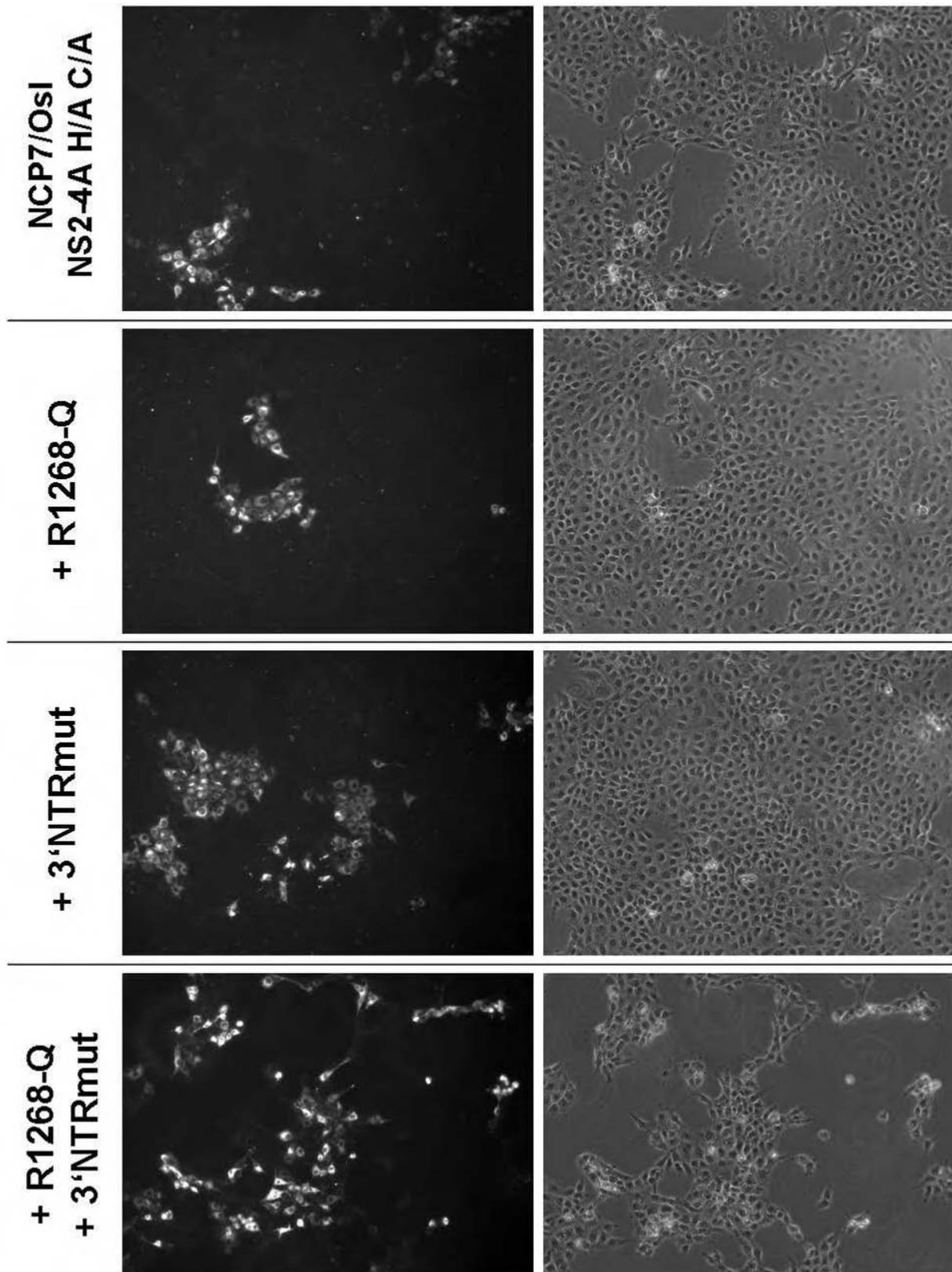


Abbildung 37: MDBK Zellen nach 48 h Inkubation mit je 1 ml Überstand elektroporierter Zellen

linke Seite: Immunfluoreszenz mit Code4 mAk; rechte Seite: gleicher Bildausschnitt im Durchlicht.

Sowohl beim Ausgangsklon, als auch bei der Einzelmultation im NS2 (R1268-Q) finden sich nach 48 h Inkubation nur wenige Foci positiver Zellen. Die 3'NTR-Mutante zeigt etwas mehr Foci, der Zellrasen ist jedoch ebenfalls weitgehend intakt. Dagegen führt die Doppelmutante zu einem starken Ausdünnen des Zellrasens und die verbliebenen Zellen sind annähernd vollständig positiv.

Ergebnisse

Eine vergleichende Titration der Elektroporations-Überstände ergab einen Anstieg der Menge gebildeter Viren um eine \log_{10} -Stufe bei der 3`NTR-Einzelmutante und die Doppelmutante erreichte einen Titer von über 10^6 Viren / ml (Tabelle 3).

Tabelle 3:
Vergleichende Virustitration der Elektroporations-Überstände (48 h) und des Plaque-gereinigten Virus-Stock

	Titer (Viren/ml)
NCP/Osl	4×10^2
R1268-Q (NS2)	3×10^2
3`NTRmut	3×10^3
R1268-Q (NS2) + 3`NTRmut	5×10^6
R1268-Q (NS2) + 3`NTRmut + Y2814-H + N2984-S (NS5A)	3×10^6
R1268-Q (NS2) + 3`NTRmut + L1684-S (NS3)	4×10^6
R1268-Q (NS2) + 3`NTRmut + T403-S (E^{ms}) + P883-L (E2) + T1104-I (p7)	2×10^7
Virus-Stock	3×10^7

Ausgehend von der Doppelmutante (NS2 + 3`NTR) wurden weitere der gefundenen Mutationen in dieses Konstrukt rückkloniert, um zu entscheiden, ob auch diese einen Beitrag zu einer effektiveren Virionmorphogenese leisten und der Virustiter noch weiter erhöht werden kann. Dabei zeigte sich, dass eine Ergänzung der beiden Mutationen in NS5A zu keiner Veränderung des Titers im Vergleich zur Doppelmutante führte. Ebenso bewirkte das Hinzufügen des Austausches in NS3 keinen weiteren Titeranstieg. Wurden jedoch die Mutationen in E^{ms} , E2 und p7 zusammen in die Doppelmutante eingefügt, so erhöhte sich der Titer weiter und erreichte das Niveau des Plaque-gereinigten Virus-Stocks (Tabelle 3).

6 Diskussion

6.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

6.1.1 Expression und Reinigung von Jiv

Das zelluläre Protein Jiv ist das bovine Ortholog des Proteins DnaJC14 und gehört damit zur Familie der J-Domänen-Proteine, deren bekannteste Vertreter DnaJ von *E. coli* und das eukaryontische Hsp40 (heat shock protein 40) sind. J-Domänen-Proteine werden entsprechend ihres Aufbaus in drei Subfamilien eingeteilt (Cheetham und Caplan, 1998). Die Proteine der Unterfamilie A beinhalten dabei alle drei der für DnaJ typischen Regionen: Die J-Domäne, über welche sie mit dem Chaperon Hsp70 interagieren, eine Glycin/Phenylalanin-reiche Region und vier Cystein-Motive, die zwei Zink-Ionen koordinieren. Diese Zink-bindende Region fehlt Mitgliedern der Subfamilie B und gemeinsames Merkmal der Subfamilie C ist lediglich die J-Domäne. Jiv (DnaJC14) enthält jedoch zusätzlich zur J-Domäne noch zwei Cystein-Motive, die ein Zink-Ion koordinieren könnten.

Im Allgemeinen haben J-Domänen-Proteine Bedeutung bei der Faltung und dem Transport von Proteinen in der Zelle, etwa als Co-Chaperone. Vor allem für das Jiv-Ortholog der Ratte, DRiP78 (*dopamine-receptor interacting protein 78*), wurden verschiedene Funktionen bei Transport oder Assemblierung von Rezeptoren postuliert (Bermak et al., 2001; Dupré et al., 2007; Leclerc et al., 2002). Über die physiologische Funktion von Jiv ist jedoch noch nichts bekannt. Aus diesem Grund und zur weiteren Untersuchung der Interaktion von Jiv und dem Nichtstrukturprotein NS2 der Pestiviren sollte in dieser Arbeit eine bakterielle Expression und Aufreinigung von Jiv etabliert werden.

