

ALEXANDER PANKRAZ

**ANALYSE DER 3` NICHT TRANSLATIERTEN
REGION VON BVDV Cp7**

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 2008

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 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: **PD Dr. med.vet. Paul Becher**

Analyse der 3' nicht translatierten Region von BVDV CP7

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

eingereicht von

Alexander Pankraz

Tierarzt aus Kiel

Gießen 2007

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

Dekan. Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

PD Dr. P. Becher

Prof. Dr. C. Greveling

Tag der Disputation: 23.11.2007

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, welche ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Texten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir 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, beachtet.

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 10 |
| 1.1 Pestiviren | 10 |
| 1.1.1 Taxonomie, Morphologie, Genomorganisation und Biotypen..... | 10 |
| 1.1.2 Antigenetische und genetische Heterogenität von Pestiviren | 14 |
| 1.1.3 Wirtsspektrum und Wachstum in Zellkultur..... | 15 |
| 1.1.4 Klinik und Pathogenese der durch BVDV induzierten Krankheiten | 16 |
| 1.2. Nichttranslatierte Regionen | 17 |
| 1.2.1 NTRs bei zellulären Messenger-RNAs..... | 17 |
| 1.2.2 Einteilung der 3`NTRs von Plusstrang-RNA Viren..... | 18 |
| 1.2.3. Eigenschaften und Funktionen viraler 3`NTRs..... | 19 |
| 1.2.4 3`NTRs bei Pestiviren | 20 |
| 1.2.5 RNA-Sekundärstrukturen..... | 24 |
| 1.3 Zielsetzung der Arbeit | 26 |
| 2. Material und Methoden | 27 |
| 2.1. Material | 27 |
| 2.1. 1 Zellen..... | 27 |
| 2.1.1.1 Eukaryotische Zellen..... | 27 |
| 2.1.1.2 Prokaryotische Zellen..... | 27 |
| 2.1.2 Virusstämme | 27 |
| 2.1.3 Plasmide und cDNA-Gesamtklone | 27 |
| 2.1.4 Antisera und Antikörper..... | 28 |
| 2.1.4.1 Antisera | 28 |
| 2.1.4.2 Antikörper | 28 |
| Primärantikörper | 28 |
| Sekundärantikörper | 29 |
| 2.1.5 Synthetische DNA-Oligonukleotide | 29 |
| 2.1.6 Nährmedien | 33 |
| 2.1.6.1 Zellkulturmedien | 33 |
| 2.1.6.2 Bakterienkulturmedien | 34 |
| 2.1.7 Lösungen und Puffer | 34 |
| 2.1.8 Radioaktiv markierte Substanz..... | 38 |
| 2.1.9 Enzyme..... | 38 |
| 2.1.10 Chemikalien | 39 |
| 2.1.11 Vorgefertigte Systeme („Kits“)..... | 40 |
| 2.1.12 Verbrauchsmaterialien | 41 |
| 2.1.13 Geräte | 41 |
| 2.1.13.1 Zentrifugen..... | 43 |
| 2.2 Methoden | 43 |
| 2.2.1 Zellkulturarbeiten..... | 43 |
| 2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten | 43 |
| 2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl | 44 |
| 2.2.1.3 Virusinfektion von Zellen | 44 |
| 2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit synthetischer RNA | 44 |
| 2.2.1.5 Plaquereinigung..... | 45 |
| 2.2.1.6 Virustitration | 46 |
| 2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von viralem Antigen..... | 46 |
| 2.2.1.8 Indirekte Immunperoxidasefärbung zum Nachweis von viralem Antigen | 47 |
| 2.2.1.9 Wachstumskurve | 48 |
| 2.2.1.10 Bestimmung der spezifischen Infektiosität von synthetischen RNA Transkripten.... | 49 |
| 2.2.2 Mikrobiologische Methoden | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2.1 Anzucht von Bakterien..... | 49 |
| 2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien..... | 50 |
| 2.2.2.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA..... | 50 |
| 2.2.2.4 Kleine Plasmidpräparation (Mini-Präp)..... | 51 |
| 2.2.2.5 Mittlere Plasmidpräparation (Midi-Präp)..... | 52 |
| 2.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken | 53 |
| 2.2.3.1 Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanol-fällung | 53 |
| 2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen..... | 54 |
| 2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren..... | 54 |
| 2.2.4 RNA-Techniken | 55 |
| 2.2.4.1 <i>In vitro</i> Transkription | 55 |
| 2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen | 56 |
| 2.2.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese für „Northern Blot“ | 56 |
| 2.2.4.4 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“) | 57 |
| 2.2.4.5 RNA/DNA-Hybridisierung | 57 |
| 2.2.4.6 Reverse Transkription (RT) | 58 |
| 2.2.5 DNA-Techniken | 58 |
| 2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) | 58 |
| 2.2.5.2 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „Quick Change“(QC)-PCR | 59 |
| 2.2.5.3 Radioaktive Markierung durch „Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gensonde..... | 60 |
| 2.2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 61 |
| 2.2.5.5 Enzymatische Spaltung von DNA..... | 61 |
| 2.2.5.5.1 cDNA-Linearisierung für die synthetische Transkription..... | 61 |
| 2.2.5.5.2 DNaseI-Verdau..... | 62 |
| 2.2.5.5.3 <i>DpnI</i> -Verdau von QC-PCR-Produkten | 62 |
| 2.2.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase | 62 |
| 2.2.5.7 Sequenzierung von DNA | 63 |
| 2.2.5.8 DNA-Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen | 64 |
| 2.2.5.9 Konstruktion der cDNA-Klone | 65 |
| 2.2.5.9.1 M3, M5, M9, M10, M11, Del SL I und Del SL II | 65 |
| 2.2.5.9.2 M1, M2, M4, M6, M7, M8, M12, M13, M14, M15, M3R2, M3R5 | 66 |
| 2.2.5.9.3 Del SL III, Del SL II-III | 66 |
| 2.2.5.9.4 Del SL II R1, Del SL II R3, Del SL II R6..... | 67 |
| 2.2.6 Proteinanalytische Methoden | 67 |
| 2.2.6.1 Zellyse | 67 |
| 2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 68 |
| 2.2.6.3 Immunoblot-Analyse..... | 68 |
| 2.2.7 Analyse von Sequenzdaten..... | 69 |
| 2.2.7.1 Vorhersage der RNA-Sekundärstruktur | 69 |
| 2.2.8 Computergestützte Quantifizierung von Northern Blots | 70 |
| 3. Ergebnisse | 71 |
| 3.1 4-Basen-Deletionen in der 3' NTR von CP7-388..... | 71 |
| 3.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten M6-M15..... | 73 |
| 3.2.1 Wachstumseigenschaften | 73 |
| 3.2.2. Virale RNA-Synthese..... | 75 |
| 3.2.2 Expression der viralen Nichtstrukturproteine NS3 und NS2-3 | 76 |
| 3.3 Sequenzanalyse von sekundären Mutationen für M6-M15..... | 77 |
| 3.4 Sequenzanalyse der Pseudorevertanten von M3..... | 78 |
| 3.5 Deletion kompletter Stemloops | 82 |
| 4. Diskussion | 89 |

| | |
|--|------------|
| 5. Literaturverzeichnis..... | 95 |
| 6. Zusammenfassung..... | 101 |
| 7. Summary | 103 |
| 8 Abbildungsverzeichnis | 105 |
| 8.1 Abbildungen..... | 105 |
| 8.2 Tabellen | 105 |
| 9. Abkürzungsverzeichnis..... | 106 |
| 10. Publikationen, Vorträge und Poster..... | 108 |
| 10.1 Publikationen | 108 |
| 10.2 Kongressbeiträge | 108 |
| 11. Danksagung..... | 110 |

1. Einleitung

1.1 Pestiviren

1.1.1 Taxonomie, Morphologie, Genomorganisation und Biotypen

Das Genus *Pestivirus* wird aufgrund von Ähnlichkeiten im Genomaufbau und der Strategie der Genexpression in die Virusfamilie *Flaviviridae* eingruppiert. Weitere Genera innerhalb dieser Familie sind das Genus *Flavivirus*, in dem u.a. humanmedizinisch bedeutsame Krankheitserreger wie Gelbfiebervirus, Dengueviren und das Virus der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis zusammengefasst werden, sowie das Genus *Hepacivirus* mit dem Hepatitis C Virus. Das Genus *Pestivirus* umfasst folgende Spezies: (I) das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-1 (BVDV-1), (II) BVDV-2, (III) das „Border Disease“ Virus (BDV) und (IV) das Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) (Becher & Thiel, 2002, Heinz et al., 2000). Ein aus einer Giraffe isoliertes Pestivirus wurde als fünfte Spezies in die Familie der Pestiviren aufgenommen (Avalos-Ramirez et al., 2001, Heinz et al., 2000).

Bei Pestiviren handelt es sich um etwa 40-60 nm große, behüllte, pleomorphe Viren. In der Lipidhülle sind die viralen Glykoproteine verankert (s. Abb. 1). Sie umschließt das virale Kapsid (C). Elektronenmikroskopische Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass die aus infizierten Zellen freigesetzten Viren fragil sind und die Tendenz haben, mit Serum- und Zellbestandteilen zu assoziieren (Laude, 1977). Im Inneren des Kapsids befindet sich die virale genomische RNA, welche in der Regel eine Länge von ungefähr 12,3 kb besitzt. Die genomische RNA enthält einen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF), der für ein Polyprotein von etwa 3900 Aminosäuren kodiert und von den 5` und 3` nicht translatierten Regionen (NTR) flankiert wird (Avalos-Ramirez et al., 2001, Becher et al., 1998, Collett et al., 1988, Meyers & Thiel, 1996, Ridpath et al., 1994).

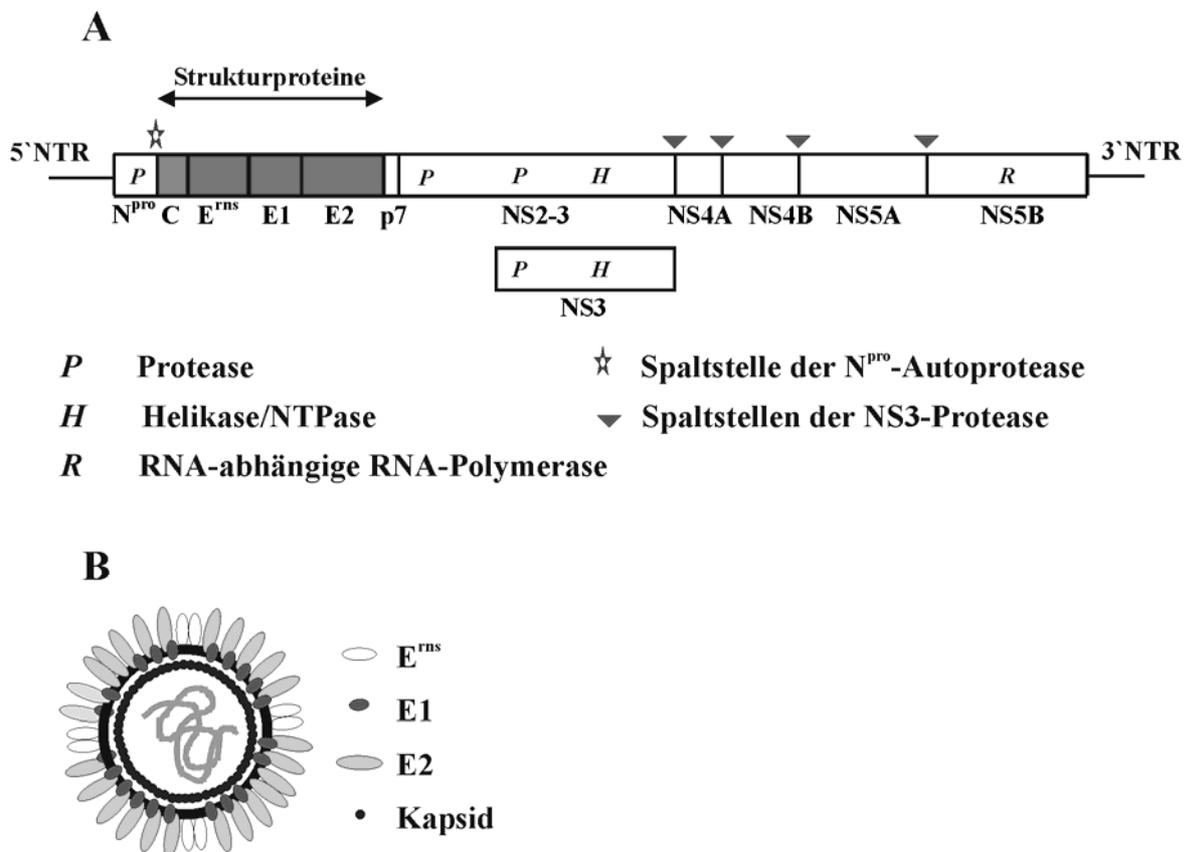


Abb. 1:

A: Schematischer Genomaufbau von BVDV

Das Genom von BVDV ist eine einzelsträngige RNA von positiver Polarität, welche eine Länge von ca. 12,3 Kilobasen (kb) besitzt. Das virale Polyprotein, das von viralen und zellulären Proteasen in die reifen Struktur- (grau unterlegt) und Nichtstrukturproteine gespalten wird, beginnt am N-Terminus mit der Autoprotease N^{pro}, gefolgt vom Kapsidprotein C und den viralen Glykoproteinen E^{rns}, E1 und E2. Daran schließen sich die viralen Nichtstrukturproteine p7, NS2-3 (NS2 und NS3) sowie NS4A bis NS5B an. NS2 besitzt eine Autoproteaseaktivität. NS3 besitzt Helikase- (H) und Proteaseaktivität (P). Die NS3-Protease spaltet an ihrem eigenen und ist außerdem für alle weiteren Spaltungen im Polyprotein von NS4A bis NS5B verantwortlich. Das Nichtstrukturprotein NS5B besitzt eine RNA-Polymerase-Aktivität (R).

B: Schematische Darstellung eines BVDV-Virions

Bei BVDV handelt es sich um pleomorphe Partikel. Die viralen Glykoproteine sind in einer Phospholipidmembran verankert, welche das virale Kapsid umschließt. Das virale Kapsid enthält die virale RNA.

Die virale genomische RNA besitzt positive Polarität. Ihr 5'-Ende weist im Gegensatz zu den Flaviviren keine Cap-Struktur auf. Die 5'NTR hat eine Länge von etwa 380 nt und verfügt mit der „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES) über die Möglichkeit, die Translation auf einem 5'Cap-unabhängigen

Weg zu initiieren (Lemon & Honda, 1997, Pestova et al., 1998, Poole et al., 1995, Rijnbrand et al., 1997). Die pestivirale 3`NTR variiert in der Länge zwischen 188 und 276 Nukleotiden und ist nicht polyadenyliert (Becher et al., 1998).

Das virale Polyprotein wird durch virale und zelluläre Proteasen in die reifen Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten. Am N-Terminus des Polyproteins liegt das Nichtstrukturprotein N^{pro}, eine Autoprotease, die ihren eigenen Carboxyterminus abspaltet (s. Abb. 1). Darauf folgen die Strukturproteine C (Kapsidprotein) und das Glykoprotein E^{ms} („ribonuclease secreted“). Dieses Struktur- und Glykoprotein besitzt Ribonukleaseaktivität und wird von infizierten Zellen in die Plasmamembran inseriert sowie sezerniert. Daran schließen sich die Glykoproteine E1 und E2 an (Thiel et al., 1996). E2 und in geringerem Maße E^{ms} induzieren die Bildung neutralisierender Antikörper im infizierten Tier (Weiland et al., 1992, Weiland et al., 1990). Die Glykoproteine bilden über Disulfidbrücken verbundene Komplexe, E^{ms}-Homodimere, E1-E2-Heterodimere sowie E2-Homodimere (s. Abb. 1), welche in infizierten Wirtszellen und in den Virionen nachgewiesen werden können (Thiel et al., 1991, VanOirschot, 1988). Danach folgen die Nichtstrukturproteine p7, NS2-3 (NS2 und NS3), NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Bei zp BVDV wird NS3 in hohen Mengen exprimiert. Bei nichtzytopathogenen BVDV ist diese Spaltung nur zu frühen Infektionszeitpunkten zu beobachten (Lackner et al., 2004). Diese Spaltung wird durch eine Autoproteaseaktivität des Nichtstrukturproteins NS2, welche abhängig vom Infektionszeitpunkt reguliert wird, vermittelt (Lackner et al., 2004). NS3 besitzt NTPase-, Helikase- sowie Serinproteaseaktivität, mit der es sich selbst an seinem eigenen C-Terminus abspaltet. Des Weiteren ist die NS3-Protease für alle weiteren Spaltungen im Nichtstrukturproteinbereich NS4A-NS5B verantwortlich (Meyers & Thiel, 1996, Tautz et al., 1997). NS4A stellt einen Cofaktor für die NS3-Protease dar (Collett et al., 1991, Tautz et al., 1997). Über die Funktionen der

Nichtstrukturproteine NS4B und NS5A ist wenig bekannt. In einer Studie im BVDV-Replikon-System konnte gezeigt werden, dass NS5A als einziges Nichtstrukturprotein *in trans* komplementierbar ist (Grassmann et al., 2001). NS5A wird posttranslational phosphoryliert. Für das mit den Pestiviren nahe verwandte Hepatitis-C Virus (HCV) konnte nachgewiesen werden, dass NS5A unter anderem durch Phosphorylierung zur Modulation von Protein-Proteininteraktionen und der RNA-Replikation beiträgt (Evans et al., 2004). Für HCV wurde beschrieben, dass NS5A ein Zink-Metalloprotein ist (Tellinghuisen et al., 2004). Das Nichtstrukturprotein NS5B stellt die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) dar (Kao et al., 1999). Die Virionen reifen wahrscheinlich an Membranen des endoplasmatischen Retikulums (Bielefeldt Ohmann, 1988a, Bielefeldt Ohmann, 1988b, Bielefeldt Ohmann & Bloch, 1982, Gray & Nettleton, 1987). Die Freisetzung der Virionen erfolgt wahrscheinlich durch Exozytose sowie bei zp Viren auch durch Lyse infizierter Zellen.

Anhand ihres Verhaltens in Zellkultur können bei Pestiviren zytopathogene (zp) und nichtzytopathogene (nzp) Biotypen unterschieden werden (Gillespie et al., 1960a, Gillespie et al., 1960b, Lee & Gillespie, 1957). Der zytopathogene Effekt (zpE) führt zu einer Lyse der infizierten Zellen. Da NS3 zu Beginn dieser Arbeit nur bei zytopathogenen BVDV-Isolaten nachgewiesen werden konnte, wurde es als Markerprotein zytopathogener BVDViren angesehen (Meyers & Thiel, 1996). Die Zelllyse bei der Infektion mit zp BVDV beruht auf Apoptose (Zhang et al., 1996). Es wird vermutet, dass die von zp BVDViren in infizierten Zellen gebildeten höheren Mengen viraler RNA an diesem Geschehen beteiligt sind (Becher et al., 2001b, Mendez et al., 1998, Vassilev & Donis, 2000). Die meisten Pestiviren wachsen in Zellkultur ohne einen zpE zu induzieren. Allerdings können bei BVDV zytopathogene Varianten aus Tieren isoliert werden, welche persistent mit nzp Viren infiziert sind (s.u.). Das Auftreten von zp Virusvarianten in persistent infizierten Tieren steht im

Zusammenhang mit einer stets tödlich verlaufenden Erkrankung bei diesen Tieren (s.u.).