Expressionsstudien in eukaryontischen Zellen zeigten, dass das 90 Aminosäuren große Fragment Jiv90 in der Lage ist, pestivirales NS2 zu binden und die NS2-3-Spaltung zu induzieren (Lackner et al., 2005; Lackner et al., 2006; Rinck et al., 2001). Dies legte die Vermutung nahe, dass Jiv90 eine eigenständige Domäne darstellt. Daher wurden die ersten bakteriellen Expressionsversuche in dieser Arbeit mit Jiv90 durchgeführt. Es stellte sich jedoch heraus, dass Jiv90 in Bakterien nur als Fusionsprotein exprimiert werden konnte (C-terminal an GST oder C-terminal an Ubiquitin), und dass es nach Abspaltung des Fusionspartners instabil war. Jiv90 scheint also entweder keine eigenständige

Domäne zu sein, oder es fehlen in *E. coli* wichtige Kofaktoren für die Stabilität oder Faltung von Jiv90. Basierend auf bioinformatischen Analysen wurde das exprimierte Jiv-Fragment schrittweise vergrößert, so dass es schließlich den Bereich ab der putativen Transmembrandomäne bis zum C-Terminus umfasste (Jiv339). Dabei nahm die Stabilität der Fragmente nach Abspaltung vom Fusionspartner zu, jedoch gleichzeitig die Löslichkeit des Fusionsproteins ab.

Ubiquitin von *S. cerevisiae* und Trigger Factor von *E. coli* sind bekannt dafür, dass sie als Fusionspartner das Expressionslevel und die Löslichkeit von bakteriell exprimierten Proteinen verbessern (Butt et al., 1989; Thapa et al., 2008; Yoo et al., 1989). Durch die Verwendung von Trigger Factor und Ubiquitin als Fusionspartner konnten größere Fragmente des zellulären Proteins Jiv in löslicher Form in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Die Reinheit des per TEV-Protease abgespaltenen Jiv-Peptids war bisher jedoch noch nicht ausreichend für experimentelle Strukturanalysen.

6.1.2 Expression und Reinigung von NS2

Aufgrund toxischer und hydrophober Eigenschaften des pestiviralen Nichtstrukturproteins NS2 konnte dieses bisher nicht in prokaryontischen Zellen exprimiert werden. Gemäß bioinformatischen Vorhersagen befinden sich in der N-terminalen Region des Proteins bis zu acht Transmembranbereiche durch welche es an der ER-Membran verankert ist. NS2 des nah verwandten Hepatitis C Virus konnte in Bakterien hergestellt und zur Bestimmung der Kristallstruktur genutzt werden, indem ein um den hydrophoben N-Terminus verkürztes Peptid exprimiert wurde (Lorenz et al., 2006). Im Gegensatz zu HCV ist jedoch der N-terminale Bereich des pestiviralen NS2 essentiell für die Funktion der NS2 Protease (Lackner et al., 2004). Daher wurde in dieser Arbeit zuerst versucht NS2 in voller Länge zu exprimieren. Dies gelang durch C-terminale Fusion des NS2 von BVDV-1 Stamm CP7 an das *B. subtilis* Protein Mistic. Dieses wurde in der Literatur als geeigneter Fusionspartner für die Expression von Proteinen mit Transmembrandomänen beschrieben (Roosild et al., 2005). Eine Aufreinigung von Mistic-NS2 gemäß der Literaturangaben durch Herauslösen aus der Membran mit Detergenzien gelang jedoch nicht. Stattdessen erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung. Das erhaltene Protein erwies sich jedoch als nicht stabil und derzeit wird eine Optimierung des Expressions- und Reinigungsprotokolls in Zusammenarbeit mit dem biochemischen Institut der Universität Halle versucht.

Die Probleme bei der Aufreinigung des kompletten NS2 führten schließlich zu

Expressionsversuchen mit N-terminal um die putativen Transmembranbereiche verkürztem NS2. Als C-terminale Fusion an Ubiquitin konnte dieses Peptid (NS2 ohne TM) in *E. coli* exprimiert werden; das Protein war jedoch vollständig unlöslich. Eine Fusion an Trigger Factor und Ubiquitin, analog zu den Jiv-Expressionen, führte schließlich zu löslichem Protein, das sich aufreinigen, jedoch nicht mehr durch die TEV-Protease spalten lässt. Es ist wiederholt berichtet worden, dass manche Fusionsproteine für die TEV-Protease ungeeignete Substrate sind, da sie entweder in löslichen Aggregaten vorliegen oder gefaltete Strukturen des Fusionsproteins nahe der TEV-Spaltstelle diese unzugänglich für die Protease machen. Im letzteren Fall konnte das Einfügen von Spacer-Regionen zwischen Schnittstelle und Zielprotein das Substrat wieder zugänglich machen. Im vorliegenden Fall ist jedoch ein solcher Abstandhalter bereits in Form des Flag-Tags vorhanden. Daher soll nun eine Abspaltung des Fusionspartners mittels anderer Proteasen versucht werden. Geplant ist ein Austausch des Ubiquitins durch das verwandte Protein SUMO (small ubiquitin-related modifier) und eine anschließende Spaltung durch die SUMO Protease I (Ulp1) von *S. cerevisiae* (Malakhov et al., 2004).

6.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Bis dato gibt es keinen publizierten monoklonalen Antikörper gegen Jiv, DnaJC14 oder DRiP78. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit mit einem rekombinanten Jiv-Peptid ein solcher monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Durch die Immunisierung von Mäusen mit bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem His-Ub-Flag-Jiv90 und die Fusion von Milzzellen einer immunisierten Maus mit Myelomzellen konnten mehrere Hybridom-Zelllinien erzeugt werden, die spezifische monoklonale Antikörper bilden. Die Antikörper wurden isotypisiert und der gegen Jiv90 gerichtete mAk weiter charakterisiert, aufgereinigt und in verschiedenen Tests, wie etwa ELISA, Western Blot, Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation, eingesetzt.

Das Epitop des Jiv mAk konnte bis auf zehn Aminosäuren eingegrenzt werden. Diese zehn Aminosäuren (SARYCAECNR) sind in den Jiv-Orthologen von Mensch, Schimpanse, Rhesusaffe und Ratte zu 100 % konserviert. Der Antikörper erkennt bakteriell und eukaryontisch überexprimiertes Jiv und humanes DnaJC14 in Western Blot und Immunfluoreszenz, jedoch waren Versuche mit diesem Antikörper das endogene zelluläre Jiv/DnaJC14 in verschiedenen Zelllinien nachzuweisen bisher nicht erfolgreich. Dies mag darauf beruhen, dass dieses Protein vermutlich nur in sehr geringer Menge in der Zelle vorhanden ist. So konnte bis dato lediglich die entsprechende mRNA in Zellen

nachgewiesen werden. Diese ist nur in geringer Kopienzahl detektierbar und weist zudem einen upstream Open Reading Frame auf, wodurch eine stark verminderte Translations-effizienz zu erwarten ist.

In Kooperation mit anderen Forschergruppen sind weitere Versuche geplant, um das endogene Jiv über diesen mAk mit sensitiveren Methoden nachzuweisen. Desweiteren wurde der Jiv mAk zwei Arbeitsgruppen in Kanada und den USA zur Verfügung gestellt, die damit die physiologische Funktion von DRiP78 untersuchen wollen.

6.3 Erzeugung und Charakterisierung eines chimären Virus mit einer Ubiquitin-Insertion zwischen NS2 und NS3

Das den Pestiviren nah verwandte Hepatitis C Virus ist in der Lage, infektiöse Viren auch ohne ungespaltenes NS2-3 zu bilden, wie dies unter anderem durch die Insertion einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) zwischen NS2 und NS3 gezeigt werden konnte (Jirasko et al., 2008). Statt dessen wurde eine Interaktion zwischen NS2 und NS3 beobachtet (Kiiver et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde sowohl für BVDV als auch für CSFV gezeigt, dass ohne ungespaltenes NS2-3 keine infektiösen Viren gebildet werden (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Dabei wurde jeweils durch die Insertion Ubiquitin-kodierender Sequenzen oder einer IRES die Bildung von unprozessiertem NS2-3 verhindert (Abbildung 38).