Eine weitere Besonderheit bei Pestiviren ist das Auftreten von so genannten „defekten interferierenden Partikeln“, replikationskompetenten RNAs, denen in der Regel die viralen Strukturproteine fehlen und die nur mit Hilfe eines Helfervirus, das die Strukturproteine zur Verpackung des Genoms bereitstellt, Virionen bilden können (Meyers & Thiel, 1996, Roux et al., 1991). Solche Subgenome (Replikons) werden experimentell im Rahmen eines reversen genetischen Systems zur Analyse von RNA-Replikation und Translation eingesetzt. Bei Replikons können diese beiden Schritte der viralen Replikation von anderen Schritten des viralen Lebenszyklus, wie z. B. Verpackung oder Viruseintritt in Zellen, entkoppelt werden. Besondere Bedeutung haben Replikons, welche analog zu BVDV-Replikons konstruiert wurden, für Studien bei HCV (Lohmann et al., 1999), da sich dieses Virus bis vor kurzem nicht in Zellkultur vermehren ließ.

1.1.2 Antigenetische und genetische Heterogenität von Pestiviren

In Untersuchungen mit polyklonalen Antiseren konnte zunächst gezeigt werden, dass zwischen BVDV und KSPV eine antigenetische Verwandtschaft besteht (Darbyshire, 1960). In späteren Studien war es durch die Verwendung von Antiseren in Kreuzneutralisationstests oder mit monoklonalen Antikörpern möglich, nicht nur antigenetische Untersuchungen zwischen den einzelnen Pestiviruspezies durchzuführen, sondern auch die antigenetische Verwandtschaft verschiedener Pestivirusisolate innerhalb einer Spezies zu bestimmen (Avalos-Ramirez et al., 2001, Becher et al., 2003, Cay et al., 1989, Moennig & Plagemann, 1992). Die antigenetischen Unterschiede sind insbesondere innerhalb der Spezies BDV und BVDV-1 besonders ausgeprägt.

Pestivirusisolate können auf der Grundlage von kompletten Genomsequenzen sowie von Teilsequenzen vergleichend analysiert werden

(Becher et al., 1995, Becher et al., 1999b, Becher et al., 1997, Hofmann et al., 1994, Paton, 1995, Tijssen et al., 1996, van Rijn et al., 1997). Sequenzbereiche des viralen Genoms, welche zur Verwandtschaftsanalyse herangezogen werden, entstammen insbesondere aus den Genen N^{pro} und E2 sowie der 5' NTR, wobei letztere für die Bestimmung von Verwandtschaftsgraden innerhalb einer Spezies weniger gut geeignet ist (Becher et al., 1999b, Becher et al., 1997).

1.1.3 Wirtsspektrum und Wachstum in Zellkultur

Infektionen mit Pestiviren betreffen ausschließlich Paarhufer. Neben den domestizierten Ruminanten und Schweinen können auch Wildwiederkäuer mit Pestiviren infiziert werden, unter ihnen Gnus, Rothirsche, Damwild, Rehe, Elche und Giraffen (Moennig et al., 1990, Pritchard, 1963). Pestiviren werden nach der betroffenen Wirtsspezies und den Krankheiten, die sie verursachen, benannt. KSPV konnte unter natürlichen Bedingungen bislang nur aus Haus- oder Wildschweinen isoliert werden. Das Wirtsspektrum von BVDV und BDV umfasst unter natürlichen Bedingungen Rinder, Schafe, Ziegen, Schweine und Wildwiederkäuer (Becher et al., 1999a, Becher et al., 1997, Doyle & Heuschele, 1983, Hamblin & Hedger, 1979). Infektionen von Schweinen mit BVDV und BDV führen durch falsch-positive Resultate aufgrund von Kreuzreaktionen zu erheblichen Problemen bei der serologischen Diagnostik der klassischen Schweinepest.

Pestiviren können in primären und permanenten Zelllinien ihrer Wirtsspezies vermehrt werden. Des Weiteren können sie an mehrere Zellkultursysteme adaptiert werden. Von praktischer Bedeutung sind auch Kontaminationen empfänglicher Zellkultursysteme durch virushaltige fötale bovine Seren, welche den Zellkulturmedien als Proteinquelle zugesetzt werden. Kontaminationen von Impfstoffen mit Pestiviren können zu Ausbrüchen von durch Pestiviren induzierten Krankheiten bei Rindern, Schafen, Ziegen und

Schweinen führen (Lohr et al., 1983, Loken et al., 1991, Vannier et al., 1988, Wensvoort & Terpstra, 1988).

1.1.4 Klinik und Pathogenese der durch BVDV induzierten Krankheiten

Bei Infektionen von immunkompetenten Rindern mit BVDV kommt es meist zu subklinischen oder milden Krankheitserscheinungen (Baker, 1987, Pritchard, 1963). Klinische Symptome sind milde Diarrhö, Fieber, Anorexie, respiratorische Symptome, vermehrter Sekretausfluss aus Nase oder Augen, Schleimhautveränderungen am Flotzmaul sowie Fruchtbarkeitsstörungen (Baker, 1987, Potgieter et al., 1985). Durch Letztere entstehen die größten wirtschaftlichen Verluste. Die Infektion induziert eine Leukopenie und eine Immunsuppression. Meist beendet die Ausbildung einer spezifischen Immunität rasch das Erkrankungsgeschehen.

Nach Infektion mit hochvirulenten BVDV-Stämmen können schwere klinische Manifestationen auftreten. Diese Infektionen verlaufen häufig letal. Klinische Symptome sind ausgeprägte Diarrhö, respiratorische Symptome sowie ein hämorrhagisches Syndrom (Corapi et al., 1990b, Pellerin et al., 1994, Rebhuhn et al., 1989).

Bei der Infektion tragender Tiere kann es zu den o.g. Symptomen kommen. Des Weiteren ist auch eine diaplazentare Infektion des Fetus möglich. Abhängig vom Gestationsstadium zum Zeitpunkt der Infektion kommt es unter anderem zu Aborten, Totgeburten, Geburten lebensschwacher Kälber sowie zu Missbildungen (ZNS-Veränderungen u.a.) bei den Nachkommen (Baker, 1987, Casaro et al., 1971, Kahrs, 1973). Falls die Infektion zwischen dem 40. und 120. Trächtigkeitstag erfolgt, besteht die Möglichkeit, dass sich eine persistierende Infektion des Fetus etabliert. Da die Immunkompetenz des Fetus in diesem Gestationsstadium noch nicht voll entwickelt ist, kommt es zu einer erworbenen, spezifischen Immuntoleranz gegenüber dem persistierenden BVDV-Stamm. Da persistent infizierte Tiere lebenslang große Mengen Virus ausscheiden, spielen

sie für die Ausbreitung des Erregers eine zentrale Rolle. Diese Tiere sind meist seronegativ, können aber nach Infektion mit einem antigenetisch heterologen BVDV-Stamm Antikörper bilden. Persistent infizierte Tiere bleiben im Wachstum oft zurück (Kümmern), können aber auch klinisch unauffällig sein (Coria & McClurkin, 1978, Steck et al., 1980). Persistent infizierte Färsen/Kühe gebären Kälber, welche wiederum persistent infiziert sind. Bei persistent infizierten Tieren kann es ab einem Alter von 6 Monaten zur so genannten Mucosal Disease (MD) kommen. Symptome dieser stets letal verlaufenden Erkrankung sind Erosionen, Ulzerationen sowie Nekrosen an den Schleimhäuten und dem lymphatischem Gewebe des Verdauungsapparats sowie unstillbare, oft blutige Durchfälle. Die Erkrankung führt meist bereits nach wenigen Tagen zum Tode (Brownlie et al., 1984). Aus persistent infizierten Tieren, die an Mucosal Disease erkrankt sind, kann stets ein zytopathogenes und ein nichtzytopathogenes BVD-Virus isoliert werden, die meist eine enge antigenetische Verwandtschaft aufweisen (Corapi et al., 1988, McClurkin et al., 1985, Meyers & Thiel, 1996). Bei den aus MD-Tieren isolierten zp und nzp Viren handelt es sich um ein so genanntes Viruspaar.

1.2. Nichttranslatierte Regionen

Unter nicht translatierten Regionen (NTR) versteht man diejenigen Teile einer Messenger-RNA (mRNA) oder eines viralen RNA-Genoms, die nicht für ein Genprodukt kodieren. Begriffe wie untranslatierte Region (UTR), nichtkodierende Region oder „noncoding regions“ (NCR) werden synonym verwendet. Je nach Position werden diese Regionen als 5` oder 3`NTRs bezeichnet.

1.2.1 NTRs bei zellulären Messenger-RNAs

Bei einer zellulären mRNA ist das 5` Ende mit einer Cap-Struktur versehen. Das „capping“ zellulärer mRNA bezeichnet den Prozess, bei dem eine

7-Methylguanosingruppe an das 5' Ende der neu synthetisierten mRNA kovalent gebunden wird. Eine große Bedeutung hat die 5' Cap-Struktur für die Initiation der Translation, bei der zwei Cap-bindende Proteine (CBP), CBP20 und CBP80, an die Cap-Struktur binden und den „cap-binding complex“ (CBC) bilden. Der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor eIF4A bindet an die Cap-Struktur, welcher dann die Interaktion mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms vermittelt. Der CBC beeinflusst außerdem noch Splicing-Prozesse. Eine Rolle beim Transport der prä-mRNA ins Zytoplasma wird ebenfalls vermutet. Ferner wird angenommen, dass die 7-Methylguanosingruppe am 5' Ende der mRNA als Schutz vor 5' Exonukleasen fungiert und dadurch die Stabilität der mRNAs erhöht.

Mit Ausnahme einiger Histon-mRNAs ist die 3' NTR bei zellulären mRNAs mit einem poly(A)-Schwanz versehen, welcher meist aus 50-100 Adenosinmonophosphatresten besteht. Der poly(A)-Schwanz beeinflusst die Stabilität und Translationseffizienz einer mRNA. Studien haben gezeigt, dass die 3' NTR eine wichtige Rolle bei der posttranslationalen Regulation eukaryotischer Transkripte innehat (Decker & Parker, 1995). Durch Interaktion von Proteinen mit den 5' und 3' Enden kommt es zu einer Zirkularisierung der mRNAs (Dreher, 1999). Dieses Phänomen begünstigt unter anderem die Reinitiation von Ribosomenuntereinheiten, die vom 3' Ende nach Beendigung der Translation abdissoziieren. Hinweise auf diese Zirkularisierung liefert die Tatsache, dass Polysomen, d.h. an einem mRNA-Molekül aufgereihete Ribosomen, welche parallel an der Translation der mRNA partizipieren, zum Teil in zirkulärer Konformation vorliegen (Hershey et al., 1996).

1.2.2 Einteilung der 3' NTRs von Plusstrang-RNA Viren

Bei Plusstrang-RNA Viren können 3 Gruppen von 3' NTRs unterschieden werden (Dreher, 1999):

- 3`NTRs, deren Sekundärstruktur der von tRNAs ähnelt. Diese werden als „tRNA like structures“ (TLS) bezeichnet
- 3`NTRs, die wie die zellulären mRNAs polyadenyliert sind
- 3`NTRs mit non-TLS heteropolymeren Strukturen

3`NTRs mit TLS finden sich ausschließlich bei Pflanzenviren wie Tymo-, Bromoviren, Cucumo-, Hordei-, Tobamo- und Tobraviren (Dreher, 1999). Eine wichtige Eigenschaft dieser TLS liegt darin, dass sie aminoacyliert werden können und so ein Mimikry von tRNA-Funktionen ausüben (Dreher, 1999).

Plusstrang-RNA Viren, welche eine polyadenylierte 3`NTR besitzen, sind u.a. Toga-, Picorna-, Corona- und einige Pflanzenviren wie Potex-, Poty- und Comoviren (Dreher, 1999). Der poly(A)-Schwanz variiert hierbei in der Länge von etwa 20-100 Nukleotiden (Ahlquist & Kaesberg, 1979). Die Längenverteilung der poly(A)-Schwänze ähnelt dabei der von zytoplasmatischen mRNAs in eukaryotischen Zellen (Jacobson & Peltz, 1996).

Viele Viren besitzen 3`NTRs, welche sich nicht in die beiden oben genannten Gruppen einordnen lassen. Diese werden bei Plusstrang-RNA Viren als „non-TLS“ heteropolymere 3`NTRs bezeichnet. Innerhalb dieser Gruppe liegen keine generellen strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten der 3`NTRs vor. In die Gruppe der Viren mit non-TLS heteropolymeren 3`NTRs werden zahlreiche Pflanzenviren wie Sobemo-, Luteo-, Tombo- und Closteroviren eingeordnet, des Weiteren Coliphagen, Flaviviren, Hepaciviren und Pestiviren (Buck, 1996, Dreher, 1999).

1.2.3. Eigenschaften und Funktionen viraler 3`NTRs

Die Genome von Plusstrang-RNA Viren dienen sowohl als mRNAs als auch als Matrize für die Minusstrangsynthese der RNA. Es liegt nahe, die Existenz von *cis*-aktiven Elementen, welche Translation und Replikation regulieren, innerhalb der 3`NTR von Plusstrang-RNA Viren zu postulieren. Im

Hinblick auf die Replikation stellt insbesondere die Regulation der Minusstrangsynthese eine wichtige Funktion der 3`NTR dar.

Ein generelles Problem von Genomen ist die Gefahr des Verlustes terminaler Sequenzabschnitte. Der Erhalt von korrekten 3` Enden ist von großer Bedeutung für alle Plusstrang-RNA Viren, zumal zelluläre Ribonukleasen (RNasen) die Integrität der 3` Termini gefährden. Virale Genome mit TLS-Strukturen können durch die Adenylierungsaktivität der CCA-Nukleotidyltransferase intakte 3` Enden beibehalten (Dreher, 1999). Polyadenylierte virale Genome können Nutzen aus der zytoplasmatischen Polyadenylierung der Wirtszelle ziehen. Obwohl Transkripte im Nukleus polyadenyliert werden, gibt es unter bestimmten Umständen die Möglichkeit der Polyadenylierung von verkürzten poly(A)-Schwänzen im Zytoplasma (Dreher, 1999).

Eine Regulation der Minusstrangsynthese scheint ein gemeinsames Merkmal des Lebenszyklus von Plusstrang-RNA Viren zu sein. Eine mögliche Bedeutung dieser Regulation liegt in der Koordination von Translations- und Replikationsprozessen, welche nicht gleichzeitig am selben RNA-Molekül stattfinden können (Kolakofsky & Weissmann, 1971). Obwohl Verpackungssignale prinzipiell überall im viralen Genom lokalisiert sein können, legt die Anwesenheit von konservierten Sequenzelementen am 3` Ende der RNA-Segmente von multipartiten RNA-Viren, wie Bromo-, Cucumo- und Tobraviren nahe, dass virale Verpackungssignale in der Nähe des 3` Endes lokalisiert sind (Dreher, 1999). Bei Mitgliedern der Familie *Flaviviridae* konnten Verpackungssignale weder am 3` Ende des Genoms noch in anderen Bereichen identifiziert werden.

1.2.4 3`NTRs bei Pestiviren

Die Länge der 3`NTR bei Pestiviren variiert zwischen 188 und 276 Nukleotiden (Avalos-Ramirez et al., 2001, Becher et al., 1998). Bei Betrachtung

Diese Region wird als „3' conserved“ (3'C)-Region bezeichnet, wohingegen der variable Rest der 3'NTR „3' variable“ (3'V)-Region benannt wird (Deng & Brock, 1993). Innerhalb der 3'C Region befindet sich ein bei allen Pestiviren konserviertes Sequenzmotiv (AGCACUUUAGCUG) (Becher et al., 1998).

Durch Sequenzanalysen und Computervorhersagen konnten Modelle für die Sekundärstruktur der 3'NTR von BVDV und KSPV erstellt werden (Deng & Brock, 1993). In dieser Studie zeigte sich, dass sich die 3'NTR in drei Stemloopstrukturen faltet (s. Abb. 4). Das 3' Ende des Genoms von Flaviviren besteht ebenfalls aus konservierten Stemloopstrukturen mit internen Pseudoknotenelementen (Brinton et al., 1986, Wengler & Castle, 1986). In aktuelleren Studien konnte durch Verdauung mit substratspezifischen RNasen (z.B. RNase T), 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 nachgewiesen werden, welche durch einzelsträngige Sequenzabschnitte voneinander getrennt sind. In Mutagenesestudien konnte durch Transitionen gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur des 3' terminalen Stemloop SLI der 3'C Region für die Replikationsfähigkeit des Replikons DI9C wichtig ist (Yu et al., 1999). Essentielle Sequenzmotive finden sich insbesondere im apikalen Loop von SL I.

Durch UV-Crosslinking war es möglich, zelluläre Proteine zu identifizieren, welche an die 3'NTR des Replikons DI9C binden. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine von mehreren Zelllinien, welche die Replikation von BVDV-Subgenomen unterstützen, an die 3'V Region binden (Isken et al., 2003). Diese Proteine gehören zur sog. NF90/NFAR-Proteinfamilie („Nuclear Factor Associated With RNA“). Als Bindungsstellen für diese Proteine wurden sog. UGA-Boxen postuliert, welche in allen Pestivirusstämmen vorkommen. Diese 12 Nukleotide langen Sequenzmotive sind allerdings nur in Teilbereichen

ihrer Sequenz konserviert. Mutationsstudien mit dem Zweck, die Bedeutung dieser UGA-Boxen für die Interaktion mit NF90/NFAR-Proteinen herauszuarbeiten, wurden durch die Tatsache erschwert, dass innerhalb der UGA-Boxen keine struktureutralen Mutationen vorgenommen werden konnten. Somit konnte eine klare Aussage darüber, ob Sequenzmotive in der 3'V oder deren Sekundärstruktur ausschlaggebend für RNA-Protein-Interaktionen sind, nicht getroffen werden. Dieselben Proteine binden auch an die 5'NTR von BVDV (Isken et al., 2003). Hierbei war es allerdings nicht möglich, die für die Proteinbindung verantwortlichen spezifischen Sequenzabschnitte zu identifizieren. Daher wurde postuliert, dass die hochkonservierte 5'NTR von BVDV mit ihrer komplexen Sekundärstruktur für die RNA-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Isken et al., 2003). Durch computergestützte Analysen bestanden bereits Hinweise auf eine mögliche 5'-3' Interaktion der viralen genomischen RNA von BVDV (Pankraz & Becher). Eine Interaktion der 5' und 3' Enden des Genoms von BVDV konnte auch in Abwesenheit von zellulären Proteinen experimentell nahegelegt werden (Isken et al., 2003). Durch diese Resultate und die Interaktion von sowohl 5'NTR als auch 3'NTR mit den NF90/NFAR-Proteinen scheint eine zirkuläre Konformation des BVDV-Genoms wahrscheinlich. Von Isken et al. wurde postuliert, dass die NF90/NFAR-Proteine an der zeitlichen Koordination von Translation und Replikation des BVDV-Genoms beteiligt sind.

Weiterhin konnte gezeigt 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 von den Autoren als Pseudostopkodons bezeichnet (Isken et al., 2004). Durch Analyse dieser Pseudostopkodons mittels struktureutraler und nicht-struktureutraler 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 (Isken et al., 2004). Pseudostopkodons finden sich in der 3`NTR von allen Mitgliedern der Familie Flaviviridae (Isken et al., 2004). Nach Ansicht der Autoren ist die 3`V Region mit den Pseudostopkodons wichtig als Abstandhalter zwischen ORF und der 3`C Region, um eine Interferenz von Translation und Replikation zu verhindern (Isken et al., 2004).