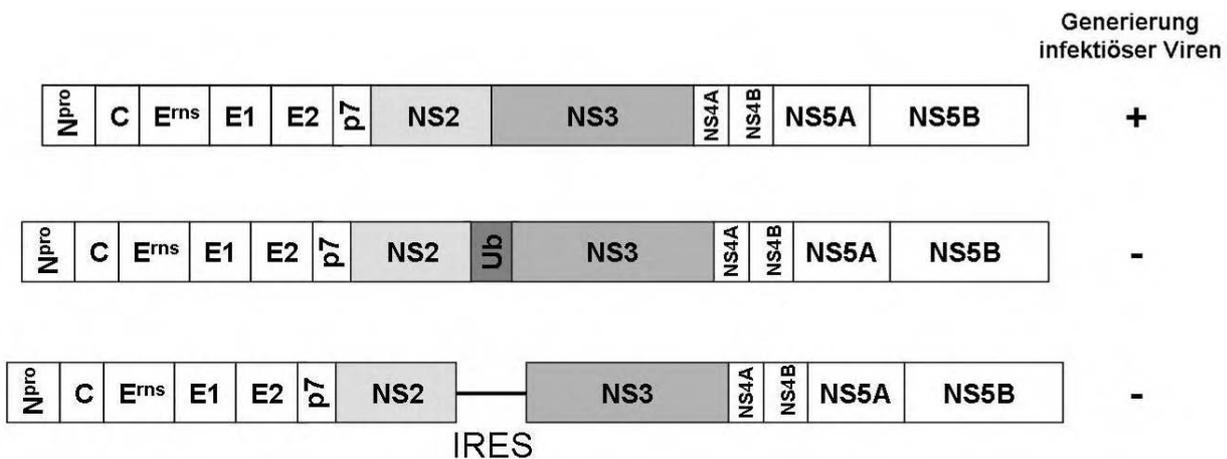


Abbildung 38: Insertion von Ubiquitin oder einer IRES zwischen NS2 und NS3 von Pestiviren

Das Einfügen einer für Ub kodierenden Sequenz oder der IRES von EMCV zwischen NS2 und NS3 von infektiösen cDNA Gesamtklonen von BVDV und CSFV führt zum Verlust der Fähigkeit zur Bildung infektiöser Viren.

Es existieren viele zp BVD Viren mit Ubiquitin-Insertionen in ihrem Polyprotein und nur bei einzelnen Stämmen findet sich die Insertion direkt zwischen NS2 und NS3. Die Mehrzahl der Viren kodiert zusätzlich zur Ub-Insertion durch eine Genomduplikation NS2-3-4A (z.B.

Diskussion

CP1; Meyers et al., 1991b) und kann damit selbständig replizieren. Das BVD Virus CP14 (Tautz et al., 1993) hingegen weist eine Ub-Insertion zwischen NS2 und NS3 auf und ist von einem Helfervirus abhängig, welches NS2-3 *in trans* bereit stellt (N. Tautz, persönliche Mitteilung). Dies unterstreicht die Bedeutung von unprozessiertem NS2-3 für die pestivirale Virionmorphogenese. Für den zp BVDV Stamm Osloss wurde der Modus der NS2-3 Prozessierung und die Rolle für die Bildung infektiöser Virionen bisher nur unzureichend untersucht. Es stellte sich daher die Frage, ob der Stamm Osloss ein Beispiel für eine Virionmorphogenese ohne ungespaltenes NS2-3 ist.

Da es bis dato keinen cDNA Gesamtklon des Virusstammes Osloss gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Gesamtklon des nzp BVD Virus NCP7 als Ausgangskonstrukt genommen und in diesen per RT-PCR gewonnene cDNA Fragmente des Stammes Osloss inseriert. Es stellte sich heraus, dass die RNA-Transkripte dieser chimären cDNAs erst dann zur Bildung von infektiösen Virionen in transfizierten Zellen führten, wenn der Anteil des Osloss-Genoms mindestens die Proteine NS2-NS4A umfasste. Dies deutet übereinstimmend mit anderen Berichten (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007) auf die besondere Bedeutung dieser Region des Polyproteins als eine funktionelle Einheit bei der Virionmorphogenese hin.

Basierend auf diesem chimärem Konstrukt NCP7/Osl NS2-4A konnte durch Einfügen der Mutationen H1447-A und C1521-A in NS2 gezeigt werden, dass eine Chimäre mit inaktivierter NS2 Protease (NCP7/Osl NS2-4A H/A C/A) dennoch fähig zur Bildung infektiöser Viren ist. Dies beweist also, dass die Aktivität der NS2 Protease für die Virionmorphogenese nicht benötigt wird, so wie dies mittlerweile auch für CSFV berichtet wurde (Moulin et al., 2007).

Auf gleiche Weise konnte die Hypothese, dass die Mutation im Osloss-Ubiquitin (G76-S) eine entscheidende Rolle für die Virusproduktion spielt, widerlegt werden. Es wurde vermutet, dass dieser AS-Austausch eine unvollständige NS2-3-Spaltung verursacht, so dass Osloss eine ausreichende Menge NS2-3 für die Virionmorphogenese zur Verfügung steht. Eine Rückmutation des Osloss-Ub zu der Sequenz des bovinen Ub führte nach Elektroporation der chimären cDNA (NCP7/Osl NS2-4A H/A C/A Ub wt) jedoch zu keinem Unterschied hinsichtlich der Bildung infektiöser Viren im Vergleich zum chimären Gesamtklon mit Osloss-Ub.

Bei allen bisher untersuchten autonom replizierenden Pestiviren lassen sich im Western Blot zu späteren Zeitpunkten der Infektion große Mengen NS2-3 detektieren. Im

Diskussion

Gegensatz dazu zeigt das in dieser Arbeit generierte chimäre Virus im Western Blot kein ungespaltenes NS2-3 und repliziert dennoch eigenständig zu hohen Virustitern.

Lokalisation	Mutation	Infektiöse Viren
-	-	+
E ^{rns}	T-S	+
E2	P-L	n.d.
p7	T-I	n.d.
E ^{rns} +E2+p7	T-S + P-L + T-I	+
NS2	R-Q	+
NS3	L-S	+
NS5A	Y-H + N-S	+
3'NTR	a-c	++
NS2+3'NTR	R-Q + a-c	++++
NS2+3'NTR+ NS3	R-Q + a-c + L-S	++++
NS2+3'NTR+ NS5A	R-Q + a-c + Y-H + N-S	++++
NS2+3'NTR+ E ^{rns} +E2+p7	R-Q + a-c + T-S + P-L + T-I	+++++



Abbildung 39: Ermittlung der für die Virionmorphogenese relevanten Mutationen

Zur Identifizierung der für die gesteigerte Virusproduktion verantwortlichen Mutationen wurden die im Plaque-gereinigten Virus gefundenen Austausche schrittweise in das Ausgangs-cDNA-Konstrukt rückkloniert. Die Tabelle fasst die Ergebnisse der bisherigen Rückmutationen zusammen. Dabei korreliert die Anzahl der Pluszeichen mit der Menge gebildeter Viren nach Transfektion. Im unteren Bild ist die Lage der als relevant festgestellten Mutationen im Polyprotein durch Pfeile gekennzeichnet. Bereiche der Osloss-Sequenz sind schwarz unterlegt. n.d.: not done (nicht getestet)

Ausgehend von dem chimären cDNA Konstrukt NCP7/Osl NS2-4A H/A C/A genügte das

Einfügen von vier AS-Austauschen und eines Nukleotidaustauschs in der 3`NTR (siehe Abbildung 39), um ein Pestivirus mit einem Titer von über 10^7 Viren / ml bei gleichzeitig nicht detektierbarem NS2-3 zu erzeugen.

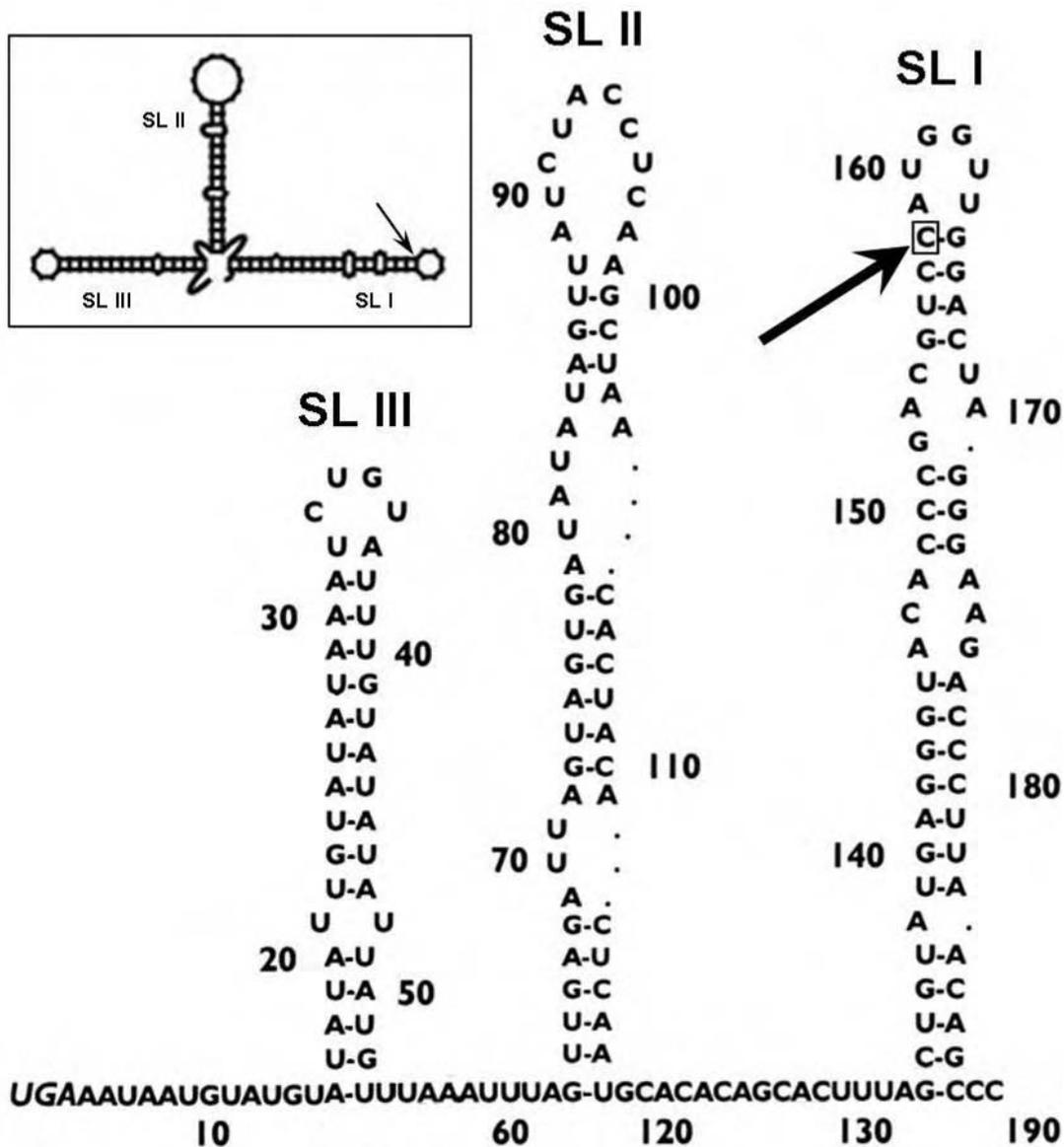


Abbildung 40: RNA Sekundärstruktur der 3`NTR der NCP7/Osloss Viruschimäre + 3`NTRmut
 Die Pfeile deuten auf die im selektierten und Plaque-gereinigten Virus gefundene Mutation a-c (3`NTRmut) im Stemloop I (SLI). Modifiziert nach Isken et al., 2004 und Pankraz et al., 2005.

Basis für die Konstruktion der NCP7/Osloss cDNA Chimären war der Gesamtklon pNCP7-5A (Becher et al., 2000). Bei der Klonierung dieses Plasmids wurde eine 3`NTR-Sequenz verwendet, welche im Vergleich zum NCP7 Wildtyp-Virus drei Nukleotidaustausche enthält. Es konnte mittlerweile gezeigt werden, dass eine Veränderung dieser drei Austausche hin zur NCP7 Wildtyp-Sequenz zu einer Steigerung der spezifischen Infektiosität transkribierter RNA um den Faktor 5 führt (Pankraz et al., 2005). Diese

Diskussion

Sequenzunterschiede der 3`NTR befinden sich im Stemloop I (SL I), welcher essentiell für die Virusreplikation ist. Die im passagierten und Plaque-gereinigten chimären Virus identifizierte Mutation in der 3`NTR (3`NTRmut) entspricht der Rückmutierung einer der drei genannten Austausche zu der NCP7 Wildtyp-Sequenz. Betrachtet man die Lokalisation dieser Mutation gemäß bioinformatischen Vorhersagen und experimentellen Studien (Deng und Brock, 1993; Yu et al., 1999), so lässt sich erkennen, dass die Rückmutation von Nukleotid 158 der 3`NTR von a zu c zu einer Stabilisierung des Loops in SL I führt (Abbildung 40). Dadurch lassen sich die positiven Auswirkungen dieses Austauschs in der chimären cDNA auf die Zahl der infizierten Zellen und den Titeranstieg um etwa eine \log_{10} -Stufe erklären.

Gemäß Strukturvorhersagen des NS2 Proteins befindet sich die Mutation R1268-Q in der N-terminalen Transmembrandomäne zwischen zwei Membrandurchgängen. Da es je nach benutztem Programm unterschiedliche Topologievorhersagen für die Transmembranbereiche gibt, ist nicht zu entscheiden auf welcher Seite der ER-Membran sich die betreffende Aminosäure befindet. Der Mehrheit der Vorhersagen zufolge liegt die Mutation im ER-Lumen und damit auf der gleichen Seite wie die Strukturproteine. Studien mit chimären HCV cDNA Klonen deuten ebenfalls auf eine besondere Bedeutung der NS2 Transmembranbereiche bei der Virionmorphogenese (Yi et al., 2006). Dabei zeigten Polyprotein-Chimären aus verschiedenen HCV Genotypen (1a und 2a) Inkompatibilitäten bezüglich der Entstehung infektiöser Viren. D.h. nach Transfektion chimärer RNA wurden nur wenige infektiöse Viren gebildet. Die Passage von transfizierten Zellen führte zur Entstehung mehrerer kompensatorischer Mutationen, welche die Menge gebildeter infektiöser Partikel deutlich erhöhten. Die Mutationen in NS2 lagen dabei ausschließlich in der Transmembrandomäne. Weitere Mutationen, die den Virustiter steigerten, fanden sich in den Proteinen E1 und p7. Dieser Befund stellt ebenfalls eine Parallele zur vorliegenden Arbeit dar, da auch hier Mutationen in Strukturproteinen (E^{ms} , E2) und p7 zu einer weiteren Erhöhung des Virustiters führten. Alleine, ohne den Austausch R1268-Q in NS2, konnten die Mutationen in E^{ms} , E2 und p7 jedoch keinen Anstieg der Virusproduktion bewirken. Es scheint also, dass die Transmembranbereiche von NS2 sowohl bei HCV als auch bei BVDV eine entscheidende Rolle beim Virusassembly spielen, möglicherweise durch die Vermittlung von Interaktionen mit den Strukturproteinen an der ER-Membran (siehe dazu auch Abbildung 41). Entsprechend scheinen die Austausche in E^{ms} , E2 und p7 in erster Linie Inkompatibilitäten zwischen der 5´-wärts gelegenen NCP7 AS-Sequenz

und dem NS2 von Osloss zu kompensieren. Die Mutation in p7 etwa (T1104-I) stellt eine Rückmutation zur Osloss-Sequenz an dieser Stelle dar.