1.2.5 RNA-Sekundärstrukturen

DNA und RNA nehmen als einzelsträngige Moleküle eine Sekundärstruktur an, die einer möglichst niedrigen freien Energie entspricht. Neben den Basenpaarungen G-C und A-T/U sind bei RNA auch G-U Basenpaarungen möglich. Letztere stellen allerdings die energetisch ungünstigste Basenpaarung dar. Mittels Computervorhersagen ist es möglich, ein Modell für die Sekundärstruktur einer bekannten DNA- oder RNA-Sequenz zu erstellen. Hierbei erarbeiten Computerprogramme anhand der Primärsequenzen Sekundärstrukturvorhersagen mit möglichst niedriger freier Energie (Zuker, 2000). Diese Vorhersagen lassen sich mittels geeigneter Software in graphische Modelle überführen. Eine gängige Darstellungsform liefert das Programm Squiggles. Hierbei wird der Nukleinsäurestrang als fortlaufende Linie und Basenpaarungen als zum Nukleinsäurestrang rechtwinklig verlaufende kurze Striche dargestellt. Oftmals ist die Sekundärstruktur einer Nukleinsäure durch haarnadelförmige Strukturen gekennzeichnet, die als „Stemloops“ oder „Hairpins“ bezeichnet werden. Der apikale einzelsträngige Bereich wird als „Loop“, der basengepaarte Rest wird als „Stem“ bezeichnet; nicht gepaarte Bereiche innerhalb des „Stems“ heißen „Bulks“ (s. Abb. 3).

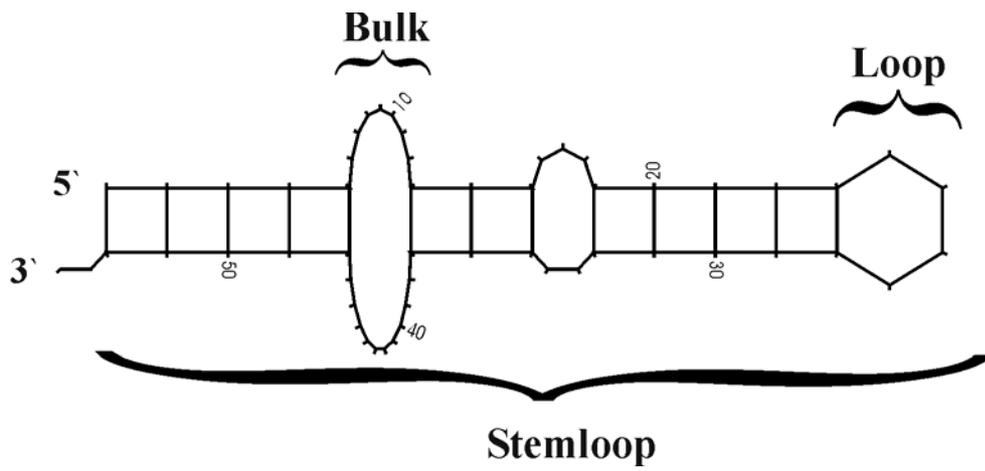


Abb. 3: Squiggles-Darstellung der Sekundärstruktur eines RNA-Strangs

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bislang gibt es keine Studie, welche die Rolle von Elementen in der 3'NTR von BVDV im Kontext eines replizierenden Virus untersucht. Anders als bei Verwendung des Replikon-Systems von BVDV bietet die Verwendung von replizierenden Viren die Möglichkeit, Einflüsse auf andere Schritte des viralen Lebenszyklus als die virale RNA- oder Proteinsynthese zu analysieren. In dieser Studie sollte erstmals eine Mutagenesestudie im Kontext eines vollständigen, infektiösen BVDV-Genoms durch Transfektion/Infektion von natürlichen Wirtszellen durchgeführt werden. Hierbei sollte die Bedeutung von Sequenz- und Strukturelementen in der 3'NTR für die virale RNA-Synthese, die virale Proteinsynthese, sowie für Wachstumskinetik und Plaquegröße analysiert werden. Die beiden letztgenannten Parameter sind nur durch eine Studie im Kontext eines replizierenden Virus erfassbar.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1. 1 Zellen

2.1.1.1 Eukaryotische Zellen

Die in dieser Studie verwendeten „Madin Darby Bovine Kidney“ (MDBK)-Zellen wurden von der American Type Culture Collection in Rockville, Md., USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.1.2 Prokaryotische Zellen

Für die Transformation und Vermehrung von DNA-Plasmiden verwendete Bakterien waren *E. coli*-Stämme „„Qiagen EZ““ (Fa. Qiagen), „Top Ten F“ (Fa. Invitrogen) und K12HB101.

2.1.2 Virusstämme

Der BVDV-1-Stamm CP7-5A wurde von PD Dr. P. Becher (JLU-Gießen) zur Verfügung gestellt (Becher et al., 2000).

2.1.3 Plasmide und cDNA-Gesamtklone

Um PCR-Produkte zu klonieren wurden das pCR2.1®-Plasmid (Fa. Invitrogen) und das p-Drive®- Plasmid (Fa. Qiagen) verwendet. In diesen ca. 3,9 kb langen Vektoren ist unter anderem ein Teil des LacZ-Genes (Lac Z') aus *E. coli* sowie ein Ampicillin-Resistenzgen enthalten. Beide Plasmide enthalten im sog. Polylinker multiple Restriktionsenzymstimmstellen zur gerichteten Klonierung sowie eine Stelle mit T-Überhängen zur TA-Klonierung (s.u.). Die Insertion von einem DNA-Fragment in den Polylinker unterbricht die Kontinuität des LacZ'-Genes. Diese Unterbrechung des LacZ'-Genes ermöglicht

nach Transfektion des Plasmides in kompetente Bakterien eine Blau/Weiß-Selektion von Bakterienklonen, welche ein Plasmid mit Insertion tragen. Zur Blau/Weiß-Färbung wurden Agarplatten verwendet, die mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) und Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG) bestrichen waren (Indikatoragarplatten).

Zur Klonierung von BVDV-cDNA Gesamtklonen sowie von Subklonen mit Insertion von mehr als 3,5 kb wurde der etwa 1,8 kb große Proteus-Plasmidvektor verwendet. Dieser wurde von Dr. R. J. Kuhn (Purdue University, West Lafayette, USA) bezogen (Kuhn et al., 1991).

Der infektiöse BVDV-Gesamtklon pCP7-388 wurde von PD Dr. Paul Becher und Michaela Ohrlich (beide Institut für Virologie, FB 10, JLU Gießen) erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Baroth et al., 2000, Becher et al., 2000).

2.1.4 Antiseren und Antikörper

2.1.4.1 Antiseren

Das polyklonale Rinderserum, das aus einer Infektion mit dem BVD-Virus CP7 stammt, wurde von Dr. Birgit Makoschey (Fa. Intervet, Boxmeer, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

2.1.4.2 Antikörper

Primärantikörper

Der mAK 8.12.7 (Code 4), der gegen das pestivirale Nichtstrukturprotein NS3 gerichtet ist aber auch mit nicht gespaltenem NS2-3 reagiert, wurde von Dr. E. J. Dubovi (Cornell University, Ithaca, USA) zur Verfügung gestellt (Corapi et al., 1990a).

Sekundärantikörper

Ziege anti-Rind, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Fa. Dianova)

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

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

2.1.5 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Die in den Tabellen 1 bis 4 aufgeführten Oligonukleotide (Primer) für Reverse Transkription (RT), PCR, gerichtete Mutation, Klonierung sowie DNA-Sequenzierung wurden von der Fa. MWG-Biotech hergestellt. Unterstrichene Nukleotide weichen von der parentalen Sequenz von pCP7-388 ab (Becher et al., 2000). Ein (*) markiert Stellen, an denen Deletionen mit dem Primer eingeführt wurden. In der Spalte Polarität (Pol.) wird die Polarität (+ oder -) der Primer in Bezug auf das pestivirale Genom angegeben.

Tab. 1: Primer zur gerichteten Mutagenese der 3`NTR

A: Reverse Primer zur gerichteten Muatgenese

| Primer | Nukleotidsequenz | Pol. |
|---------------|---|-------------|
| O13M3 | 5`-GTGGACGTCGGGTGTAC*ATACAGCTAAAGTGCTGT GTGC-3` | - |
| O13M5 | 5`-GTGGACGTCGGGTGTACCCTCATACAGCTAAAGT*TG TGCATTGAGTGTAGTGTTAG-3` | - |
| O13M9 | 5`-GTGGACGTCGGGTGTACCCTCATACAGCTAAAGTGC TGTGTGCATTGAGTG*GTTAGCTTGAGGTAGATAAC-3` | - |
| O13M10 | 5`-GTGGACGTCGGGTGTACCCTCATACAGCTAAAGTG CTGTGTGCATTGAGTGTAGTGTTAGCTTGA*GATAACTAT ATATCACTACTAATC-3` | - |
| O13M11 | 5`-GTGGACGTCGGGTGTACCCTCATACAGCTAAAGT GCTGTGTGCATTGAGTGTAGTGTTAGCTTGAGGTAGATA ACTAT*CACTACTAATCTCAACTA-3` | - |

| | | |
|-------------------------|---|---|
| O13-del SLI | 5`-GTAATATTGGCCGGCCCGGGCT*GCTAAAGTGCTG TGTGC-3` | - |
| O13-del SLII | 5`-GTGGACGTCGGGTGTACCCTCATAACAGCTAAAGTGC TGTGTGCA*CTAAATTTAAACATAATATATACAAATAC-3` | - |

B: Primer zur Quickchange-Mutagenese

| Primer | Nukleotidsequenz | Pol. |
|---------------|--|-------------|
| O13M1 | 5`-CGACGTCCACGGTTGG*GGGAAAACCCTTAACAGC-3` | + |
| O13M1R | 5`-GCTGTTAAGGGTTTTCCC*CCAACCGTGGACGTCG-3` | - |
| O13M2 | 5`-GGTACACCCGACGTCC*TTGGACTAGGGAAAACCC-3` | + |
| O13M2R | 5`-GGGTTTTCCCTAGTCCAA*GGACGTCGGGTGTACC-3` | - |
| O13M4 | 5`-CTCAATGCACACAGCAC*GCTGTATGAGGGTACAC-3` | + |
| O13M4R | 5`-GTGTACCCTCATAACAGC*GTGCTGTGTGCATTGAG-3` | - |
| O13M6 | 5`-GCTAACACTACACTCA*ACACAGCACTTTAGCT GTATG-3` | + |
| O13M6R | 5`-CATAACAGCTAAAGTGCTGTGT*TGAGTGTAGTGT TAGC-3` | - |
| O13M7 | 5`-GCTAACACTACACTCAAT*ACAGCACTTTAGCTG TATG-3` | + |
| O13M7R | 5`-CATAACAGCTAAAGTGCTGT*ATTGAGTGTAGTGT TAGC-3` | - |
| O13M8 | 5`-GCTAACACTACACTCAATGC*AGCACTTTAGCTG TATG-3` | + |
| O13M8R | 5`-CATAACAGCTAAAGTGCT*GCATTGAGTGTAGTGT TAGC-3` | - |
| O13M12 | 5`-GTATTTGTATATATTATGTTTAA*AGTTGAGATTAG TAGTGATA-3` | + |

| | | |
|------------------------------|---|---|
| O13M12R | 5`-TATCACTACTAATCTCAACT*TTAAACATAATAT ATACAAATAC-3` | - |
| O13M13 | 5`-GTATATAAATCTGTATTTGTATATA*GTTTAAATTT AGTTGAGATTAGTAG-3` | + |
| O13M13R | 5`-CTACTAATCTCAACTAAATTTAAAC*TATATACAAA TACAGATTTATATAC-3` | - |
| O13M14 | 5`-GTATGTATATATTGTATATAAAT*ATTTGTATATATTA TGTTTAAATTTAG-3` | + |
| O13M14R | 5`-CTAAATTTAAACATAATATATACAAAT*ATTTATATA CAATATATACATAC-3` | - |
| O13M15 | 5`-GAAATAATGTATGTATATATTGTA*AATCTGTATTTG TATATATTATG-3` | + |
| O13M15R | 5`-CATAATATATACAAATACAGATT*TACAATATATACA TACATTATTTC-3` | - |
| O13del SLIII-1 | 5`-CAGTTGAAATAATGT <u>ACCGGT</u> TATATTGTATATAAAT CTG-3` | + |
| O13del SLIII-1R | 5`-CAGATTTATATACAAATAT <u>ACCGGT</u> TACATTATTTCAA CTG-3` | - |
| O13del SLII-III | 5`-GTATATATTATGT <u>ACCGGTTT</u> AGTTGAGATTAGTAG- 3` | + |
| O13del SLII-III R | 5`-CTACTAATCTCAACTAA <u>ACCGGT</u> ACATAATATATAC- 3` | - |
| O13del SLIII-2 | 5`- CAAGCTAACACTACACT <u>ACCGGT</u> ACACAGCACTTTAG-3` | + |

| | | |
|----------------------------|--|---|
| O13del SLIII-2R | CTAAAGTGCTGTGT <u>ACCGG</u> TAGTGTAGTGTTAGCTTG-3' | - |
| O13del SLIIR1 | 5'-GTTTAAATTTAG* <u>CGCACACAGCACTTTAGC</u> -3' | + |
| O13del SLIIR1R | 5'-GCTAAAGTGCTGTGT <u>GCG</u> *CTAAATTTAAAC-3' | - |
| O13del SLIIR3 | 5'-GTTTAAATTTAT <u>T</u> *TGCACACAGCACTTTAGC-3' | + |
| O13del SLIIR3R | 5'-GCTAAAGTGCTGTGTGCA* <u>A</u> TAAATTTAAAC-3' | - |
| O13del SLIIR6 | 5'-GTTTAAATTTG <u>T</u> *TGCACACAGCACTTTAGC-3' | + |
| O13del SLIIR6R | 5'-GCTAAAGTGCTGTGTGCA* <u>ACA</u> AATTTAAAC-3' | - |
| O13M3R2 | 5'-CACTTTAGCTGTAG* <u>G</u> TACACCCGACGTC-3' | + |
| O13M3R2 R | 5'-GACGTCGGGTGTAC* <u>C</u> TACAGCTAAAGTG-3' | - |
| O13m3R5 | 5'-CACTTTAGCTGT <u>T</u> A* <u>TGT</u> ACCCGACGTC-3' | + |
| O13m3R5 R | 5'-GACGTCGGGT <u>A</u> CA* <u>T</u> AACAGCTAAAGTG-3' | - |

Tab. 2: Primer für die DNA-Sequenzierung

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

A:

| Primer | Nukleotidsequenz | Pol. |
|-------------------------------|------------------------------|-------------|
| OI-CP7 IRB1 (11700) | 5`-CACAGCAGCCAGAGACAACCTC-3` | + |
| P250 IR (250) | 5`-ATGCCA(CT)GTGGACGAGGCA-3` | + |
| 5.2IR (380) | 5`-ACTCCATGTGCCATGTACAG-3` | - |

B:

| Primer | Nukleotidsequenz | Pol. |
|----------------------|-----------------------------|-------------|
| M13 (221) | 5`-GTTTTCCCAGTCACGACGTTG-3` | + |
| M13 rev (447) | 5`-TTCACAGGAAACAGCTATGAC-3` | - |

2.1.6 Nährmedien

Als Lösungsmittel wurde, falls nicht anders angegeben, doppelt destilliertes H₂O aus der hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage (Fa. Millipore) verwendet. Die für die Kultivierung von Bakterien verwendeten Medien wurden nach Herstellung autoklaviert.

2.1.6.1 Zellkulturmedien

Für die Zellkulturarbeiten wurde ausschließlich „BFA 34“- Medium verwendet, das auf Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) basiert. Zur Herstellung wurden 9,6 g DMEM Fertigpulver (Fa. Gibco BRL) und 2,2 g NaHCO₃ in 1 l autoklaviertem Aqua bidest. gelöst und der pH auf 7,0 eingestellt. Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 10 % hitzeinaktiviertem (1h/56 °C) Pferdeserum oder fötalem Kälberserum sowie eine Antibiotikazugabe (0,04 g/l Penicillin und 0,07 g/l Streptomycin).

2.1.6.2 Bakterienkulturmedien

- LB-Medium: 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt ad 1 l H₂O, pH 7,5.
- LB(++)-Medium: LB-Medium inkl. MgCl₂ und MgSO₄.
- SOC-Medium: 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.
- LB-Plattenagar: 2 % g Agar-Agar in LB-Medium.
- Bakterienresuspensionspuffer: 60 mM CaCl₂, 10 mM Pipes, 15 % Glycerin, pH 7,1.

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

2.1.7 Lösungen und Puffer

Als Lösungsmittel diente, sofern nicht gesondert aufgeführt, Aqua bidest. Die Lösungen wurden, falls nicht abweichend angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt.

- 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol(AEC)-Lösung, eine AEC-Tablette in 2,5 ml Dimethylformamid, Lagerung bei 4 °C
- Acetatpuffer 50 mM Natriumacetat in Aqua bidest pH 5,0 (mit Salzsäure eingestellt)
- Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml Ampicillin, Lagerung bei -20 °C.
- Auftragspuffer für Agargelelektrophorese: 0,25 % Bromphenolblau, 0,1 % Orange G, 30 % Glycerin, H₂O ad 10 ml, Lagerung bei -20 °C.
- β-Mercaptoethanol: 0,5 M β-Mercaptoethanol, Lagerung bei -20 °C.
- BSA-Lösung: 1 % bovines Serumalbumin, 0,01 % NaN₃, Lagerung bei 4 °C .
- DNA-Größenmarker für Gelelektrophorese: 6 ml H₂O, 100 µl Tris/HCl (pH 7,5/0,5 M), 50 µl 0,1 M EDTA (pH 8,0), 125 µl 1 % Orange G, 50 µl

1 % Bromphenolblau, 400 µl Glycerin, 200 µl DNA-Leiter (1 kb, 1 µg/µl) (Fa. Invitrogen). Lagerung bei -20°C

- Ethanol (70 %): 70 ml Ethanol, 30 ml DNase-/RNase-freies Wasser, 4 °C.
- Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid, bei 4 °C, lichtgeschützt gelagert.
- Formaldehydlösung: 3,7 ml Formaldehyd, 100 ml PBS, Lagerung bei 4 °C.
- Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG) 100 mg/ml, Lagerung bei -20 °C
- „low melting“-Agarose (LMA): 1,5 g LMA auf 50 ml TAE-Puffer (1x), autoklaviert, Lagerung bei 4 °C.
- MgCl₂ / CaCl₂ Lösung (1x): 5 g MgCl₂ x 6 H₂O, 5 g CaCl₂ ad 500 ml H₂O, Lagerung bei 4 °C.
- Octyl-Glykosid-Lösung: 5 g 1-O-N-Octyl-β-D-Glukopyranosid ad 1 l PBS, Lagerung bei 4 °C.
- Orange G (0.25 %): 2,5 ml Orange G 1%, 3 ml Glycerin, 4,5 ml H₂O, Lagerung bei -20°C.
- PBS: PBS deficient, 0,1 g CaCl₂, 0,1 g MgCl₂ x 6 H₂O.
- PBS deficient: 0,25 g KCl, 1,8 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,25 g KH₂PO₄, 10 g NaCl, ad 1 l.
- PBS/Tween: 5 ml 10 % Tween-20 (gelöst in PBS 1x) ad 1 l PBS, 4 °C.
- PBS/BSA: 1 g BSA (Fraktion V), 1 ml NaN₃ 10 % (gelöst in PBS) ad 100 ml PBS, Lagerung bei 4°C.
- Penicillin/Streptomycin (500 x): 5 x 10⁴ IU/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat, Lagerung bei -20 °C.
- Phenol mit 0,1 % Hydroxychinolin, Lagerung bei 4 °C.
- Restriktionsenzym- und DNA-Ligationspuffer: von den Firmen Invitrogen, NEB, Promega, Fermentas und Takara direkt bezogen, Lagerung bei 4 °C oder -20 °C.