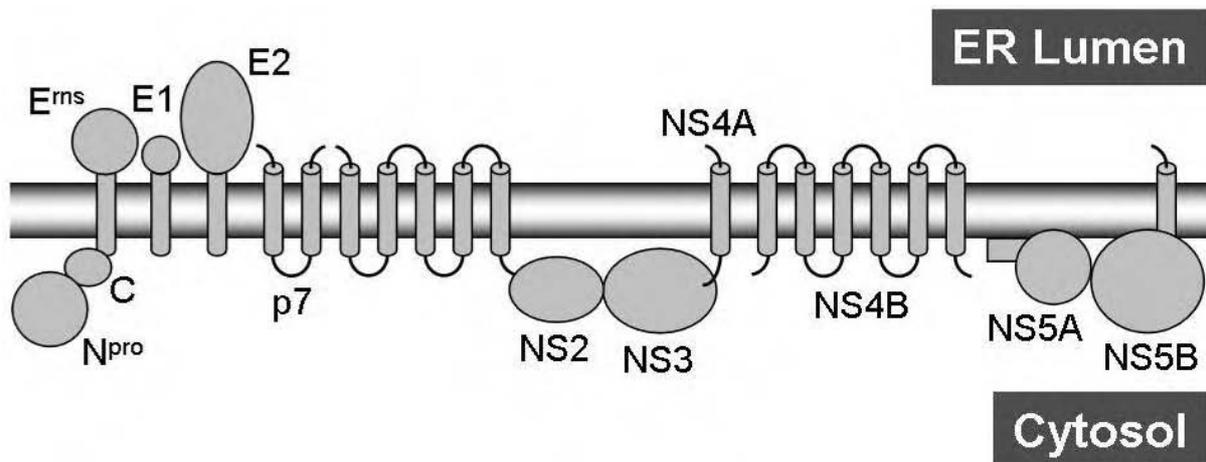


Abbildung 41: Putative Topologie des pestiviralen Polyproteins an der ER-Membran

Die schematische Darstellung beruht auf bioinformatischen Vorhersagen und stellt nur eine der möglichen Topologien dar. So gibt es vor allem hinsichtlich der Anzahl der Transmembranhelices, sowie der Lokalisation der NS2 Proteasedomäne unterschiedliche Vorhersagen. Modifiziert nach Murray et al., 2008.

Daneben wäre auch denkbar, dass der Austausch in NS2 eine Interaktion mit NS3 ermöglicht. Bei Pestiviren konnte bisher, im Gegensatz zu HCV (Kiiver et al., 2006), keine Bindung von NS2 an NS3 beobachtet werden. Würde nun aber NS2 durch die Mutation R1268-Q direkt mit NS3 interagieren, so wäre das Virus vermutlich, analog zu HCV, unabhängig von ungespaltenem NS2-3 bei der Virionmorphogenese.

Auch wenn NS2 offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung infektiöser Viren spielt, so ist dennoch festzuhalten, dass die Mutation in NS2 alleine zu keinem Unterschied zur Ausgangsschimäre NCP7/Osl NS2-4A H/A C/A führte. Nur in der Kombination mit der 3'NTRmut zeigte sich ein dramatischer positiver Effekt auf den Virustiter. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Mutation in der 3'NTR, und damit der Stemloop I, nicht nur eine wichtige Bedeutung für die RNA-Replikation hat, sondern dass sich hier eventuell auch ein Signal für das Virusassembly befindet. Bislang ist weder für Pestiviren noch für HCV ein Packaging Signal in der viralen RNA bekannt.

Die genauen Funktionen des SL I der 3'NTR sowie der Transmembrandomäne von NS2 beim Assembly sollen in der Folge durch Mutations- und Interaktionsstudien näher untersucht werden. Ebenso soll durch jeweils einzelnes Einfügen der E^{rns}, E2 und p7 Mutationen in die Doppelmutante derjenige Austausch ermittelt werden, der für den zuletzt beobachteten Titeranstieg entscheidend ist.

Desweiteren lässt sich durch den fehlenden Nachweis von ungespaltenem NS2-3 im

Diskussion

Western Blot nicht ausschließen, dass dennoch sehr geringe Mengen von unprozessiertem NS2-3 vorhanden sind. Es steht also noch der endgültige Beweis aus, ob das in dieser Arbeit erzeugte Virus wirklich in der Lage ist, als einziges bekanntes Pestivirus vollständig ohne NS2-3 autonom zu replizieren. Dies soll durch die Insertion einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) zwischen NS2 und NS3 der dreifach mutierten Viruschimäre gezeigt werden.

Es ist aber festzuhalten, dass die bislang erhaltenen Daten zeigen, dass es sich bei dem in dieser Arbeit hergestellten chimären Virus um das erste Pestivirus handelt, welches trotz nicht nachweisbarer NS2-3 Mengen zu einer höchst effizienten Bildung infektiöser Virionen befähigt ist.

7 Zusammenfassung

Das positiv-strängige RNA-Genom des Pestivirus *bovine viral diarrhoea virus* (BVDV) wird in ein Polyprotein translatiert, welches ko- und posttranslational durch zelluläre und Virus-kodierte Enzyme prozessiert wird. Eine Cystein-Autoprotease im Nichtstrukturprotein NS2 spaltet NS2-3 und setzt dadurch NS3 frei, welches essentieller Bestandteil des viralen Replikationskomplexes ist. Die Funktion des freien NS3 bei der pestiviralen RNA-Replikation kann nicht von NS2-3 übernommen werden. Letzteres hingegen wird für die Bildung infektiöser Viruspartikel benötigt. Die NS2-3 Spaltung von nicht zytopathogenem (nzp) BVDV ist auf die ersten Stunden nach Infektion beschränkt, so dass zu späteren Zeitpunkten die virale RNA-Replikation herunterreguliert wird und ein Wechsel zur Virionproduktion stattfindet. Demzufolge werden also Replikation und Virionmorphogenese von BVDV durch die Aktivität der NS2 Autoprotease reguliert. Um proteolytisch aktiv zu sein, benötigt die NS2 Protease stöchiometrische Mengen des zellulären Chaperons Jiv (J-domain protein interacting with viral protein) oder seines 90 Aminosäuren großen Fragments Jiv90 als Kofaktor. Der Verbrauch des zellulären Jiv-Vorrats führt zusammen mit der Beschränkung der NS2 Protease auf *cis*-Spaltung zur zeitlichen Regulation der NS2-3 Spaltung. Aufgrund von Mutationen sind zytopathogene (zp) BVDV Stämme unabhängig von der zellulären Jiv-Menge und spalten NS2-3 während des gesamten Infektionsverlaufs.

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion von NS2 und Jiv/Jiv90 und der physiologischen Funktion von Jiv in der Zelle wurden rekombinantes NS2 und Jiv-Fragmente in *E. coli* hergestellt. Um ein ausreichendes Expressionsniveau zu erlangen musste Jiv90 an den C-Terminus von Ubiquitin fusioniert werden. Eine Expression von NS2 war nur als C-terminale Fusion an das *B. subtilis* Protein Mistic möglich. Es wurden Protokolle zur Aufreinigung löslichen Proteins etabliert. Rekombinantes Jiv90 wurde zur Herstellung eines Jiv-spezifischen monoklonalen Antikörpers genutzt, welcher detailliert charakterisiert und in verschiedenen Assays eingesetzt wurde. Größere Jiv-Fragmente konnten durch Fusion an Trigger Factor und Ubiquitin gewonnen werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Funktion des ungespaltenen NS2-3 bei der Virionmorphogenese. Zu diesem Zweck wurde der zp BVDV Stamm Osloss als Modellvirus gewählt, da er eine Ubiquitin-Insertion zwischen NS2 und NS3 aufweist, die zu einer vermutlich kompletten Spaltung durch zelluläre Ubiquitin-spezifische Proteasen führt.

Zusammenfassung

Trotz des anzunehmenden Mangels an unprozessiertem NS2-3 repliziert Osloss zu hohen Virustitern.