- RNase freies H₂O: Fa. Qiagen und Roth, Lagerung bei 4 °C oder –20 °C.
- SDS-Lösung: 10 % Natriumdodecylsulfat.
- TAE-Gelelektrophoresepuffer (50x): 2 M Tris, 0,25 M Na-Acetat, 0,05 M EDTA-Na₂ x 2 H₂O, mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt, autoklaviert.
- Trypanblau-Färbelösung: 0,25 % Trypanblau, 0,15 M NaCl, Lagerung bei 4 °C.
- Trypsinlösung: 2,5 g Trypsin (1:300), 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄ x 2 H₂O, 1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,23 g Na₂EDTA, 0,016 g Phenolrot, ad 1 l, Lagerung bei 4 °C.
- Tween-20 (10 %-Stammlösung): 10 ml Tween, 90 ml PBS, Lagerung bei 4 °C.
- X-Gal-Lösung: 40 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid in DMF, Lagerung bei -20 °C.
- Lösungen für die Plasmid-DNA-Midi-Präparation (nach Angaben der Fa. Macherey-Nagel):
 - P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA-Na₂ x 2 H₂O, pH 8,0, autoklaviert, 40 mg/ml RNase A, Lagerung bei 4 °C.
 - P2: 200 mM NaOH, 1 % SDS.
 - P3: 2,8 M K-Acetat, pH 5,1 (mit Eisessig eingestellt), Lagerung bei 4 °C.
 - N2: 0,1 M Tris, 15 % Ethanol, 0,9 M KCl, pH 6,3 (mit Phosphorsäure eingestellt)
 - N3: wie N2, aber 1,15 M KCl.
 - N5: wie N2, aber 1 M KCl und pH 8,5.
- Lösungen für die Plasmid-DNA-Mini-Präparation:
 - L1: 10 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 5 ml 0,1 M EDTA-Na₂ x 2 H₂O (pH 8,0), 400 µg/ml RNase A, ad 50 ml, Lagerung bei 4 °C.

- L2: 200 mM NaOH, 1 % SDS.
 - L3: 3 M K-Acetat, pH 5,75 (mit Eisessig eingestellt).
- Puffer für die Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion:
 - RT Puffer A (2,5x): 125 mM Tris (pH 8,3), 187,5 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂, 25 mM DTT, 1,25 mM dNTPs, Lagerung bei -20 °C.
 - PCR-Puffer B (5x): 25 mM Tris (pH 8,3), 100 mM KCl, 6,5 mM MgCl₂, 1,25 mM dNTPs, 0,5 % Triton x 100, 0,1 % BSA, Lagerung bei -20 °C.
- Lösungen für Sequenzgele:
 - Ammoniumperoxidisulfat (APS): 10 % Ammoniumperoxidisulfat, Lagerung bei -20 °C.
 - TBE-Puffer „long run“ (10x): 60,05 g Tris, 30,91 g Borsäure, 7,44 g EDTA-Na₂, ad 1 l, pH 8,0.
 - 4 % Polyacrylamidlösung: 25,6 ml Ultra pure Sequagel XR, 6,4 ml Ultra pure Sequagel complete Puffer, 6,4 g Urea, 1,6 ml 10 x TBE-Puffer, 12 ml H₂O, 16 µl TEMED, 320 µl 10 % APS.
- Lösungen für RNA-Gele und „Northern Blot“:
 - RNA-Gelpuffer A: 0,2 M NaH₂PO₄ x 2 H₂O, autoklaviert.
 - RNA-Gelpuffer B: 0,2 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O, autoklaviert.
 - RNA-Gelpuffer (10x): 125 ml A, 122,5 ml B, auf 500 ml.
 - SSC (20x): 175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat, ad 1 l, mit HCl auf pH 7,0, autoklaviert.
 - Hybridisierlösung: 7 % SDS, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA-Na, pH 7,2 (mit NaOH eingestellt).
 - 5 % Waschlösung: wie Hybridisierlösung, aber 5 % SDS.
 - 1 % Waschlösung: wie Hybridisierlösung, aber 1 % SDS.

- TES: 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS.
- Gele und Puffer für Proteingele nach Jagow:
 - SDS-Lysispuffer: 2 % SDS, 6 M Urea, 10 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol, auf 100 ml, Lagerung bei 4 °C.
 - Anodenpuffer (10x): 0,2 M Tris, pH 8,9.
 - Kathodenpuffer (10x): 1 M Tris, 1 M Tricin, 1 % SDS, pH 8,25.
 - Gelpuffer: 3 M Tris, 0,3 % SDS, pH 8,45 (mit HCl eingestellt).
 - Sammelgel (4 %): 1 ml Acrylamid, 2,5 ml Gelpuffer, 6,4 ml H₂O, 80 μ l 10 % APS, 10 μ l TEMED.
 - Trenngel (8 %): 2 ml Acrylamid, 3,3 ml Gelpuffer, 4,1 ml H₂O, 50 μ l 10 % APS, 5 μ l TEMED, 500 μ l Glycerin 5,5 %.

2.1.8 Radioaktiv markierte Substanz

Es wurde ($\alpha^{32}\text{P}$)-dCTP (3000 Ci/mmol) (Fa. Amersham) verwendet.

2.1.9 Enzyme

Tab. 3: Enzyme

| Enzym | Firma |
|--|--|
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase | Fa. Promega |
| Restriktionsendonukleasen | Fa. New England Biolabs (NEB), Boehringer, Gibco BRL, Pharmacia, Promega, Stratagene, Takara |
| Reverse Transkriptase Superscript TM II | Fa. Invitrogen |
| RNase A | Fa. Serva |
| RNase-Inhibitor | Fa. Takara |
| SP6-RNA-Polymerase | Fa. Takara |
| T4-DNA-Ligase | Fa. NEB |

| | |
|--------------------|------------|
| Taq-DNA-Polymerase | Fa. NEB |
| Trypsin | Fa. Sigma |
| Turbo-DNaseI | Fa. Ambion |

2.1.10 Chemikalien

Tab.4: Chemikalien

| <i>Chemikalie</i> | Hersteller |
|---|-------------------------|
| 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol(AEC) | Fa. Sigma |
| Acrylamid | Fa. Biozym |
| Agar-Agar | Fa. Difco |
| Agarose für Gelelektrophorese, auch „low melting“ | Fa. Gibco-BRL |
| Ammoniumperoxydisulfat (APS) | Fa. Merck |
| Ampicillin | Fa. Serva |
| Bacto-Hefeextrakt | Fa. Difco |
| Bacto-Trypton | Fa. Difco |
| Bromphenolblau | Fa. Sigma |
| BSA | Fa. Gibco BRL |
| Chloroform | Fa. Roth |
| DNTPs und rNTPs | Fa. Boehringer Mannheim |
| Ethanol | Fa. Merck |
| Ethidiumbromid | Fa. Boehringer Mannheim |
| Formaldehyd (37%) | Fa. Merck |
| Glycerin (87%) | Fa. Merck |
| Glyoxal (40%) | Fa. Fluka |
| Guanidinthiocyanat | Fa. Roth |
| Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid | Fa. Sigma |
| Isopropanol | Fa. Merck |
| β-Mercaptoethanol | Fa. Invitrogen |
| Natriumazid (NaN ₃) | Fa. Serva |

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

2.1.11 Vorgefertigte Systeme („Kits“)

Tab. 5: Vorgefertigte Systeme

| | |
|---|--------------------|
| „A-addition“-Kit | Fa. Qiagen |
| Cdna-Klonierungskit „PCR-cloning ^{plus} “ | Fa. Qiagen |
| DNA-Agarosegeleextraktionskit „QUIAEX Gel Extraction Kit“ mit QIAEX [®] II | Fa. Qiagen |
| DNA-Plasmidpräparationskit Midiprep | Fa. Macherey-Nagel |
| DNA-Sequenzierungskit „ThermoSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“ | Fa. Amersham |
| „Nick“-Translationskit | Fa. Amersham |
| RNA-Extraktionskit „RNeasy [®] “ | Fa. Qiagen |
| SP6-RNA-Transkriptionskit | Fa. Takara |
| „Western Blot“-Kit Renaissance | Fa. NEN |

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|------------------------------|
| Einmaldispensionspipetten 5 ml | Fa. Eppendorf |
| Filterpapier | Fa. Whatman |
| Gewebekulturschalen (Ø 10 cm), Mikrotiterplatten (6-, 24-, 96-Loch), Petrischalen, Plastikröhrchen (4, 12, 15, 50 ml) | Fa. Falcon |
| DNA-Längenstandard | Fa. Gibco BRL |
| Elektroporationsküvetten | Fa. Molecular Bioproducts |
| Homogenisatorsäulchen „Quiashredder™“ | Fa. Qiagen |
| Latexhandschuhe (Rotiprotector®) | Fa. Roth |
| Nitrilhandschuhe (Rotiprotect®-Nitril) | Fa. Roth |
| Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83 | Fa. Schleicher & Schüll |
| Nylonmembran Duralon-UV | Fa. Stratagene |
| Mikroreaktionsgefäße (0,2; 1,5; 2,0 ml) | Fa. Biozym, Fa. Eppendorf |
| Paraffinkügelchen | Fa. Paraplast Monoject |
| Pipettenspitzen (0,1-10, 2-20, 10-200, 200-1000 µl) | Fa. Biozym |
| Röntgenfilm Biomax MR-1 | Fa. Kodak |
| Säulen für Midipreps (AX-100) | Fa. Macherey-Nagel |
| Spritzenfilter, Luer-Lock, 0,45 µm | Fa. Fisher Scientific |

2.1.13 Geräte

Tab. 7: Geräte

| | |
|---|---------------|
| Analysenwaage 3716 MP | Fa. Sartorius |
| Bakterienschüttler und –inkubator IH 50 | Fa. Noctua |
| DNA-Sequenzierautomat (Modell 4000L), Zubehör | Fa. Licor |

| | |
|--|---|
| Elektroporationsgerät Gene Pulser II | Fa. Biorad |
| Filmentwickler Curix 60 | Fa. Agfa |
| Fluoreszenzmikroskop HBO 50 mit F-View Imaging System | Fa. Zeiss |
| Fuchs-Rosenthal-Zählkammer | Fa. Brand |
| Glasgeräte | Fa. Schott |
| Gefrierschränke (-20 °C und -70 °C) | Fa. Liebherr |
| Geldokumentationssystem | Fa. MWG Biotech |
| Gelelektrophoreseapparaturen | Werkstatt des Instituts für Virologie, JLU Gießen |
| Hybridisierschrank 400 HY | Fa. Bachofer |
| Kühlbad RM6 | Fa. Lauda |
| Kühlschrank (4 °C) | Fa. Liebherr |
| Lichtmikroskop Diavert | Fa. Leitz |
| Magnetrührer IKAMAG REO | Fa. IKA |
| Messgerät für Radioaktivität LB 1210 B | Fa. Berthold |
| Minishaker VIBRAX-VXR | Fa. IKA |
| Mikropipetten (0,1-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl) | Fa. Gilson |
| Multikanalpipette | Fa. Micronic |
| Photometer (GeneQuant II) | Fa. Pharmacia Biotech |
| pH-Meter | Fa. Knick |
| Spannungsquellen P25, EPS 600 | Fa. Biometra, Fa. Pharmacia |
| Sterile Werkbank Clean Air CA/RE 6 | Fa. Haan |
| Thermocycler PROGENE | Fa. Techne |
| Thermomixer 5436 | Fa. Eppendorf |
| Thermocrosslinker Mini Oven | Fa. Hybaid |

| | |
|--|---|
| Transferapparatur für „Western Blot“ Trans-Blot SD semidry | Fa. Biorad |
| UV-Transilluminator 254, 312 nm | Fa. Bachofer |
| UV-Crosslinker Stratalinker 1200 | Fa. Stratagene |
| Vortexer MS1 | Fa. IKA |
| Wärmebank | Fa. Steute |
| Wasserbad 37 °C WB 10 | Werkstatt des Instituts für Virologie, JLU Gießen |
| Zellkulturbrutschrank Sterikult 200 Inkubator | Fa. Forma Scientific |
| Zellkulturbrutschrank C200 | Fa. Labotect |

2.1.13.1 Zentrifugen

Tab. 8: Zentrifugen

| | |
|-----------------------------------|---------------|
| Tischzentrifuge Biofuge fresco | Fa. Heraeus |
| Tischzentrifuge Biofuge pico | Fa. Heraeus |
| Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C | Fa. Eppendorf |
| Zentrifuge Labofuge 400 R | Fa. Heraeus |
| Zentrifuge Minifuge 2 | Fa. Heraeus |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Die MDBK-Zellen wurden auf Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ sowie 90% absoluter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurden das Medium (10 ml) abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml bei 37 °C erwärmtem Trypsin gewaschen, welches zügig wieder abgenommen wurde. Die Zellkulturschalen wurden nun bei 37 °C im Brutschrank für einige Minuten inkubiert. Nach Entnahme aus dem Brutschrank wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen von der

Gewebekulturschale abgelöst, in Medium aufgenommen und nach Resuspension in geeigneten Verdünnungen auf neue Zellkulturgefäße verteilt. Das Medium wurde zwischen den Passagen nicht gewechselt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Gesamtzahl an lebenden Zellen zu ermitteln, wurde ein entsprechender Zellkulturrasen einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm wie beschrieben in Medium resuspendiert und in 10-20 ml Medium je Zellschale aufgenommen. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde anschließend mit Trypanblau 1:10 verdünnt und die Anzahl blau gefärbter, lebender Zellen als arithmetischer Mittelwert aus vier großen Quadraten einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt. Die Berechnung der Anzahl lebender Zellen/ml Zellsuspension erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times 16 \times 0,31 \times 10000 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

2.2.1.3 Virusinfektion von Zellen

Nachdem von nicht infizierten Zellen der Zellkulturüberstand abgenommen wurde, wurden die Zellen durch eine einstündige Inkubation im Zellkulturschrank mit virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert. Hiernach wurde der virushaltige Überstand durch neues Medium ersetzt und der jeweilige Ansatz 24-48 h inkubiert. Hierdurch gewonnene infektiöse Zellkulturüberstände wurden bis zu 48 h bei 4 °C oder bei -70 °C gelagert und erst direkt vor Durchführung einer weiteren Infektion aufgetaut. Zum Teil wurden infizierte Zellen 24 h p.i. nochmals passagiert, da so eine höhere Virusausbeute zu erreichen war (Becher, persönliche Mitteilung).

2.2.1.4 Transfektion von Zellen mit synthetischer RNA

Einen Tag vor der Transfektion wurden Zellen auf Zellkulturschalen (Ø 10cm) in geeigneter Verdünnung ausgesät, so dass deren Boden bei

lichtmikroskopischer Kontrolle am Tag der Transfektion zu 80-90 % bewachsen war (subkonfluent). Für jeden Transfektionsansatz wurden dann die Zellen einer subkonfluenten 10cm-Schale durch Zugabe von Trypsin abgelöst, in PBS deficient aufgenommen und durch Zentrifugation pelletiert (Labofuge 400 R, 2000 Upm, 4 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstands wurde erneut PBS deficient zugegeben. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Pelletierung wurden die Zellen in 400 µl PBS deficient je Zellansatz aufgenommen, mit dem jeweiligen verwendeten *in vitro* Transkript vermischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 180 V und 950 µF. Die transfizierten Zellen mit 1,6 ml Medium aus der Küvette herausgespült und auf „6-well“-Zellkulturschalen ausgesät; eventuell wurde bei diesem Schritt ein Aliquot (100 µl) der Zellsuspension zur Anfertigung von Plaqueassays entnommen. Nach einer Inkubation von 3 h im Zellkulturbrutschrank, in der sich lebende Zellen abgesetzt hatten und am Boden der Zellkulturschale adhärirten, wurde der Zelltrümmer enthaltende Überstand abgenommen, durch frisches Medium ersetzt und die Ansätze weitere 1-3 Tage inkubiert.

2.2.1.5 Plaquereinigung

MDBK-Zellen wurden auf konfluent bewachsenen „6-well“-Gewegekulturschalen mit BVD-Virusüberstand in fortlaufender Verdünnung (1:10) infiziert. Der virushaltige Überstand wurde entfernt, und die Vertiefungen der Gewegekulturschale mit 0,6 % „low melting“-Agarose enthaltendem Medium überschichtet. Nach Kühlung zum Erhärten der Agarose bei 4 °C wurden die Gewegekulturschalen im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach dem Auftreten eines zytopathischen Effekts wurde Material von Plaques, die vereinzelt in den jeweils höheren Verdünnungsstufen aufgetreten waren, mit gestopften Eppendorfspitzen angesaugt und durch mehrstündiges Schütteln in jeweils 1 ml frischem Medium bei 4 °C in Lösung gebracht. Nach Infektion von

nicht infizierten Zellen mit dem so erhaltenen infektiösen Material wurde die Plaquereinigung dreimal wiederholt, um ein biologisch kloniertes Virus zu erhalten.

2.2.1.6 Virustitration

Es erfolgte eine Endpunkttitration auf „96-well“-Platten, in die zunächst je Vertiefung 100 µl Medium vorgelegt wurden. Je Reihe mit 12 Vertiefungen wurden in die erste Vertiefung einer Reihe 50 µl gegebenenfalls 1:10 oder 1:100 vorverdünnte Virussuspension gegeben und mit einer Mehrkanalpipette fortlaufend und unter Spitzenwechsel 1:3 verdünnt. Für jeden zu titrierenden Virusüberstand wurde die Titration in 4 Replikaten durchgeführt. Danach wurden je Vertiefung $2,5 \times 10^4$ MDBK-Zellen in einem Volumen von je 100 µl hinzugegeben und entsprechende Ansätze für 3-4 Tage im Zellbrutschrank inkubiert. Es erfolgte eine Auswertung über die Auszählung der Vertiefungen, in denen ein zpE aufgetreten war; aus den Werten der vier Replikate wurde der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) gebildet. Die Titer an infektiösem Virus, angegeben als TCID₅₀/ml, wobei die „tissue culture infective dose 50“ (TCID₅₀) der Dosis an Virus entspricht, bei der 50% der Gewebekulturzellen infiziert werden, wurden nach folgender Formel berechnet:

$$TCID_{50}/ml = 3^{(\bar{x} + 0,5)} \times 10 \times \text{Vorverd\u00fcnnung}$$

2.2.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von viralem Antigen

Die indirekte Immunfluoreszenz (IF) wurde zum Nachweis der Infektion von Zellen mit Pestiviren durchgeführt. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand einer infizierten „6-well“-Gewebekulturschale abgenommen, der Zellrasen einmal durch Zugabe von PBS gewaschen und anschließend mit 3,7 % Formaldehyd für mindestens eine halbe Stunde bei 4 °C auf dem Boden der Gewebekulturschale fixiert. Nach Absaugen des Formaldehyds wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung der

Zellmembran mit dem Detergens Octylglykosid behandelt. Dazu wurden 750 µl Octylglykosid in eine Vertiefung einer „6-well“-Gewebekulturschale für 5-10 Minuten zugegeben, und hiernach der Zellrasen mit PBS/Tween gewaschen. Die Zellen wurden schließlich für 2 h mit 750 µl einer verdünnten Antikörperlösung pro Vertiefung inkubiert. Die Antikörperstammlösung von AK 8.12.7 wurde zuvor 1:10 in PBS/BSA verdünnt. Nach mindestens zweistündiger Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde die Antikörperlösung entfernt, die Zellen drei Mal mit PBS/Tween gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper, einem 1:1000 verdünntem Ziege anti-Maus IgG (Cy3-konjugiert), in einer Menge von 750 µl pro Vertiefung für eine Stunde im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Die Zellen zeigten im Falle einer Infektion mit Pestiviren unter dem Fluoreszenzmikroskop eine zytoplasmatische, rötliche Fluoreszenz.