Chimäre cDNA-Klone, die auf dem nzp Stamm NCP7 basieren und Osloss Genabschnitte unterschiedlicher Größe enthalten, wurden auf die Bildung infektiöser Viren untersucht. Ein NCP7 Genom, das die Osloss Gene NS2 bis NS4A umfasst, führte nach Transfektion zu einem geringen Titer infektiöser Viren. In diesem Kontext konnte eine essentielle Rolle der NS2 Protease bei der Virionmorphogenese ebenso ausgeschlossen werden wie ein Einfluss der Mutation im Osloss-Ubiquitin auf die Virusproduktion. Durch Zellkulturpassage konnte ein chimäres Virus isoliert werden, das ohne im Western Blot nachweisbare Mengen an NS2-3 einen Titer von über 10^7 Viren/ml erreicht. Eine Konsensus-Sequenz des viralen Genoms offenbarte sieben Nukleotidaustausche, die zu Aminosäureaustauschen führen, und eine Mutation in der 3`NTR. Wiedereinfügen der Austausche in den Ausgangs-cDNA-Klon verursachte einen drastischen Anstieg der Bildung infektiöser Viren, wenn eine Mutation in NS2 mit dem 3`NTR Austausch kombiniert wurde. Wurden zusätzlich die Mutationen in E^{ms}, E2 und p7 hinzugefügt, führte dies zu einem weiteren Anstieg des Virustiters bis auf das Niveau des Plaque-gereinigten Virus-Stocks.

Es konnte also ein chimäres BVD Virus erzeugt werden, welches eigenständig zu hohen Titern repliziert, ohne nachweisbare Mengen ungespaltenen NS2-3 zu exprimieren. Ausserdem konnten Mutationen identifiziert werden, die für die Produktion infektiöser Viren entscheidend sind und welche in weiteren Untersuchungen analysiert werden sollen.

8 Summary

The plus-strand RNA genome of the pestivirus *bovine viral diarrhoea virus* (BVDV) is translated into one polyprotein which is processed co- and posttranslationally by cellular and virus-encoded proteases. A cysteine autoprotease in the viral nonstructural protein NS2 cleaves NS2-3 thereby releasing NS3 which is an essential component of the viral replication complex. While NS2-3 cannot functionally replace NS3 in pestiviral RNA replication it is strictly required for the production of infectious virus particles. NS2-3 cleavage of noncytopathogenic (ncp) BVDV is restricted to the first hours p.i. leading to downregulation of viral RNA replication and a shift to virion production at later time points. Accordingly, replication and virion morphogenesis of BVDV are regulated by the activity of the NS2 autoprotease. To be proteolytically active the NS2 protease needs stoichiometric amounts of the cellular chaperone Jiv (J-domain protein interacting with viral protein) or its 90 amino acids fragment Jiv90 as a cofactor. Consumption of the cellular Jiv pool and the restriction of the NS2 protease to *cis* cleavage result in the temporal regulation of NS2-3 cleavage. By acquisition of genome mutations cytopathogenic (cp) BVDV strains are independent of the cellular Jiv level and cleave NS2-3 during the whole course of the infection.

To further investigate the interaction of NS2 and Jiv/Jiv90 and to elucidate the physiological function of Jiv in the cell, recombinant NS2 and fragments of Jiv were produced in *E. coli*. To obtain significant expression levels Jiv90 had to be fused to the C terminus of Ubiquitin; expression of NS2 was only achieved as a C-terminal fusion to the *Bacillus subtilis* protein Mistic. Protocols for purification of soluble protein were established. Recombinant Jiv90 was used to generate a Jiv specific monoclonal antibody which was characterised in detail and proved useful in several assays. Longer Jiv fragments could be purified by fusion to Trigger Factor and Ubiquitin followed by cleavage with the Tobacco Etch Virus (TEV) nuclear inclusion protease.

The second part of this work focused on the function of uncleaved NS2-3 in virion morphogenesis. To this aim cp BVDV strain Osloss was chosen as a model virus since it contains an ubiquitin insertion between NS2 and NS3 leading to supposedly complete cleavage by cellular ubiquitin-specific proteases. Despite the assumed lack of unprocessed NS2-3, Osloss replicates to high titres.

Chimeric cDNA clones based on ncp strain NCP7 containing Osloss gene segments of

Summary

different sizes were tested for the production of infectious virus. A NCP7 genome encompassing the Osloss genes NS2 to NS4A led to infectious progeny virus at very low titres. In this context an essential role of the NS2 protease in virion morphogenesis as well as the importance of the Osloss ubiquitin mutation for virus production could be ruled out. After passaging infected cells a chimeric virus could be isolated showing a titre of about 10^7 viruses/ml without displaying any NS2-3 detectable by western blot. A consensus sequence of the viral genome revealed seven nucleotide changes leading to amino acid substitutions and one mutation in the 3'UTR. Reintroduction into the original cDNA caused a drastic increase in infectious virus production if a mutation in NS2 was combined with the 3'UTR exchange. Addition of the mutations in E^{ms}, E2 and p7 into the backbone of the double-mutant virus led to a further increase in virus titres reaching the level of the plaque purified virus stock. In conclusion, a chimeric BVD virus was generated replicating autonomously to high titres without expressing detectable amounts of uncleaved NS2-3. Furthermore, several mutations could be identified that are essential for infectious virus production and have to be analysed in future studies.

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 diarrhoea 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.
- Ansari, I.H., Chen, L.M., Liang, D., Gil, L.H., Zhong, W. and Donis, R.O. (2004) Involvement of a bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. *J Virol*, **78**, 9612-9623.
- 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 diarrhoea in cattle. *Am.J. Vet. Res.*, **15**, 525-553.
- Baker, J.C. (1987) Bovine viral diarrhoea 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.
- Bálint, Á., Baule, C., Pálfi, V., Dencsö, L., Hornyák, Á. and Belák, S. (2005) A 45-Nucleotide Insertion in the NS2 Gene is responsible for the Cytopathogenicity of a Bovine Viral Diarrhoea Virus Strain. *Virus Genes*, **31**, 135-144.
- 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.
- Barnett, J., Twomey, D.F., Millar, M.F., Bell, S., Bradshaw, J., Higgins, R.J., Scholes, S.F., Errington, J., Bromage, G.G. and Oxenham, G.J. (2008) BVDV in British alpacas. *Vet Rec*, **162**, 795.
- 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 diarrhoea 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 diarrhoea 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.

Literaturverzeichnis

- 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. (2001) 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 diarrhea 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 diarrhea virus by superinfection with cytopathogenic bovine viral diarrhea 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 diarrhea 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.
- Brodersen, B.W. (2004) Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **20**, 85-93.
- Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J. (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec*, **114**, 535-536.
- 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.
- Butt, T.R., Jonnalagadda, S., Monia, B.P., Sternberg, E.J., Marsh, J.A., Stadel, J.M., Ecker, D.J. and Crooke, S.T. (1989) Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2540-2544.
- 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 diarrhea 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 adaption of chaperone function. *Cell Stress Chap*, **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 diarrhea virus. *Virology*, **251**, 370-382.
- Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S. and Retzel, E. (1988a) Proteins encoded by bovine viral diarrhea 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 diarrhea virus. *Virology*, **165**, 191-199.

Literaturverzeichnis

- Collett, M.S., Wiskerchen, M.A., Welniak, E. and Belzer, S.K. (1991) Bovine viral diarrhea 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 diarrhea 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 diarrhea 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 diarrhea 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 diarrhea virus. *J Virol*, **63**, 3934-3943.
- Cornish, T.E., van Olphen, A.L., Cavender, J.L., Edwards, J.M., Jaeger, P.T., Vieyra, L.L., Woodard, L.F., Miller, D.R. and O'Toole, D. (2005) Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest*, **17**, 110-117.
- Darbyshire, J.A. (1960) *Vet. Rec.*, 331.
- de Moerloose, 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 Moerloose, 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 diarrhea virus strain SD-1. *Virology*, **191**, 867-879.
- Deng, R. and Brock, K.V. (1993) 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1949-1957.
- 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.
- Dupré, D.J., Robitaille, M., Richer, M., Éthier, N., Mamarbachi, A.M. and Hébert, T.E. (2007) Dopamine Receptor-interacting Protein 78 Acts as a Molecular Chaperone for G γ Subunits before Assembly with G β . *J Biol Chem*, **282**, 13703-13715.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Rügenapf, 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 diarrhea 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.

Literaturverzeichnis

- 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.
- Fulton, R.W., Hessman, B., Johnson, B.J., Ridpath, J.F., Saliki, J.T., Burge, L.J., Sjeklocha, D., Confer, A.W., Funk, R.A. and Payton, M.E. (2006) Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *J Am Vet Med Assoc*, **228**, 578-584.
- 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 Münch Tierärztl Wochenschr*, **116**, 234-239.
- Gaede, W., Reiting, R., Schirrmeyer, H., Depner, K.R. and Beer, M. (2005) [Detection and species-specific differentiation of pestiviruses using real-time RT-PCR]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, **118**, 113-120.
- Gallei, A., Blome, S., Gilgenbach, S., Tautz, N., Moennig, V. and Becher, P. (2008) Cytopathogenicity of Classical Swine Fever Virus Correlates with Attenuation in the Natural Host. *J Virol*, **82**, 9717-9729.
- García-Pérez, A.L., Minguijón, E., Estévez, L., Barandika, J.F., Aduriz, G., Juste, R.A. and Hurtado, A. (2009) Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype). *Res Vet Sci*, **86**, 345-352.
- 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.
- George, S.L. and Varmaz, D. (2005) What you need to know about GB virus C. *Curr Gastroenterol Rep*, **7**, 54-62.
- Gohara, D.W., Ha, C.S., Ghosh, S.K.B., Arnold, J.J., Wisniewski, T.J. and Cameron, C.E. (1999) Production of "Authentic" Poliovirus RNA-Dependent RNA Polymerase (3D^{pol}) by Ubiquitin-Protease-Mediated Cleavage in *Escherichia Coli*. *Protein Expr Purif*, **17**, 128-138.
- 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.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K. and Moradpour, D. (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, **77**, 5487-5492.
- 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.

Literaturverzeichnis

- 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**, 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.
- Grøndahl, C., Uttenthal, A., Houe, H., Rasmussen, T.B., Hoyer, M.J. and Larsen, L.E. (2003) Characterisation of a pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). *Arch Virol*, **148**, 1455-1463.
- Grooms, D.L. and Keilen, E.D. (2002) Screening of Neonatal Calves for Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus by Immunohistochemistry on Skin Biopsy Samples. *Clin Diagn Lab Immunol*, **9**, 898-900.
- 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.
- Harasawa, R., Aoyama, F., Goryo, M., Okada, K., Nishimura, T., Matsubara, K., Tsujimoto, T. and Giangaspero, M. (2006) Evidence for pestivirus infection in free-living Japanese serows, *Capricornis crispus*. *Microbiol Immunol*, **50**, 817-821.
- Harlow, E. and Lane, D. (1999) *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 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.
- Heimann, M., Roman-Sosa, G., Martoglio, B., Thiel, H.-J. and Rumenapf, T. (2006) Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol*, **80**, 1915-1921.
- 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.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (eds.). (1992) The ubiquitin system.
- Hilbe, M., Arquint, A., Schaller, P., Zlinszky, K., Braun, U., Peterhans, E. and Ehrensperger, F. (2007) Immunohistochemical diagnosis of persistent infection with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) on skin biopsies. *Schweiz Arch Tierheilkd*, **149**, 337-344.
- 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. (1997) Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADPribose) 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

Literaturverzeichnis

- 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.
- Howard, G.C. and Bethell, D.R. (2001) *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, CRC Press LLC, Boca Raton.
- Hughes, L.E., Kershaw, G.F. and Shaw, I.G. (1959) "B" or "Border Disease". An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.*, **71**, 113-317.
- Hulst, M.M. and Moormann, R.J. (1997) Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol*, **78**, 2779-2787.
- Hulst, M.M. and Moormann, R.J. (2001) E^{rns} 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 E^{rns} glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol*, **78**, 136-145.
- Isken, O., Grassmann, C.W., Yu, H. and Behrens, S.-E. (2004) Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA*, **10**, 1637-1652.
- 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.
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F. and Bartenschlager, R. (2008) Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem*, **283**, 28546-28562.
- Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J. and Rice, C.M. (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol*, **81**, 8374-8383.
- 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.
- Kameyama, K., Sakoda, Y., Tamai, K., Nagai, M., Akashi, H. and Kida, H. (2006) Genetic recombination at different points in the N^{pro}-coding region of bovine viral diarrhoea viruses and the potentials to change their antigenicities and pathogenicities. *Virus Res*, **116**, 78-84.
- 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.
- Kapust, R.B., Tözser, J., Fox, J.D., Anderson, D.E., Cherry, S., Copeland, T.D. and Waugh, D.S. (2001) Tobacco Etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng*, **14**, 993-1000.
- Kelley, W.L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci*, **23**, 222-227.

Literaturverzeichnis

- Kennedy, J.A., Mortimer, R.G. and Powers, B. (2006) Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhoea virus by using fresh ear-notch-sample supernatants. *J Vet Diagn Invest*, **18**, 89-93.
- Kiiver, K., Merits, A., Ustav, M. and Zusinaite, E. (2006) Complex formation between hepatitis C virus NS2 and NS3 proteins. *Virus Res*, **117**, 264-272.
- Köhl, W., Zimmer, G., Greiser-Wilke, I., Haas, L., Moennig, V. and Herrler, G. (2004) The surface glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus contains an intracellular localization signal. *J Gen Virol*, **85**, 1101-1111.
- Kräusslich, H.G. and Wimmer, E. (1988) Viral proteinases. *Annu Rev Biochem*, **57**, 701-754.
- Krey, T., Himmelreich, A., Heimann, M., Menge, C., Thiel, H.-J., Maurer, K. and Rümenapf, T. (2006) Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol*, **80**, 3912-3922.
- Krey, T., Thiel, H.J. and Rümenapf, 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*, **79**, 9746-9755.
- 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., Thiel H.-J. and Tautz N. (2006) Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a chaperone in proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1510-1515.
- 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 E^{rns} 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.
- Lazar, C., Zitzmann, N., Dwek, R.A. and Branza-Nichita, N. (2003) The pestivirus E(rns) glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology*, **314**, 696-705.
- 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.
- Leclerc, P.C., Auger-Messier, M., Lanctot, P.M., Escher, E., Leduc, R. and Guillemette, G. (2002) A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology*, **143**, 4702-4710.
- Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J. and Rouillé, Y. (2005) Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, **79**, 10826-10829.
- 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.

Literaturverzeichnis

- 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. Wochenschr.*, **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 Tierärztl 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 Tierärztl 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., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A. and Rice, C.M. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623-626.
- 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.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.J. and Rice, C.M. (2007) In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, Vol. 1, pp. 1101-1152.
- Lindl, T. (2002) *Zell- und Gewebekultur*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- 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.
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G. and Rice, C.M. (2006) Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*, **442**, 831-835.
- Magkouras, I., Mätzener, P., Rümenapf, T., Peterhans, E. and Schweizer, M. (2008) RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by E^{ms} of pestiviruses. *J Gen Virol*, **89**, 2501-2506.
- Malakhov, M.P., Mattern, M.R., Malakhova, O.A., Drinker, M., Weeks, S.D. and Butt, T.R. (2004) *J Struct Funct Genom*, **5**, 75-86.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J. and Rümenapf, T. (2004) CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea 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 diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc*, **186**, 568-569.
- McGoldrick, A., Lowings, J.P., Ibata, 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 diarrhoea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc*, **152**, 1621-1624.