2.2.1.8 Indirekte Immunperoxidasefärbung zum Nachweis von viralem Antigen

Für die indirekte Immunperoxidasefärbung wurden MDBK-Zellen auf „6-well“-Gewebekulturschalen ausgesät und mit BVD-Virus in konsekutiven 1:10 Verdünnungen infiziert. Nach einer Stunde wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 0,6 % „low melting“-Agarose enthaltendem Medium überschichtet und für 6 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml/well von 2% Paraformaldehydlösung für mindestens eine halbe Stunde bei 4 °C fixiert. Nach Entfernung des Agars wurde der fixierte Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Nachweis der BVDV-Infektion wurde ein polyklonales Rinderserum in einer Verdünnung von 1:150 eingesetzt, welches aus einem mit BVDV CP7 immunisiertem Rind stammt. 750 µl der verdünnten Antiserumlösung wurden pro Vertiefung einer „6-well“-Gewebekulturschale zugegeben. Die mit dem verdünnten Serum versetzten Zellen wurden für

mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit einem peroxidasegekoppeltem Ziegenanti-Rind-Antikörper für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert, welcher in einer Verdünnung von 1:300 in PBS/Tween eingesetzt wurde. Von dem verdünnten Sekundärantikörper wurden ebenfalls 750 µl pro Vertiefung einer „6-well“-Gewegekulturschale verwendet. Nach Inkubation wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen.

Zur Peroxidasefärbung wurde 50mM Acetatpuffer mit 5% AEC Lösung versetzt und als Substrat 1µl/ml 30% H₂O₂ zugesetzt. Für eine Vertiefung einer „6-well“-Gewegekulturschale wurden 750 µl Substratlösung eingesetzt. Diese verblieb für einige Minuten auf dem Zellrasen bis die gewünschte Färbungsintensität eingetreten war. Nach Absaugen der Färbelösung wurde die Reaktion durch Spülen mit Aqua bidest gestoppt, anschließend wurden die gefärbten Zellen bei Raumtemperatur getrocknet. Im Falle einer BVDV-Infektion zeigten die Zellen eine rostrote Färbung.

2.2.1.9 Wachstumskurve

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden 1,0-1,5x10⁶ nicht infizierte, 3 h zuvor ausgesäte MDBK-Zellen nach dem Anwachsen in einer „6-well“-Zellkulturschalenvertiefung mit infektiösem Überstand bei einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 0,1 oder 1 infiziert. Pro Virusisolat wurden zwei Vertiefungen einer „6-well“-Zellkulturschale infiziert. Nach einer Inkubationsphase von 1 h bei 37 °C wurden die Zellen fünfmal sorgfältig mit PBS gewaschen, um nicht adsorbiertes Virus zu entfernen, und anschließend mit 2 ml frischem Medium je Vertiefung für 72 h im Zellbrutschrank inkubiert. Nach 0, 12, 24, 36, 48, und 72 h wurden jeweils 225 µl Überstand pro Vertiefung entnommen und durch 225 µl neues Medium ersetzt. Die Überstände aus beiden pro Virusisolat eingesetzten Vertiefungen wurde gepoolt. Zur Bestimmung der TCID₅₀/ml der Virusisolate zu den jeweiligen Zeitpunkten p.i.

wurden die bei 4 °C asservierten Zellkulturüberstände einer Virustitration unterzogen (s.o.).

2.2.1.10 Bestimmung der spezifischen Infektiosität von synthetischen RNA Transkripten

Für CP7-388, NCP-393 und den in dieser Arbeit beschriebenen Virusmutanten wurde die spezifische Infektiosität (angegeben in „plaque forming units“ (PFU)/ μg Transkript-RNA) der transkribierten RNA bestimmt. Hierzu wurde direkt nach der Transfektion 1/40 der transfizierten Zellen fortlaufend auf einer „6-well“-Platte 1 zu 10 verdünnt. Zu den transfizierten Zellen wurden pro Vertiefung $1,5 \times 10^6$ nicht infizierte MDBK-Zellen hinzugegeben. Nach 2-3 Stunden war der größte Teil der Zellen am Boden der Platte adhärent, und das Zellkulturmedium wurde durch Zellkulturmedium mit 0,6 % „low-melting“-Agarose ersetzt. Nach Erstarren der Agarose bei 4 °C wurden die Plaque-Assays für 6 Tage im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Danach wurde die Anzahl der Plaques aus einer Verdünnungsstufe ausgezählt, in welcher ca. 10-100 überwiegend einzeln liegende Plaques vorlagen. Ein Aliquot des *in vitro* Transkriptes wurde einem DNase-Verdau (s.u) unterzogen. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die Konzentration des RNA-Transkriptes photometrisch bestimmt. Die Berechnung der spezifischen Infektiosität erfolgte nach der Formel:

$$\text{Anzahl der Plaques in Verdünnungsstufe A} \times \text{Verdünnungsstufe A} \times 40 / \mu\text{g transfizierte RNA} = \text{PFU}/\mu\text{g}$$

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien

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

2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Kompetenz von Bakterienzellen ist als die Fähigkeit, Fremd-DNA direkt durch die Zellwand aufzunehmen, definiert. *E. coli* sind natürlicherweise im Gegensatz zu beispielsweise *Bacillus sp.* kaum kompetent. Um *E. coli*-Bakterien für Plasmid-DNA empfänglich zu machen, wurden die CaCl_2 -Methode verwendet. Hierzu wurden 3 ml LB(++)-Medium mit einer Bakterienkolonie von *E. coli* HB101 beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Bakterienkultur wurde am nächsten Tag 1 ml entnommen, der zum Animpfen von 100 ml frischem LB(++)-Medium verwendet wurde. Dieser Ansatz wurde wieder bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und in regelmäßigen Abständen einer photometrischen Dichtebestimmung unterzogen. Die Bakterien wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD (optischen Dichte)₆₀₀ von 0,6 durch Zentrifugation pelletiert (Labofuge 400 R ,3000 Upm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde dann in 25 ml eiskaltem Bakterienresuspensionspuffer resuspendiert und 40 min auf Eis gelagert, wobei die Suspension alle 10 min vorsichtig geschwenkt wurde. Danach wurden die Bakterien erneut pelletiert und in 5 ml Puffer resuspendiert. Die transformationskompetenten Bakterien wurden in Aliquots von 50 µl schockgefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Herstellung kompetenter *E. coli* „Top Ten“ wurde anstelle des LB(++)-Mediums SOC-Medium verwendet, ansonsten wurde in gleicher Weise wie bei HB101-Bakterien verfahren.

2.2.2.3 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Transformation wurde der entsprechende Ligationsansatz bzw. ca. 50-100 ng Plasmid-DNA) zu einem Aliquot zuvor frisch aufgetauter, kompetenter *E. coli* HB101 gegeben und vorsichtig vermischt. Während einer 30 min dauernden Inkubationsphase auf Eis wurden die Bakterien alle 10 min vorsichtig

aufgeschüttelt. Nach Durchführung eines kurzzeitigen Hitzeschocks (90 s bei 42 °C) wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gekühlt, erneut vorsichtig geschüttelt und es wurde ihnen 200 µl LB(++)-Medium zugesetzt. Hierauf folgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h im Schüttler, anschließend wurde ein Aliquot des Ansatzes auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausplattiert und über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach der identisch verlaufenden Transformation von *E. coli* „Top Ten“ oder „Qiagen EZ“, wobei letztere vor der Transformation nur 5 min auf Eis inkubiert wurden, wurde 200 µl SOC-Medium je Ansatz hinzugegeben. Die *E. coli* „Qiagen EZ“ konnten direkt nach Zugabe des Mediums ohne vorherige Inkubation bei 37 °C ausplattiert werden. Zur Blau/Weiss-Selektion von insertionstragende Plasmide enthaltenden Bakterienkolonien wurden die LB-Ampicillin-Agarplatten vor dem Ausplattieren der Bakteriensuspension mit 40 µl X-Gal und 10 µl IPTG bestrichen.

2.2.2.4 Kleine Plasmidpräparation (Mini-Präp)

Die Vorteile der Mini-Präp liegen in der Möglichkeit, relativ einfach eine größere Anzahl von Klonen transformierter Bakterien zu vermehren und das in ihnen enthaltene rekombinante Plasmid in kurzer Zeit zu gewinnen. Die Nachteile liegen in den relativ geringen Mengen an gewonnener Plasmid-DNA und am höheren Salzanteil im Vergleich zu der aus der Midi-Präparation gewonnenen DNA, welcher etwaige konsekutive Experimente erschweren kann (z. B.: Nucleinsäuresequenzierung). Bei der Mini-Präparation wurde ein Reagenzglas mit 4.5 ml LB-Ampicillin-Nährlösung mit einer Bakterienkolonie beimpft. Die beimpften Reagenzgläser wurden unter Schütteln im Bakterienbrutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von jedem Ansatz wurden jeweils 2 ml der Bakteriensuspension in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und die enthaltenen Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000 Upm 10-12 min bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt

wurde mit weiteren 2 ml der jeweiligen Bakteriensuspension wiederholt. Es wurden je Ansatz 200 µl L1 (Resuspensionspuffer) zugefügt und die Eppendorfgefäße zum Resuspendieren der Bakterienpellets für einige Minuten bei Raumtemperatur in den Schüttler gestellt. Danach wurden erst je 200 µl L2 (alkalischer Lysepuffer) und sofort danach je 200 µl L3 (Neutralisieren und Proteinfällung) hinzugegeben, die Gefäße verschlossen, geschwenkt und für 5-10 min auf Eis gestellt. In einer vorgekühlten Zentrifuge wurde bei 4 °C, 13000 U/min für 20-30 min das ausgefällte Protein abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt und die enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 400 µl Isopropanol ausgefällt. Zum Pelletieren der ausgefällten Plasmid-DNA wurde eine Zentrifugation von mindestens 30 min bei 4 °C durchgeführt und der Überstand dekantiert. Das verbleibende Pellet wurde durch Zugabe von je 200 µl 70 % Ethanol ohne Resuspendieren gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5-10 min bei 4 °C und erneute Abnahme des Überstands. Das Pellet wurde nach kurzer Lufttrocknung bei Raumtemperatur dann in 50 µl Aqua bidest aufgelöst.

2.2.2.5 Mittlere Plasmidpräparation (Midi-Präp)

Im Gegensatz zur Mini-Präp kann bei der Midi-Präparation eine größere Plasmid-DNA-Menge von höherer Reinheit gewonnen werden. Zeit- und Materialaufwand sind jedoch im Vergleich zur Mini-Präp größer. Bei der Midi-Präparation wurde eine Pipettenspitze mit einer Bakterienkolonie bestrichen und mit dieser 80-200 ml LB-Ampicillin-Nährlösung in einer 500 ml Schottflasche beimpft. Die angeimpfte Kultur wurde im Schüttler im Bakterienbrutschrank 15 h (pDrvie-, pCR2.1-Plasmide) oder 24 h (Proteus-Vektor) bei 37 °C inkubiert. Von jedem Ansatz wurden je 50 ml der Bakteriensuspension in ein 50 ml Plastikgefäß gegeben, bei 4500 Upm 10-15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die gesamte Bakteriensuspension abzentrifugiert war. Die Bakterienpellets wurden in 4 ml

eiskaltem P1 resuspendiert. Es wurde dieselbe Menge P2 zur alkalischen Lyse hinzugefügt, vorsichtig geschüttelt und gewartet bis sich die Lösung etwas aufklarte. Zur Proteinfällung und Neutralisation wurden nun 4 ml P3 hinzugefügt und wieder vorsichtig geschüttelt. Bei Midipräparationen aus HB101-Bakterien wurde, gemäß Empfehlung der Firma Macherey-Nagel, jeweils die doppelte Menge der oben aufgeführten Puffer verwendet. Die Probe wurde anschließend für 5-10 min auf Eis gestellt und danach bei 4500 Upm, 30 min und 4 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Nucleobond AX-100-Säule je Midipräp mit 2,5 ml Lösung N2 äquilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde auf je eine Säule gegossen. Bei Plasmidpräparationen aus HB101-Bakterien wurde dieser Vorgang zweimal durchgeführt, um möglichst viel DNA an die Säulenmatrix zu binden. Danach wurde zweimal mit je 5 ml N3 gewaschen. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 4 ml N5 in ein 15 ml Plastikröhrchen eluiert. Die DNA der Elutionslösung wurde nach Hinzufügen von 2,8 ml Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Darauf folgte eine Pelletierung der DNA bei 13000 U/min, 30 min und 4 °C in einer vorgekühlten Zentrifuge. Nach Verwerfen der Überstände wurden die DNA-Pellets durch Zugabe von je 200 µl 70 % Ethanol und anschließende Zentrifugation bei 13000 Upm, 4 °C für 5-10 min gewaschen. Danach wurden Überstände abgenommen und die Nukleinsäurepellets in 60-100 µl Aqua bidest resuspendiert.

2.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken

2.2.3.1 Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanol-fällung

Um in den Ansätzen von zur Transkription linearisierter cDNA oder synthetischen RNA-Transkripten nach DNaseI-Verdau enthaltenen Enzyme und Oligonukleotide zu entfernen, wurde eine Phenol-/Chloroformreinigung durchgeführt. Mit Aqua bidest wurde die Probe auf ein Volumen von 400 µl verdünnt, mit ebenfalls 400 µl Phenol unter dem Abzug überschichtet und nach

kurzem Schütteln zentrifugiert (5-10 min bei 13000 Upm, Rt). Von der Probe wurde nun die obere Phase vorsichtig abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Phenolreste aus der unteren Phase in die Ansätze geraten, und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. In dieses wurde nun 400 µl Chloroform gegeben, der Ansatz geschüttelt und wieder zentrifugiert. Die obere Phase wurde abermals vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 40 µl 3 M KCl und 1 ml 100 % Ethanol vermischt und über Nacht zum Ausfällen der Nukleinsäure bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Probe 1 h bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Nukleinsäurepellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und für 5-10 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Trocknung in 5 µl aqua bidest pro µg gefällter Nukleinsäure gelöst. Um die Reinheit und die Quantität der gereinigten Nukleinsäure beurteilen zu können, wurde anschließend mit einem Aliquot eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Ein Aliquot der zu untersuchenden Nukleinsäurelösung wurde 1:50 oder 1:100 in einem Volumen von 100 µl verdünnt. Das zur Verdünnung verwendete Wasser diente als Leerwert bei der photometrischen Messung. Die ermittelten Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm sollten zwischen 0,1 und 0,8 liegen, um möglichst im linearen Messbereich des Gerätes zu arbeiten. Um die Nukleinsäurekonzentration der Ursprungslösung in µg/µl zu errechnen, wurden die Extinktionswerte mit dem Verdünnungsgrad und bei dsDNA mit 0.05 oder bei ssRNA mit 0.04 multipliziert.

2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung, Identifizierung, quantitativen Abschätzung und Reinigung von Nukleinsäuren verwendet. Dazu

wurden im Allgemeinen 1 %ige Agarosegele verwendet, für Fragmente unter 500 Basen wurden 1,5 %-2 % Agarosegele benutzt. Die Gele wurden nach Kochen von Agarose in 1 x TAE-Puffer und Abkühlen auf ca. 60 °C gegossen. Nach Erhärten des Gels, wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Probe, welche mit Auftragspuffer Orange G ca. 1:5 zuvor vermischt worden war, wurde in eine vorher ausgesparte Tasche im Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde dabei ein DNA-Marker in den flankierenden Spuren aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 100 ng/ml Ethidiumbromid enthaltendem 1 x TAE-Puffer für 40 min bei 100 V/400 mA durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden Nukleinsäurebanden im Gel unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit dem computergestützten Dokumentationssystem fotografiert.

2.2.4 RNA-Techniken

Aufgrund der geringen Stabilität der RNA und der Gefahr des Abbaus durch kontaminierende RNasen, wurde bei allen Arbeiten mit RNA stets Handschuhe getragen. Außerdem wurden nur sterilisierte Materialien, gestopfte Pipettenspitzen und RNase-freies Aqua bidest. verwendet.

2.2.4.1 *In vitro* Transkription

Es wurden pro Ansatz ca. 2 µg linearisierte cDNA eingesetzt, welche vorher einer Phenol-/Chloroformreinigung mit konsekutiver Ethanolfällung unterzogen worden war. Die *in vitro* Transkription wurde mit dem Transkriptionskit der Firma Takara (SP6-Polymerase, rNTPs, BSA, DTT, 10 x Puffer, RNase-Inhibitor) nach Herstellerangaben bei 37 °C für 1 h in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Zur Abschätzung von RNA-Menge und Qualität wurden 2 µl Transkriptionsansatz einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Transkripte, von welchen eine Berechnung der spezifischen

Infektiosität der RNA erfolgen sollte, wurden einem DNase-Verdau mit anschließender Phenol-/Chloroformreinigung und Ethanol-fällung unterworfen.

2.2.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Gewinnung der Gesamtzell-RNA wurde von Zellkulturschalen das Medium abgenommen, die Zellen mit einmal PBS deficient gewaschen und mit Trypsin von der Gewebekulturschale gelöst. Die Zellen wurden in 0,8 ml PBS deficient aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt, bei 4000 Upm für 2-3 min bei Rt pelletiert, und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 330 µl Guanidinthiocyanat-Lysispuffer (mit β-Mercaptoethanol) gelöst und auf Homogenisatorsäulen aufgetragen, die anschließend bei 10000 Upm 2-3 min bei Rt zentrifugiert wurden, wobei das Filtrat in neuen Eppendorfgefäßen aufgefangen wurde. Die im Filtrat enthaltene RNA wurde nach Vermischen mit 330 µl 70 % Ethanol nach Herstellerangabe der Fa. Qiagen mit dem „RNeasy“-Kit gewonnen und mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde eine photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

2.2.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese für „Northern Blot“

Hierzu wurden 1,5 g Agarose zu 15 ml 10 x Phosphatpuffer und 114 ml H₂O gegeben und aufgeköcht. Nach Schwenken der Lösung und Abkühlen auf 60 °C wurden, um denaturierende Bedingungen zu schaffen, 21 ml 37 % Formalin unter dem Abzug zugesetzt und ein Agarosegel gegossen. 5 µg Gesamtzell-RNA wurden zuvor mit 1,8 µl Glyoxal (40 %), 3 µl 5x Phosphatpuffer und H₂O in einem Gesamtansatz von 12,3 µl für 45 min bei 56 °C in Eppendorfgefäß inkubiert. Nachdem jeweils 3 µl Auftragspuffer hinzugegeben worden waren, wurden die Proben zügig in die Taschen des Gels pipettiert und eine elektrophoretische Auftrennung der Proben bei 120 V für 4-5 h durchgeführt, wobei der Puffer mit einer Pumpe ständig umgewälzt wurde.