Literaturverzeichnis

- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M.S. and Rice, C.M. (1998) Infectious bovine viral diarrhoea 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 diarrhoea 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 diarrhoea 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 diarrhoea 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**.
- Mishra, N., Vilcek, S., Rajukumar, K., Dubey, R., Tiwari, A., Galav, V. and Pradhan, H.K. (2008) Identification of bovine viral diarrhoea virus type 1 in yaks (*Bos poepagus grunniens*) in the Himalayan region. *Res Vet Sci*, **84**, 507-510.
- 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 Münch Tierärztl 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 diarrhoea virus (BVDV) in a persistently viremic cattle. *Zentralbl Veterinärmed [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.
- Moradpour, D., Evans, M.J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H.E., Goff, S.P., Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2004) Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol*, **78**, 7400-7409.
- Moulin, H.R., Seuberlich, T., Bauhofer, O., Bennett, L.C., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A., Ruggli, N. (2007) Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology*, **365**(2), 376-89.
- 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

Literaturverzeichnis

- 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.
- Murray, C.L., Jones, C.T. and Rice, C.M. (2008) Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*, **6**, 699-708.
- Murray, C.L., Marcotrigiano, J. and Rice, C.M. (2007) Bovine Viral Diarrhea Virus Core Is an Intrinsically Disordered Protein That Binds RNA. *J Virol*, **82**, 1294-1304.
- 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 diarrhea 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., Gilray, J.A., Russo, P. and Dlissi, E. (1998) Border disease of sheep and goats. *Vet Res*, **29**, 327-340.
- Njaa, B.L., Clark, E.G., Janzen, E.J., Ellis, J.A. and Haines, D.M. (2000) Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemistry staining of formalin-fixed skin biopsies. *J Vet Diagn Invest*, **12**, 393-399.
- Olafson, P., MacCullum, A.D. and Fox, F.H. (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, **36**, 205-213.
- Pankraz, A., Thiel, H.-J. and Becher, P. (2005) Essential and Nonessential Elements in the 3' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol*, **79**, 9119-9127.
- Paredes, A.M. and Blight, K.J. (2008) A Genetic Interaction between Hepatitis C Virus NS4B and NS3 Is Important for RNA Replication. *J Virol*, **82**, 10671-10683.
- 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.
- 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.

Literaturverzeichnis

- 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.
- Renard, A., Guiot, C., Schmetz, D., Dagenais, L., Pastoret, P.P., Dina, D. and Martial, J.A. (1985) Molecular cloning of bovine viral diarrhea viral sequences. *DNA*, **4**, 429-438.
- Reshetnyak, V.I., Karlovich, T.I. and Ilchenko, L.U. (2008) Hepatitis G virus. *World J Gastroenterol*, **14**, 4725-4734.
- 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 diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: Detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, **212**, 39-46.
- Ridpath, J.F. 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 diarrhea 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 diarrhea 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., 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.
- Ronecker, S., Zimmer, G., Herrler, G., Greiser-Wilke, I. and Grummer, B. (2008) Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol*, **89**, 2114-2121.
- Roosild, T.P., Greenwald, J., Vega, M., Castronovo, S., Riek, R. and Choe, S. (2005) NMR Structure of Mystic, a Membrane-Integrating Protein for Membrane Protein Expression. *Science*, **307**, 1317-1321.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**, 125-135.

Literaturverzeichnis

- Rossmannith, W., Vilcek, S., Wenzl, H., Rossmannith, 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.
- Ruggli, N., Tratschin, J.D., Schweizer, M., McCullough, K.C., Hofmann, M.A. and Summerfield, A. (2003) Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro). *J Virol*, **77**, 7645-7654.
- 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 Münch Tierärztl 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 diarrhoea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol*, **75**, 4692-4698.
- Seago, J., Hilton, L., Reid, E., Doceul, V., Jeyatheesan, J., Moganeradj, K., McCauley, J., Charleston, B. and Goodbourn, S. (2007) The N^{pro} product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *J Gen Virol*, **88**, 3002-3006.
- 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.
- 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.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2007) Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog*, **3**, e103.

Literaturverzeichnis

- StGelais, C., Tuthill, T.J., Clarke, D.S., Rowlands, D.J., Harris, M. and Griffin, S. (2007) Inhibition of hepatitis C virus p7 membrane channels in a liposome-based assay system. *Antiviral Res*, **76**, 48-58.
- Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol*, **219**, 37-44.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA Polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol*, **185**, 60-89.
- 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., Warren, 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 diarrhea 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.
- Tchernev, V.T., Mansfield, T.A., Giot, L., Kumar, A.M., Nandabalan, K., Li, Y., Mishra, V.S., Detter, J.C., Rothberg, J.M., Wallace, M.R., Southwick, F.S. and Kingsmore, S.F. (2002) The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol Med*, **8**, 56-64.
- Tellinghuisen, T.L., Paulson, M.S. and Rice, C.M. (2006) The NS5A protein of bovine viral diarrhea virus contains an essential zinc-binding site similar to that of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol*, **80**, 7450-7458.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L. and Treadaway, J. (2008) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog*, **4**, e1000032.
- Tews, B.A. and Meyers, G. (2007) The pestivirus glycoprotein E^{ns} is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J Biol Chem*, **282**, 32730-32741.
- Thapa, A., Shahnawaz, M., Karki, P., Raj Dahal, G., Golam Sharoar, M., Yub Shin, S., Sup Lee, J., Cho, B. and Park, I.S. (2008) Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to Escherichia coli thermostable proteins. *Biotechniques*, **44**, 787-96.
- Thiel, H.-J., Meyers, G., Stark, R., Tautz, N., Rumenapf, 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., Pagemann, 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., Rumenapf, T. and Meyers, G. (1991) Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*, **65**, 4705-4712.

Literaturverzeichnis

- Tratschin, J.D., Moser, C., Ruggli, N. and Hofmann, M.A. (1998) Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} 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.
- 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.
- Vilcek, S. and Nettleton, P.F. (2006) Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol*, **116**, 1-12.
- 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.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. and Liang, T.J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, **11**, 791-6.
- 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.
- Welsch, C., Albrecht, M., Maydt, J., Herrmann, E., Welker, M.W., Sarrazin, C., Scheidig, A., Lengauer, T. and Zeuzem, S. (2007) Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae. *J Mol Graph Model*, **26**, 546-557.
- 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 diarrhoea. *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.

Literaturverzeichnis

- Wiskerchen, M., Belzer, S.K. and Collett, M.S. (1991) Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea 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 diarrhoea 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 diarrhoea 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.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. and Lemon, S.M. (2006) Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol*, **81**, 629-638.
- Yoo, Y., Rote, K. and Rechsteiner, M. (1989) Synthesis of peptides as cloned ubiquitin extensions. *J Biol Chem*, **264**, 17078-17083.
- Yu, H., Grassmann, C.W. and Behrens, S.E. (1999) Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea 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 diarrhoea 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 diarrhoea virus. *J Virol*, **72**, 9365-9369.

10 Danksagung

Ich möchte mich besonders bedanken bei:

- Prof. Dr. Norbert Tautz für die Überlassung der Themen dieser Arbeit, für die ständige Unterstützung mit Rat und Ideen, für Geduld und Ausdauer bei Diskussionen, für die nötige Motivation in schweren Zeiten und nicht zuletzt für die Möglichkeit meine Arbeiten in Lübeck fort- und zu Ende führen zu können.
- Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Virologie, für ein immer offenes Ohr und Gesprächsbereitschaft und für alle bereitwillige Unterstützung.
- Allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie am Fachbereich Veterinärmedizin der JLU Gießen und des Instituts für Virologie und Zellbiologie der Universität Lübeck für ständige Hilfsbereitschaft, regen Austausch und eine nette Arbeitsatmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank:

Meinen Mitdoktoranden Dr. Tobias Lackner, Dr. Alexandra Müller, Dr. Deborah Basso, Vera Schregel, Lars Krüger und unserem Postdoc Dr. Olaf Isken.

Sylvaine Jacobi, Bettina Schmidt, Martina Hell und Stefanie Schwindt für die tatkräftige Unterstützung bei unzähligen Experimenten.

Dr. Gleyder Roman-Sosa für Hilfe und Austausch bei Proteinexpressionen und -aufreinigungen und der Herstellung monoklonaler Antikörper.

Dr. Yuri Koussov für stete Diskussionsbereitschaft und Anregungen.

Dr. Andreas Gallei, der mich überhaupt erst auf den Pfad der Virologie geführt hat.

- Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“, nicht nur für finanzielle Unterstützung, sondern für lehrreiche Einblicke in andere interessante Bereiche der Molekularbiologie und vor allem für eine schöne Zeit mit netten Menschen.
- M.U.T.I.G. '99.
- Julia Grenz für viele schöne Stunden im Gießener Umland.
- Zuletzt und am meisten bei meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht und mich stets bedingungslos und liebevoll unterstützt hat.