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

Auf einer Glasplatte, die über eine mit 20 x SSC-Lösung gefüllte Wanne gelegt war, wurde ein in 20 x SSC-Lösung angefeuchtetes Stück Filterpapier so plaziert, dass beide Enden des Filterpapiers in die Salzlösung eintauchten, und das Papier auf der Glasplatte blasenfrei auflag. Hierauf wurde das Agarosegel, darauf eine in Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran und darüber zwei ebenso große Stücke mit 20 x SSC-Lösung angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Um die 20 x SSC-Lösung während des Blotvorgangs aufzufangen, wurde das Filterpapier mit einem Stoß Zellulose gefolgt von einem Stoß saugfähigen Papiers abgedeckt und Aluminiumblöcken beschwert. Über die Saugkraft des Papiers wurde die Transferlösung aus der Schale durch das Gel aufgesogen, und dabei die RNA aus dem Gel auf die Membran transferiert. Nach einem mindestens 12 h dauernden Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 3 x SSC gewaschen und bei Rt getrocknet. Auf dem 254 nm-UV-Transilluminator wurde ein UV-Lineal neben die Membran gelegt und Gelgröße sowie die Positionen der sichtbaren ribosomalen RNA-Banden durch ein Photo dokumentiert. Abschließend erfolgte durch UV-Crosslinken und mehrstündiges Backen im Thermocrosslinker bei 80°C eine kovalente Fixierung der RNA an die Nylonmembran. Durch die Erhitzung der Nylonmembran wurde diese weiterhin von Formalin- und Glyoxalresten gereinigt.

2.2.4.5 RNA/DNA-Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde zusammengerollt in eine Hybridisierungsröhre gesteckt und mit 10 ml auf 56 °C vorgewärmter Hybridisierlösung angefeuchtet. Im vorgeheizten Hybridisierofen wurde die Röhre für eine halbe Stunde unter stetigem Drehen inkubiert. Nach Verwerfen der Lösung wurde in 10 ml frischer Hybridisierlösung verdünnte, direkt zuvor bei 94°C für 2 min hitzedenaturierte, radioaktiv markierte cDNA-Sonde (s. 2.2.5.3) hinzugegeben und der Ansatz anschließend zur Hybridisierung über Nacht bei einer Temperatur von 56-60 °C

inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran einmal mit 5 % Hybridisierlösung und zweimal mit 1 % Hybridisierlösung für je 15 min gewaschen, getrocknet mit einem Röntgenfilm bzw. mit dem Phosphorimager ausgewertet.

2.2.4.6 Reverse Transkription (RT)

2,5 µl RNA-Lösung und ca. 30 pMol des reversen Primers (Oligonukleotid) wurden mit autoklaviertem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11,5 µl ergänzt, in einem PCR-Gefäß für 3 min bei 94 °C denaturiert und anschließend für 2 min bei 4 °C abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde der RT-Mix (je Ansatz bestehend aus 8 µl RT-Puffer A, 0,25 µl RNase-Inhibitor und 0,25 µl reverser Transkriptase) in einem die benötigte Gesamtmenge um 10% überschreitenden Volumen vorbereitet und 9 µl hiervon in die Eppendorfgefäße pipettiert. Die Zusammensetzung des RT-Mixes je Probe war: 8 µl RT-Puffer A, 0,25 µl RNase-Inhibitor und 0,25 µl reverser Transkriptase. Nach Beigabe eines Paraffinstückchens (Schmelzpunkt 55 °C) erfolgte die reverse Transkription bei 37 °C für 30 min. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 80 °C für 2 min wurde die reverse Transkriptase denaturiert sowie das Paraffin geschmolzen. Die Proben wurden anschließend auf 20 °C für 2 min und schließlich auf 4 °C abgekühlt.

2.2.5 DNA-Techniken

2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für eine PCR nach vorheriger reverser Transkription wurden dem mit Paraffin versiegelten RT-Ansatz 30 µl eines aus 10 µl PCR-Puffer B, 30 pMol des kodierenden Primers, 4 U *Taq*-DNA-Polymerase und H₂O bestehenden PCR-Mixes, welcher zuvor in einem die benötigte Gesamtmenge um 10 % überschreitenden Volumen vorbereitet worden war, hinzugegeben. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 94 °C unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Denaturierung: 94 °C, 30 s
Annealing: 45-60 °C, 30 s
Elongation: 72 °C, 30-150 s (ca. 60s/kB Amplifikat)
Zykluszahl: 25

Nach einem finalen Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C, wurden die Proben dann auf 4 °C abgekühlt. Zur Beurteilung der Produktgrößen und Produktmengen wurden 5 µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Bei PCRs ohne vorhergehendem reversen Transkriptionsschritt wurde ein PCR-Ansatz von 50 µl bestehend aus ca. 100 ng DNA-Template, je 30 pMol reversen und kodierendem Primer, 5 µl *Taq*-Polymerase-10x-Puffer, 0,5 µl 20 mM dNTPs, 0,4 µl *Taq*-Polymerase und H₂O zusammengestellt und die PCR unter den oben angeführten Zyklusbedingungen durchgeführt.

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

Bei der QC-PCR wurde ein zueinander komplementäres Paar von Primern verwendet, welche die gewünschte Mutation beinhalteten. Des Weiteren beinhalteten die Primer einen die Mutation in beide Richtungen flankierenden Sequenzbereich von ca. 13 Nukleotiden, der für eine stabile Anlagerung an das Template während der „Annealing“-Phase der PCR sorgen sollte. Als Matritze diente ein doppelsträngiges Plasmid. Die PCR wurde mit einer DNA-Polymerase mit hoher Lese- und Korrekturgenauigkeit (*Pfu*-Polymerase, „proof reading“-Aktivität) durchgeführt. Ein Standardansatz von 50 µl setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl *Pfu*-10 x-Puffer, 5 µl DTT, 1 µl *Pfu*-Polymerase, 0,5 µl 20 mM dNTPs, je ca. 50 pMol reverser und kodierender Primer, ca. 50-100 ng DNA-Template, H₂O ad 50 µl. Nach einem Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C erfolgte die QC-PCR unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung: 94 °C, 30 s
Annealing: 48-60 °C, 60 s

Elongation: 68 °C, ca. 2 min/kb

Zykluszahl: 20-25

Danach wurden die Proben auf 4 °C gekühlt. Zum Abbau der Template-DNA wurde ein *DpnI*-Verdau durchgeführt (s.u.). Zur Beurteilung der Produktgrößen und –mengen wurde 1 µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass mit dem PCR-Produkt ohne vorherigen Ligationsschritt (s.u.) eine Transformation kompetenter Bakterien durchgeführt werden kann.

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

Zur radioaktiven Markierung von cDNA wurde das „Nick“-Translationskit der Firma Amersham eingesetzt. Es wurden je Probe 4 µl dNTP-Mix (ohne dCTP), 25 µCi α (^{32}P)-dCTP, ca. 50-100 ng der zu markierenden Gensonde, H_2O und 2 µl Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt und die Reaktionsgefäße für 60-90 min bei 15 °C in einem Wasserbad inkubiert. Während dieses Reaktionsschrittes wurden durch die im Enzymmix enthaltene DNaseI Einzelstrangbrüche gesetzt und durch deren 3`-5`-Exonukleaseaktivität einzelne Nukleotide entfernt, welche durch die DNA-Polymerase I unter Inkorporation von radioaktiv markierten dCTP repariert wurden. Zur Hybridisierung genomischer RNA von BVDV wurden *NotI* (4918)/*NsiI* (7465)-Fragmente des cDNA-Klons pCP7-388 oder *EcoRI* (6278)/*EcoRI* (im pDrive-Vektor)-Fragmente (Länge ca. 1,5 kb) eines Subklons von pCP7-388 verwendet. Zur Quantifizierung wurde eine Sonde, die 400 nt aus dem 5`-Bereich des Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-Gens (GAPDH) enthält, verwendet. Diese wurde freundlicherweise von Dr. Claus W. Grassmann (Institut für Virologie, FB10, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt.

Um die Nick-Translation zu stoppen und zur Volumenerhöhung wurden 60 µl TES zugefügt und die Sonde durch Gelzentrifugation über eine Sephadex-G50-Säule bei 1200 Upm für 2 min von freien Nukleotiden und damit von unspezifischer Radioaktivität befreit.

2.2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte Bande wurde nach elektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht von 302 nm auf dem Transilluminator zügig ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß gelegt. Die enthaltene DNA wurde mit dem „QIAEX Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben isoliert. Hierbei wird die Nukleinsäure an Glasmilchpartikel gebunden und nach Waschung eluiert. Alternativ hierzu wurde das Gelstück in Parafilm eingeschlagen, bei -20 °C für 1h eingefroren und das eingewickelte Gelstück dann zwischen zwei Fingern über einem Eppendorfgefäß ausgedrückt („freeze and squeeze“).

2.2.5.5 Enzymatische Spaltung von DNA

Die in dieser Studie verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA sequenzspezifisch. Nach Möglichkeit wurden dabei Enzyme eingesetzt, deren Erkennungssignal für die DNA-Spaltung aus einer spezifischen Hexanukleotidsequenz bestand. Dies ermöglichte das gezielte Ausschneiden gewünschter Sequenzbereiche aus größeren DNA-Molekülen. Die aus Mini-Präp gewonnenen Plasmide wurden in der Regel einem diagnostischen *EcoRI*-Verdau unterzogen. Die Puffer und Inkubationsbedingungen wurden nach den Angaben der Hersteller gewählt.

2.2.5.5.1 cDNA-Linearisierung für die synthetische Transkription

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA vor *in vitro* Transkription wurde das Restriktionsenzym *SmaI* verwendet; die Schnittstelle dieses Enzym im cDNA-Klon CP7-388 liegt am 3`Ende des BVDV-Genombereiches. Somit

werden durch diese Linearisierung Transkripte mit dem authentischen 3`Terminus eines pestiviralen Genoms generiert. Die Puffer und Inkubationstemperatur entsprachen den Angaben des Herstellers.

2.2.5.5.2 DNaseI-Verdau

Zur Degradierung linearisierter Template-cDNA in einem Transkriptionsansatz wurde je 20 µl Ansatz 1 µl RNase-freie DNaseI zugefügt und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.5.3 DpnI-Verdau von QC-PCR-Produkten

Nach der QC-PCR wurde nach Zugabe von 1 µl *DpnI* zum PCR-Ansatz ein DNase-Verdau von einer Stunde bei 37 °C durchgeführt, mit welchem ausschließlich die methylierte DNA des Templates verdaut wurde.

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

Die Klonierung von aufgereinigten PCR-Produkten erfolgte durch enzymatische Ligation nach Aneinanderlagerung von 3` A-Überhängen der PCR-Produkte mit komplementären T-Überhängen des linearisierten Vektors unter Verwendung des PCR-cloning^{plus}-kit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Bei älteren PCR-Produkten, bei welchen die A-Überhänge schnell degradiert werden oder bei PCR-Produkten, die mit einer Polymerase mit „proof-reading“-Aktivität generiert wurden und keine A-Überhänge besitzen, konnte durch Substitution von 3` A-Überhängen mit dem „A-addition Kit“ (Fa. Qiagen) eine Klonierung in einen bakteriellen Vektor mit T-Überhängen ermöglicht werden.

Gerichtete Klonierungen von nach Restriktionsenzymverdau aufgereinigten DNA-Fragmenten wurden in einem Gesamtansatz von 10 µl, bestehend aus 1 µl T4-DNA-Ligase, 1 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer, variierenden Mengen der beiden zu ligierenden Partner (im Bereich von je 50 -

250 ng DNA) und H₂O, über Nacht bei 14 °C in einem PCR-Gefäß ligiert. Die gerichtete Ligation von DNA-Fragmenten wurde dabei durch Aneinanderlagerung von den verwendeten Restriktionsenzym-spezifischen Einzelstrangüberhängen („sticky-ends“) ermöglicht.

2.2.5.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977), wobei die Anwesenheit von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zu Kettenabbrüchen führt. Bei der Kettenabbruchmethode entstehen nach Syntheseinitiation durch die DNA-Polymerase am an die Zielsequenz angelagerten Primer unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren jeweilige Elongation durch Integration eines ddNTPs terminiert wurde.

Die Sequenzierung wurde mit dem „Cycle-Sequencing Kit“ (Fa. Amersham) durchgeführt. Eine DNA-Menge von 150-500 ng/kb wurde mit 2 µl 5'-IRD800-markiertem Primer (verwendete Primer s. Tab. 2; Konzentration: 1pMol/µl) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt und vermischt. Von jedem Ansatz wurden je 6 µl in 4 PCR-Tubes überführt und in diese anschließend jeweils 2 µl von einem der vier Sequenziermixe (G, A, T oder C) hinzugegeben und der Ansatz durchmischt. In diesen Mixen befinden sich jeweils alle vier dNTPs, eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie eines der vier ddNTPs. Die Sequenzierreaktion im Thermocycler erfolgte unter folgenden Bedingungen:

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

Hiernach wurden die Proben auf 10 °C abgekühlt, und die Reaktion nach Zugabe von 4 µl Auftragspuffer und anschließendem Erhitzen der Proben auf 70

°C für 90 s gestoppt. Durch das im Auftragspuffer enthaltene Formamid wurde auch die Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen verhindert.

2.2.5.8 DNA-Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Um Sequenzierproben im Sequenzierautomaten gelelektrophoretisch aufzutrennen wurden 4%-ige Polyacrylamid-Harnstoff-Gele von einer Länge von 66 cm und einer Dicke von 0,25 mm verwendet. Diese setzen sich wie folgt zusammen: 25,6 ml Sequagel XR, 6,4 ml Sequagel complete, 6,4 g Harnstoff, 12 ml H₂O und 1,6 ml 10 x TBE-Puffer. Nach dem vollständigen Auflösen des Harnstoffs wurden der Gelmischung 16 µl TEMED und 320 µl APS zugesetzt um die Polymerisation des Acrylamids zu initiieren. Das Gel wurde zügig mit einer 50 ml-Spritze durch einen aufgeschraubten 0,45 µm-Filter mit Luer-Lock blasenfrei zwischen zwei gereinigte, in eine Haltevorrichtung eingespannte, schräg gestellte Glasplatten gegossen. Nach Einschieben eines Vorkammes, der eine Tasche für den Probenauftrag schaffte, wurde das Gel während der Polymerisation des Acrylamids 2 h horizontal gelagert. Die nach Herausziehen des Vorkamms gereinigte Gelapparatur wurde dann senkrecht in den Sequenzierautomaten (Model 4000I, Firma Licor) eingesetzt. Unter Verwendung von 1 x TBE-Kathoden- und Anodenpuffer wurde ein Vorlauf von 40 min bei 2000 V, 37 mA, 50 W, 45 °C durchgeführt. Danach wurde je 1-1,2 µl der Sequenzierproben in eine der 48 Taschen eines in die Geltasche eingesetzten Haifischzahnkamms pipettiert und nach Einmessen der optischen Einheit des Geräts die Gelelektrophorese über Nacht unter den beim Vorlauf genannten Bedingungen durchgeführt. Das erzeugte Bild wurde mit dem Programm „Data Collection“ (Fa. Licor) aufgezeichnet. Entsprechende DNA-Sequenzen wurden daraus mit dem Programm „Image Analysis“ (Fa. Licor) gewonnen, wobei hier eine manuelle Plausibilitätskontrolle der computergenerierten Sequenzen erfolgte.

2.2.5.9 Konstruktion der cDNA-Klone

Die Angaben zur Lokalisation der Restriktionsenzymchnittstellen sowie der Fragmentgrößen beziehen sich auf das Genom des BVDV Stammes CP7-5A, Genbanknummer AF220247 (Becher et al., 2000).

2.2.5.9.1 M3, M5, M9, M10, M11, Del SL I und Del SL II

Für die Konstrukte M3, M5, M9, M10, M11 sowie Del SL I und Del SL II wurde eine PCR mit dem kodierenden Primer OlCP7B49 sowie den entsprechenden reversen Primern (s. Tab.1A) durchgeführt. Als Template für die PCR dienten ~50-100 ng des Plasmids pCP7-388.

Die Bedingungen für die PCR waren:

Initiale Denaturierung: 5 min bei 94 °C

25 Zyklen mit:

Denaturierung: 30 sec bei 94 °C

Annealing: 30 sec bei 50°C

Elongation: 1 min bei 72°C

Finale Elongation: 10 min bei 72 °CC

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit einem Agarosegel aufgereinigt, isoliert und mit der TA-Klonierungstechnik in einen bakteriellen Vektor kloniert. Einzelne Klone wurden einer Sequenzanalyse unterworfen, um sicherzustellen, dass sich im Bereich zwischen den singulären Schnittstellen *ClaI* (nt 11076) und *AatII* (nt 12259) keine weiteren Mutationen außer den gewünschten befinden. Anschließend wurde der Bereich von *ClaI* bis *AatII* aus einem geeigneten Klon mittels Restriktionsenzymverdau ausgeschnitten und das gelgereinigte Fragment in einen mit *ClaI* und *AatII* vorgeschnittenen Vektor pCP7-388 (ebenfalls nach Gelreinigung) kloniert. Die Klonierung von Del SL I wurde analog zu den oben aufgeführten Klonierungen durchgeführt; hierbei wurde allerdings der Genombereich zwischen *ClaI* und einer *FseI*-Schnittstelle,

welche 3`wärts von nt 12294 liegt, sequenziert und das *ClaI-FseI*-Fragment in den mit *ClaI* und *FseI* vorgeschrittenen Vektor pCP7-388 eingeführt, da sich die *AatII*-Schnittstelle im Deletionsbereich befindet.

2.2.5.9.2 M1, M2, M4, M6, M7, M8, M12, M13, M14, M15, M3R2, M3R5

Für diese Konstrukte wurde die ortsgerichtete Mutagenese mittels QC-PCR gewählt (Primer s. Tab.1B). Als Template für diese PCRs diente ein pCR2.1 Vektor, welcher den Genombereich von nt 11046 bis 12294 von pCP7-388 beinhaltet; zusätzlich war hier nach nt 12294 noch eine singuläre *FseI*-Schnittstelle eingefügt worden, welche die gerichtete Klonierung der Konstrukte M1 und M2 ermöglichen sollte, da deren Mutationen 3`-wärts der ansonsten verwendeten *AatII* -Schnittstelle liegen. Nach Transformation in „TopTen“-Bakterien und Plasmidpräparation wurde über Sequenzanalyse die Integrität des DNA-Fragments sichergestellt, welches in den Gesamtklon eingefügt werden sollte. Analog zu 2.2.5.9.1 erfolgte die Klonierung über Umsetzen eines *ClaI/AatII*-Fragments in einen mit *ClaI* und *AatII* vorgeschrittenen Vektor pCP7-388. Entsprechend erfolgte die Klonierung für die Mutanten M1 und M2 nach *ClaI/FseI*-Verdau in den mit *ClaI* und *FseI* vorgeschrittenen Vektor pCP7-388.

2.2.5.9.3 Del SL III, Del SL II-III

Zur Deletion des Stemloops III sowie der Stemloops II und III wurden *AgeI*-Restriktionsenzymstellen in ein Plasmid, welches in einem pCR2.1-Vektor den Genombereich von nt 11046 bis nt 12294 von pCP7-388 beinhaltet, eingeführt. Zuerst wurde mittels Quickchange-PCR eine *AgeI*-Schnittstelle bei nt 12115 eingeführt, welche sowohl für die Deletionsmutante Del SL III als auch für Mutante Del SL II-III verwendet wurde. Für Del SL III wurde eine weitere *AgeI*-Schnittstelle bei nt 12157 eingeführt, für Del SL II-III lag die zweite eingeführte *AgeI*-Schnittstelle bei nt 12217. Nach Transformation in

„TopTen“-Bakterien und Plasmidpräparation wurden die Plasmide einem *AgeI*-Verdau unterworfen. Nach präparativer gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die ca. 5.2 kb großen Plasmide aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend wurden die Plasmide religiert und erneut in kompetente Bakterien transformiert. Mittels Sequenzanalyse wurde sichergestellt, dass die Plasmide die gewünschte Deletion besitzen und keine weiteren Mutationen im umzusetzenden Genombereich vorliegen. Analog zu 2.2.5.9.1 erfolgte die Klonierung über Umsetzen eines *ClaI/AatII*-Fragments in einen mit *ClaI* und *AatII* vorgeschneitenen Vektor pCP7-388.

2.2.5.9.4 Del SL II R1, Del SL II R3, Del SL II R6

Um die isolierten Pseudorevertanten Del SLII R1, Del SL II R3 sowie Del SL II R6 mittels eines revers-genetischen Ansatzes zu rekonstruieren, wurden QC-PCRs mit den entsprechenden Oligonukleotiden (s. Tab. 1B) unter Verwendung des Vorklons von Del SL II (s. 2.2.5.9.1) als Matrize durchgeführt. Nach Transformation in „TopTen“-Bakterien und Plasmidpräparation wurde über Sequenzanalyse die Integrität der DNA-Fragmente sichergestellt. Analog zu 2.2.5.9.1 erfolgte die Klonierung über Umsetzen eines *ClaI/AatII*-Fragments in einen mit *ClaI* und *AatII* vorgeschneitenen Vektor pCP7-388.

2.2.6 Proteinanalytische Methoden

2.2.6.1 Zellyse

Zur Gewinnung von Gesamtzellprotein wurde der Zellrasen einer „6-well“-Gewegekulturschalenvertiefung einmal mit PBS deficient gewaschen. Die Gewegekulturschale wurde hiernach nach Zugabe von 600 µl SDS-Lysispuffer pro Vertiefung für 10 min bei 4 °C geschüttelt. Das Lysat wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 5 min bei 94 °C denaturiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

Nachdem zwei gereinigte Glasplatten in eine vertikale Halteapparatur eingespannt worden waren, wurde zwischen diese zunächst 3 ml des Trenngels luftblasenfrei gegossen und das Gel während der Polymerisation für 30 min mit Wasser überschichtet. Nach Abgiessen des Wassers wurde auf das Trenngel das Sammelgel gegossen, das nach Einsetzen eines Kammes für 10 Proben für 15-30 min auspolymerisierte. Nachdem der Kamm entfernt worden war und die Taschen durch Spülen mit Aqua bidest. gereinigt worden waren, wurden die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, deren Kammern anschließend mit 1 x Kathoden- und 1 x Anodenpuffer gefüllt wurden. Es wurden jeweils 10-20 µl der zuvor für 5 min bei 94 °C erhitzten Proben bzw. 5 µl des Größenmarkers in die Taschen des Gels aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 15-30 min bei 80 V (Sammellauf) und dann für 1,5-2 h bei 120 V (Trennlauf).

2.2.6.3 Immunoblot-Analyse

Nach der SDS-PAGE wurde der Sammelgelanteil abgetrennt und das verbleibende Trenngel in Kathodenpuffer für „Semi-dry“-Blots geschwenkt. In die Blotapparatur wurden nun drei in Trenngelgröße geschnittene Filterpapiere und ein Stück Nitrozellulosemembran, die alle zuvor mit Anodenpuffer für „Semi-dry“-Blots befeuchtet worden waren, übereinandergeschichtet. Darauf wurden das Trenngel sowie drei mit Kathodenpuffer für „Semi-dry“-Blots befeuchtete Filterpapiere gelegt. Unter regelmäßiger Kontrolle der Spannung, welche sich bei Erwärmung des Materials in der Blotapparatur erhöhen kann, wurde nach Auflegen des Deckels bei ca. 13 V für 30 min geblottet.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in einer Schale mit Magermilchlösung (1 g

Trockenpulver auf 20 ml PBS/Tween) für 1 h bei 4 °C abgesättigt; anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in frischem PBS/Tween gewaschen. Die Markierung mit dem 1:8 in PBS/Tween verdünnten Primärantikörper 8.12.7 erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Danach wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt, die Membran mit dem zweiten, 1:10000 in PBS/Tween verdünnten, Meerrettichperoxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-Ak für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und wieder dreimal gewaschen um überschüssigen Sekundär-Ak zu beseitigen. Zur Detektion der Proteine wurde das Renaissance[®] „Western Blot“-Kit (Fa. NEN) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Auswertung erfolgte durch spezifische Chemolumineszenz, mit welcher ein Röntgenfilm belichtet wurde.

2.2.7 Analyse von Sequenzdaten

Sequenzvergleiche, Vorhersagen von Restriktionsenzymchnittstellen, virtuelle Translation und RNA-Sekundärstrukturvorhersage wurden mit dem Programmen der „genomics computer group“ (GCG) (Devereux et al., 1984), Softwarepaket HUSAR des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg durchgeführt.

2.2.7.1 Vorhersage der RNA-Sekundärstruktur

Zur Vorhersage der RNA-Sekundärstruktur wurde das GCG-Program M-Fold verwendet. Es berechnet die RNA-Sekundärstrukturen mit der niedrigsten freien Energie. Die aus der M-Fold-Vorhersage entstammenden Daten wurden mit dem Programm Plotfold in die Darstellungsform Squiggles überführt. Die Squiggles-Darstellung wird im Postscript-Dateiformat ausgegeben, welches eine Darstellung und Weiterbearbeitung mit Grafikverarbeitungsprogrammen erlaubt; in dieser Studie wurde hierzu ausschließlich Corel-Draw 10[®] verwendet.

2.2.8 Computergestützte Quantifizierung von Northern Blots

Zur Quantifizierung von Northern Blots wurde der Blot auf einen Phosphorspeicher-„Imaging Screen“ für 45 min in einer Spezialkassette aufgelegt. Anschließend wurde der „Imaging Screen“ auf den Scanner (Typhoon 9200/ Fa. Amersham) verbracht und das auf der Phosphorspeicherplatte vorhandene „latente Bild“ durch Stimulation mit rotem Laserlicht gescannt. Die Quantifizierung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Softwarepaket des Herstellers und mit Excel[®]. Die Phosphorspeicherplatte wurde nach Gebrauch in einem Fujix BAS 1000 (Fa. Fuji) gelöscht.

3. Ergebnisse

3.1 4-Basen-Deletionen in der 3`NTR von CP7-388

Um die Bedeutung von Elementen innerhalb der 3`NTR für die virale Replikation zu analysieren, wurde zunächst eine Serie von 4-Basen-Deletionsmutanten konstruiert. Die insgesamt fünfzehn Deletionen wurden in verschiedenen basengepaarten und ungepaarten Regionen der drei Stemloops SL I, SL II und SL III sowie in den einzelsträngigen Regionen zwischen diesen Stemloops platziert (s. Abb.4). Innerhalb der Stemloops wurde jeweils eine Deletion in einer basengepaarten, einer Bulk- und einer apikalen Loopregion eingeführt. Nach Einführen dieser Mutationen in den infektiösen cDNA-Klon pCP7-388, welcher die komplette genomische RNA von BVDV CP7 enthält, wurden *in vitro* Transkripte hergestellt. Nachdem MDBK-Zellen mit diesen synthetischen RNAs transfiziert worden waren, wurde jeweils die spezifische Infektiosität dieser RNAs sowie die Virustiter im Zellkulturüberstand bestimmt (s. Tab. 9, Daten nicht gezeigt). Um die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass methodische Ungenauigkeiten für die festgestellten Unterschiede verantwortlich waren, wurden die Transkriptions-/Transfektionsexperimente jeweils mit mehreren Mutanten sowie dem parentalen Konstrukt CP7-388 in parallelen Ansätzen durchgeführt und zweimal wiederholt. Die einzelnen Experimente führten zu ähnlichen Ergebnissen. Transfektionen mit den RNAs der Mutanten M1, M2, M4 und M5 führten nicht zu einer Infektion der Zellen, wohingegen die anderen Konstrukte infektiös waren. Die spezifische Infektiosität der Mutanten M6-M15 rangierte im Bereich zwischen $1,3 \times 10^5$ und $1,8 \times 10^6$ und war somit gegenüber dem parentalen Konstrukt CP7-388 geringgradig oder nicht reduziert (s. Tab. 9).

Andererseits lag die spezifische Infektiosität der RNA von Mutante M3 ($1,2 \times 10^1$) nahe der Nachweisgrenze. Diese Unterschiede zeigten sich auch in Immunfluoreszenzanalysen, welche 24 h post transfectionem (p.t.) durchgeführt wurden, sowie in den Titern der zu verschiedenen Zeitpunkten (24 h/48 h/72 h p.t.) geernteten Virusüberstände (Daten nicht gezeigt).

3.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten M6-M15

3.2.1 Wachstumseigenschaften

Um die Wachstumseigenschaften der einzelnen Mutanten zu charakterisieren, wurde ihre Wachstumskinetik bestimmt (s. Abb. 5).

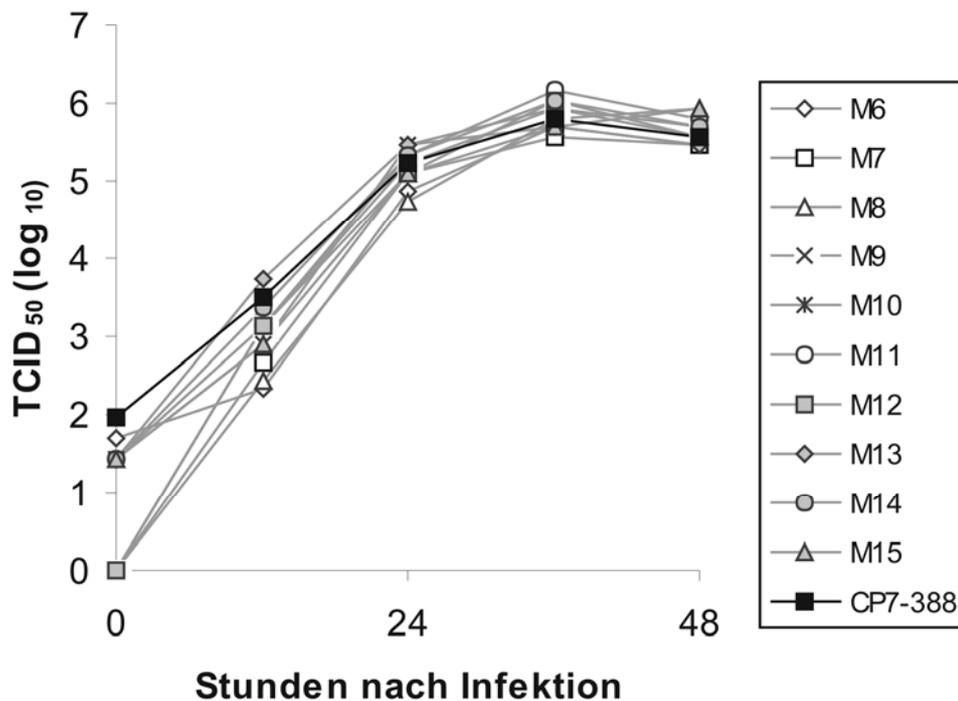


Abb. 5: Wachstumskinetik der 4-Basen-Deletionsmutanten M6-M15 und von CP7-388. Die Bestimmung der Wachstumskinetik erfolgte durch Infektion von MDBK-Zellen bei einer MOI von 0,1. Die Virusausscheidung in den Zellkulturüberstand wurde für einen Zeitraum von 48 h verfolgt.

Hierzu wurden Zellkulturüberstände aus der zweiten Zellkulturpassage der Mutanten M6-M15 sowie des parentalen Virus CP7-388 titriert und

anschließend MDBK-Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Das während der Inkubation bei 37 °C in den Zellkulturüberstand abgegebene Virus wurde für einen Zeitraum von 2 d p.i. titriert. Nach etwa 36 h p.i. erreichte das Ausgangskonstrukt CP7-388 seinen Maximaltitert mit $8,5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml. Die 4-Basen-Deletionsmutanten M6-M15 erreichten sehr ähnliche Maximaltitert (s. Abb.5).

Tab. 9: Spezifische Infektiosität und Plaquegröße der 3`NTR-Mutanten

| Konstrukt | Deletierte nt ^(a) | Spezifische Infektiosität (PFU/μg RNA) | Durchmesser der Plaques (mm)± sd | Durchmesser der Plaques in % ^(c) |
|-------------------|------------------------------|--|----------------------------------|---|
| M1 | 167-170 | - | - | - |
| M2 | 159-162 | - | - | - |
| M3 ^(b) | 140-143 | $1,2 \times 10^1$ | - | <15 |
| M4 | 129-132 | - | - | - |
| M5 | 123-126 | - | - | - |
| M6 | 120-123 | $2,7 \times 10^5$ | 3,0±0,66 | 61 |
| M7 | 118-121 | $2,0 \times 10^5$ | 2,8±0,54 | 57 |
| M8 | 116-119 | $3,6 \times 10^5$ | 3,1±0,61 | 63 |
| M9 | 106-109 | $9,0 \times 10^5$ | 4,1±0,52 | 83 |
| M10 | 92-95 | $2,1 \times 10^5$ | 2,9±0,76 | 58 |
| M11 | 79-82 | $1,8 \times 10^6$ | 3,8±0,64 | 77 |
| M12 | 57-60 | $1,3 \times 10^5$ | 4,4±0,5 | 88 |
| M13 | 48-51 | $1,5 \times 10^5$ | 5,0±0,65 | 100 |
| M14 | 33-36 | $1,9 \times 10^5$ | 4,3±0,43 | 87 |
| M15 | 26-29 | $4,3 \times 10^5$ | 4,6±0,95 | 92 |
| CP7-388 | - | $1,2 \times 10^6$ | 5,0±0,76 | 100 |

^(a) Nummern wurden entsprechend der Nummerierung von Abb. 4 verwendet.

^(b) Entstehung von Pseudorevertanten

^(c) Verglichen mit CP7-388

Des Weiteren wurden von M6-M15 sowie vom parentalen Virus CP7-388 Plaqueassays angefertigt. CP7-388 bildete Plaques mit einer durchschnittlichen Größe von 5,0 mm. Die Konstrukte M6, M7, M8 und M10 bildeten kleinere Plaques mit einer durchschnittlichen Größe von 2,8-3,1 mm, wohingegen

Plaques der Mutanten M9 sowie M11-M15 eine durchschnittliche Größe von 3,8-5,0 mm aufwiesen (s. Tab. 9; Abb. 6). Sowohl die spezifische Infektiosität als auch die anderen Wachstumseigenschaften der Mutanten M6-M15 waren, abgesehen von der Reduktion der Plaquesgröße bei den Mutanten M6, M7, M8 und M10, bei den Mutanten M6, M7, M8 und M10, denen des parentalen Konstrukts CP7-388 sehr ähnlich.

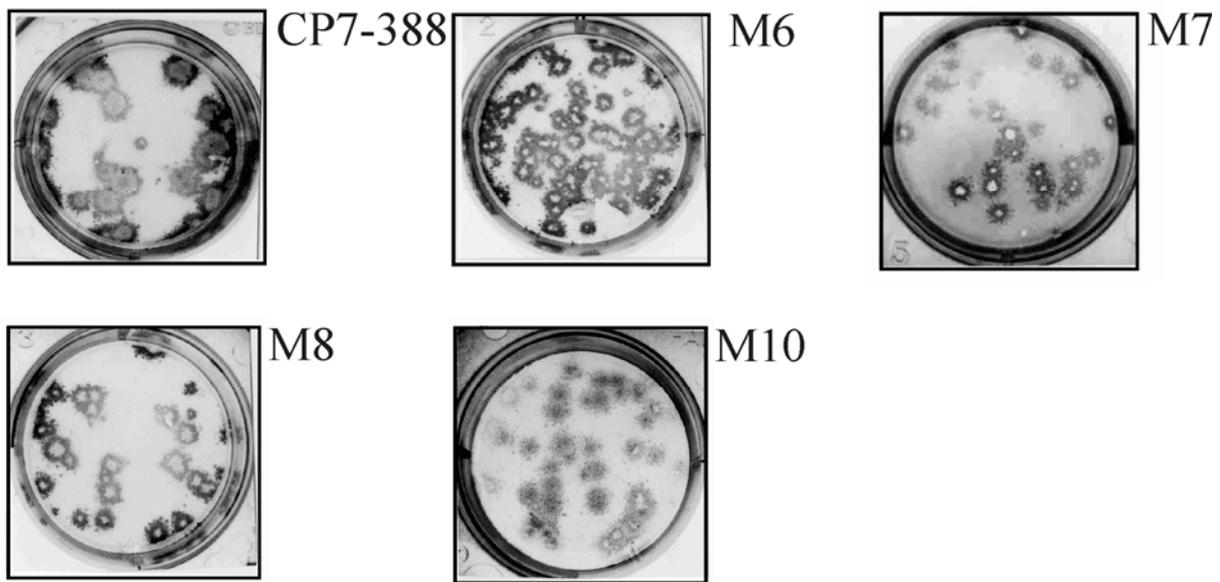


Abb. 6: Plaquesays von CP7-388 und ausgewählten 4-Basen-Deletionsmutanten. Die Plaques wurden 6 Tage nach Transfektion fixiert und mittels Immunperoxidasefärbung mit einem polyklonalen Rinderserum sowie einem Peroxidase-gekoppeltem anti-Rind-Antikörper sichtbar gemacht.

3.2.2. Virale RNA-Synthese

Für die Analyse der viralen RNA-Synthese wurden MDBK-Zellen mit Virusüberständen der Mutanten M6-M15 sowie CP7-388 bei einer MOI von 1 infiziert. Die Gesamtzell-RNA wurde 18 h nach Infektion präpariert und mittels Northern-Blot-Analyse untersucht (s. Abb. 7). Virale RNA wurde durch Hybridisierung mit einer BVDV-spezifischen Sonde dargestellt und durch Phosphorimaging quantifiziert. Als Kontrolle wurde eine GAPDH-spezifische Sonde verwendet, die eine Relativierung der erhaltenen Werte erlaubte. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Mutationen im Bereich des SL I

sowie in der 3'-terminalen Hälfte der Einzelstrangregion zwischen SL I und SL II in einer kompletten (M1, M2, M4, M5) oder fast vollständigen (M3) Inhibition der RNA-Synthese resultierten, wohingegen Deletionen in SL II, SL III, der einzelsträngigen Region (ssr) zwischen diesen beiden Stemloops sowie im 5'-terminalen Bereich der ssr zwischen SL I und SL II zu keiner oder nur geringgradiger Reduktion der RNA-Synthese führten. Eine Northern-Blot-Analyse von RNAs, welche 24 h nach Infektion präpariert worden waren, führte zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

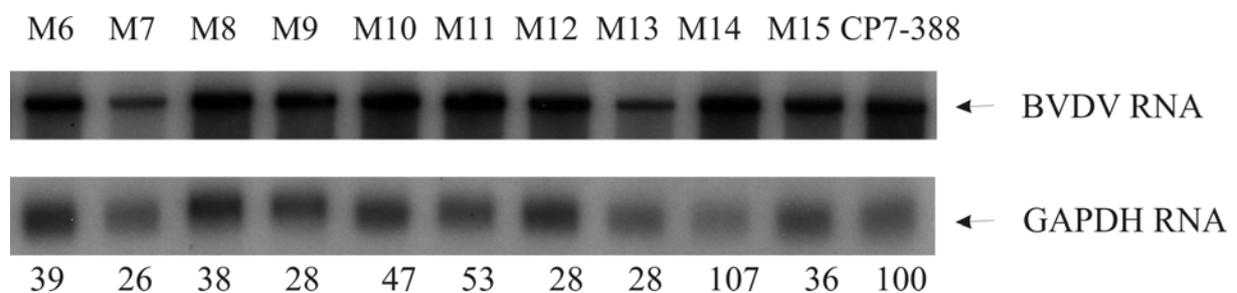


Abb. 7: Northern-Blot Analyse der Mutanten M6-M15 und CP7-388. Die Northern-Blot Analyse wurde mit Gesamtzell-RNA von MDBK-Zellen durchgeführt, welche mit CP7-388 oder den angegebenen Mutanten bei einer MOI von 1 infiziert worden waren; nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (nicht gezeigt). Die Gesamtzell-RNAs wurden 18 h nach Infektion präpariert. Der Blot wurde mit einer BVDV-spezifischen Sonde sowie einer GAPDH-Sonde hybridisiert. Die Menge an viraler genomischer RNA wurde mit einem Phosphorimager bestimmt, dabei dienten die Werte der GAPDH-spezifischen Sonde zur Normalisierung der Ergebnisse. Die relativen Mengen an viraler genomischer RNA sind in Prozent des Wertes des parentalen Konstruktes CP7-388 unter dem Blot angegeben.

3.2.2 Expression der viralen Nichtstrukturproteine NS3 und NS2-3

Die Deletionsmutanten M6-M15 wurden einer Western-Blot-Analyse unter reduzierenden Bedingungen unterzogen (s. Abb. 8). Die MOI bei diesem Experiment lag bei 0,1 und das Gesamtzellprotein wurde 24 h nach Infektion lysiert. Die pestiviralen Nichtstrukturproteine NS2-3 und NS3 wurden mit einem monoklonalen, murinen Antikörper detektiert. Als Sekundärantikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper. Die Mengen der akkumulierten viralen Proteine waren für alle Mutanten und CP7-388 sehr

ähnlich. Die Mutanten M6 und M8 zeigen im abgebildeten Western-Blot eine geringgradig verminderte Synthese der Nichtstrukturproteine NS3 und NS2-3; allerdings lies sich dieses Ergebnis bei einem Wiederholungsexperiment nicht reproduzieren (Daten nicht gezeigt).

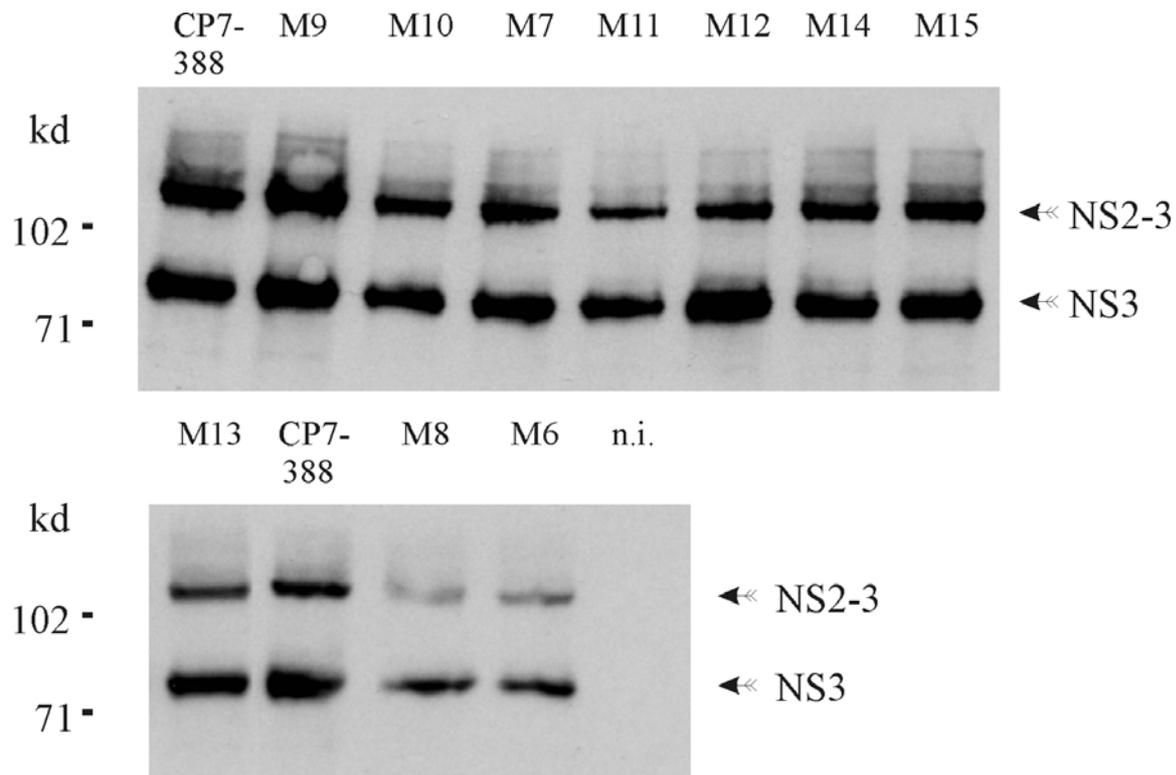


Abb. 8: Western-Blot Analyse der 4-Basen-Deletionsmutanten M6-M15 und CP7-388

Gesamtzell-Protein von MDBK-Zellen, welche mit den angegebenen Mutanten und CP7-388 bei einer MOI von 0,1 24 h vor Präparation infiziert worden waren, wurde unter reduzierenden Bedingungen lysiert. Nach Gelelektrophorese in einem 8 % Polyacrylamidgel und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die viralen Proteine NS3 und NS2-3 mit einem monoklonalen anti-NS3 Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus Antikörper detektiert. Protein von nicht infizierten (n.i.) MDBK-Zellen diente als Negativkontrolle. An der linken Seite ist der Größenstandard in Kilodalton (kd) angegeben.

3.3 Sequenzanalyse von sekundären Mutationen für M6-M15

Um festzustellen, ob sekundäre Mutationen innerhalb der 3'NTR auftraten (sog. „second-site“-Mutationen), wurden die Mutanten M6-M15 zunächst dreimal in MDBK-Zellen passagiert. Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA aus der dritten Zellkulturpassage isoliert und mit dieser eine nested RT-PCR

durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden nach Agarosegelreinigung in einen bakteriellen Vektor kloniert. Die gesamte 3`NTR wurde von jeweils mindestens 3 unabhängigen Klonen sequenziert.

Die Sequenzanalyse der Mutanten M6-M15 ergab keine Hinweise auf die Anwesenheit von „second-site“-Mutationen innerhalb der analysierten Region (Daten nicht gezeigt).

3.4 Sequenzanalyse der Pseudorevertanten von M3

Fehler während der *in vitro* Transkription oder Mutationen während der viralen RNA-Replikation können zu Reversionen oder zum Auftreten geeigneter „second-site“-Mutationen führen, wodurch die Replikationsfähigkeit von mutierten Virusgenomen wiederhergestellt oder verbessert werden kann. Eine Pseudorevertante ist eine Mutante, bei welcher die Replikationsfähigkeit durch eine Mutation wiederhergestellt ist, deren Sequenz im Gegensatz zur Revertante nicht der parentalen Sequenz entspricht. Da die spezifische Infektiosität der Mutante M3 sehr gering war ($1,2 \cdot 10^1$ PFU/ μ g RNA; s. Tab. 9), lag es in diesem Fall nahe, dass solche Mutationen erfolgt waren. Wie für die Mutanten M6-M15 beschrieben, wurde auch hier die 3`NTR nach RT-PCR und konsekutiver Klonierung sequenziert, wobei allerdings keine 3 Passagen in Gewebekultur durchgeführt wurden, sondern die Gesamtzell-RNA nach der ersten Gewebekulturpassage nach Transfektion präpariert wurde. Dies sollte verhindern, dass gut replizierende Pseudorevertanten solche verdrängen, die stärkere Replikationsdefizite aufweisen.

Es wurden 5 unabhängig entstandene Pseudorevertanten von M3 biologisch kloniert und weitergehend analysiert (s. Abb. 9). Bei der Bestimmung der Sequenzen der 3`NTR fiel auf, dass alle Pseudorevertanten Veränderungen in der direkten Umgebung der Deletionsstelle aufwiesen.

| | | | | | | |
|----------|------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----|
| | 123 | | | | | 172 |
| | I | | SL I | | | I |
| CP7-388: | CAGCACTTTA | GCTGTATGAG | <u>GGTACACCCG</u> | <u>ACGTCCACGG</u> | <u>TTGGACTAGG</u> | |
| M3: | CAGCACTTTA | GCTGTAT... | .GTACACCCG | ACGTCCACGG | TTGGACTAGG | |
| M3R1: | CAGCACTTTA | GCTGT TAT .. | .GTACACCCG | ACGTCCACGG | TTGGACTAGG | |
| M3R2: | CAGCACTTTA | GCTGT AG ... | .GTACACCCG | ACGTCCACGG | TTGGACTAGG | |
| M3R3: | CAGCACTTTA | GCTGT AG ... | .GTACACCCG | ACGTCCACGG | TTGGACTAGG | |
| M3R4: | CAGCACTTTA | GCTGT AG ... | .GTACACCCG | ACGTCCACGG | TTGGACTAGG | |
| M3R5: | CAGCACTTTA | GCTGT TA ... | .. TGT ACCCG | ACGTCCACGG | TTGGACTAGG | |

Abb. 9: cDNA-Sequenzalignment von CP7-388, M3 und M3R1-5. Der Sequenzbereich von SL I ist unterstrichen. Die Nummerierung bezieht sich auf die in Abb. 4. Nukleotide, welche im Vergleich zur Mutante M3 bei den Pseudorevertanten verändert waren, sind durch schwarze Kästen hervorgehoben.

Die Mutationen in den erhaltenen Sequenzen können durch Insertion oder Substitution eines einzelnen Nukleotides (M3R1, M3R2, M3R3, M3R4) oder durch Substitution von drei Nukleotiden sowie der Deletion eines einzelnen Nukleotides erklärt werden (M3R5). Bei den Revertanten M3R2, M3R3 und M3R4 war die gleiche Mutation aufgetreten.

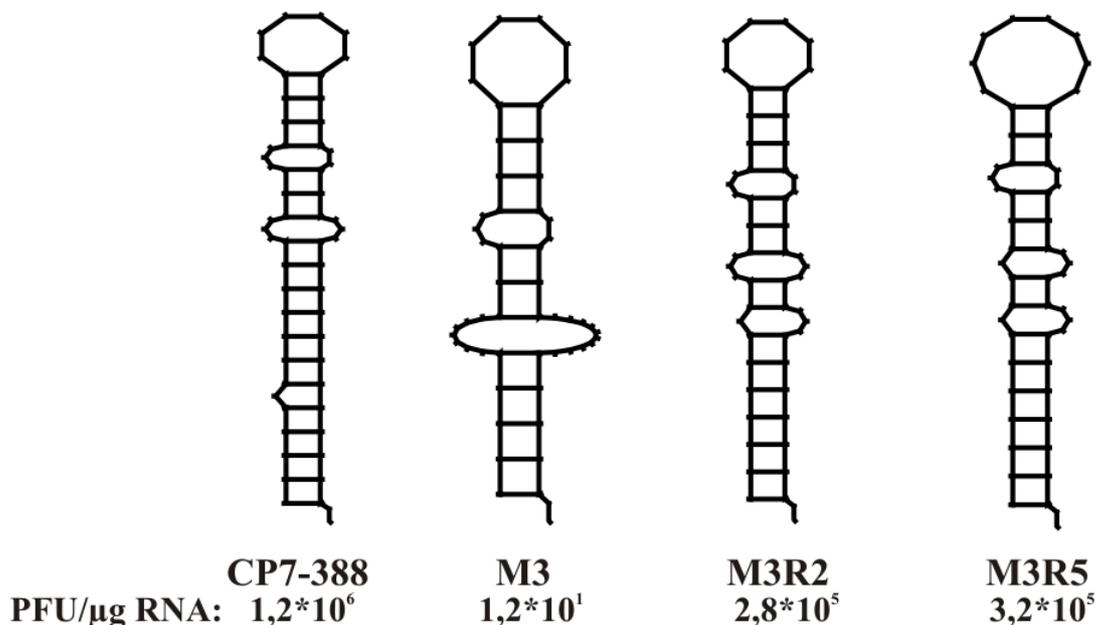


Abb. 10: Computer-Vorhersage der RNA-Sekundärstruktur und spezifische Infektiosität (PFU/μg RNA) für SL I von CP7-388, M3, M3R2 und M3R5. Wie in 2.2.7.1 beschrieben, wurde die Computervorhersage der RNA-Sekundärstruktur für den Sequenzbereich von SL I durchgeführt.

In durch Computervorhersage erstellten Modellen der RNA-Sekundärstruktur des SLI der 3`NTR von M3 und der rekonstruierten Pseudorevertanten zeigte sich, dass durch die Reversionen die große basale Bulkstruktur von M3 aufgelöst wurde und bei den Pseudorevertanten eine der Struktur von CP7-388 ähnliche Sekundärstruktur vorliegt (s. Abb.10). Außer für M3 wurde durch die Computervorhersage nur ein Sekundärstrukturmodell vorgeschlagen, im Falle von M3 waren es zwei, wobei das energetisch günstigere abgebildet wurde (s. Abb.10).

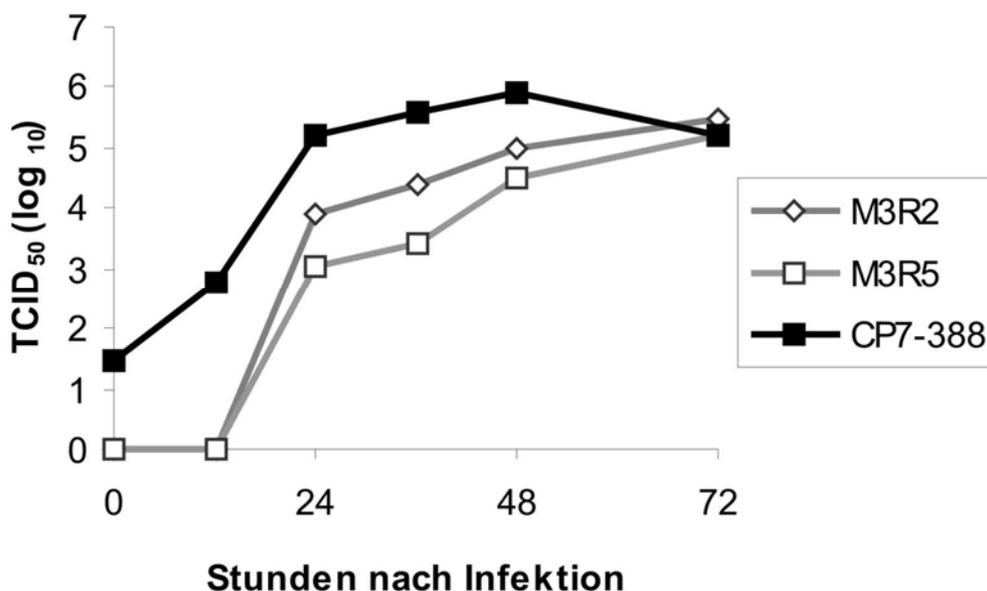


Abb. 11: Wachstumskinetik der rekonstruierten Pseudorevertanten M3R2 und M3R5.

MDBK-Zellen wurden bei einer MOI von 0,1 infiziert. Die zur Infektion herangezogenen Überstände stammten aus der zweiten Gewebekulturpassage nach Transfektion. Die Titer des im Zellkulturüberstand befindlichen Virus wurden über einen Zeitraum von 72 h bestimmt.

Um die Pseudorevertanten weitergehend zu analysieren, wurden die in den 3`NTRs von M3R2 und M3R5 gefundenen Mutationen in den Klon CP7-388 eingeführt. Nach Transfektion von MDBK-Zellen mit den entsprechenden *in vitro* transkribierten RNAs konnte jeweils infektiöses Virus gewonnen und passagiert werden. Die zweite Gewebekulturpassage nach Transfektion wurde zur Analyse der Wachstumskinetik, der Plaquemorphologie, der viralen RNA-

Synthese sowie der Expression viraler Proteine herangezogen (s. Abb. 11 und 12/Daten nicht gezeigt).

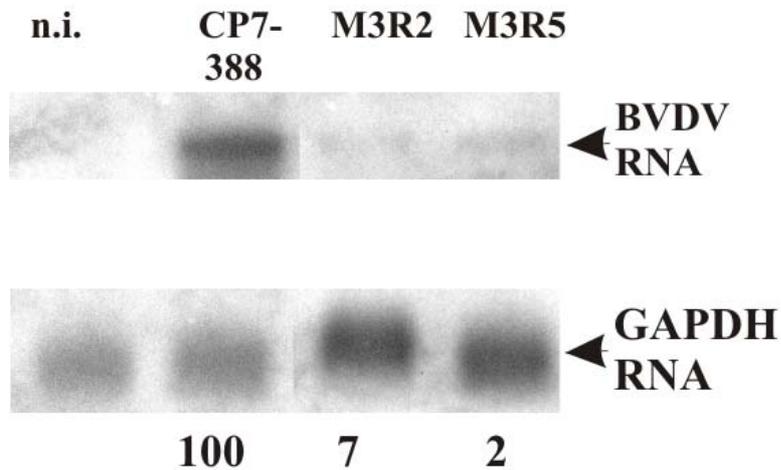


Abb. 12: Northern-Blot Analyse von M3R2 und M3R5.

Die Northern-Blot Analyse wurde wie in der Legende zu Abb. 7 beschrieben durchgeführt. Die MOI lag bei 0,1 und die Gesamtzell-RNA wurde 24h p.i. präpariert. Die relativen Mengen an viraler genomischer RNA wurden mit einem Phosphorimager bestimmt und sind unter dem Blot angegeben (in Prozent des Wertes des parentalen Konstruktes CP7-388).

Für beide rekonstruierten Pseudorevertanten war der Titer innerhalb der ersten 48 h p.i. deutlich erniedrigt (s. Abb. 11). Bei M3R2 war er etwa eine \log_{10} -Stufe, bei M3R5 etwa zwei \log_{10} -Stufen niedriger als der Titer des parentalen Virus CP7-388. Bei der Analyse der Plaquemorphologie zeigten beide Mutanten einen deutlichen Kleinplaque-Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Verglichen mit CP7-388 war die durchschnittliche Plaquegröße bei M3R2 auf etwa 15 % und bei M3R5 auf etwa 10 % gesunken.

Zur Analyse der viralen RNA-Synthese wurden Gesamtzell-RNAs, welche 24 h Stunden nach Infektion mit den Mutanten M3R2 und M3R5 sowie CP7-388 (MOI 0,1) präpariert worden waren, einer Northern-Blot-Analyse unterworfen. Wie durch die Ergebnisse aus der Wachstumskinetikanalyse zu erwarten war, waren die Mengen an viraler RNA bei den Mutanten deutlich geringer. Im Vergleich zu CP7-388 konnten bei M3R2 7 % und bei M3R5 2 % der viralen RNA-Menge nachgewiesen werden (s. Abb. 12).

3.5 Deletion kompletter Stemloops

Es wurden Deletionsmutanten konstruiert, bei welchen jeweils einer der Stemloops I, II, oder III deletiert wurde (Del SL I/Del SL II/Del SL III); bei Del SL II-III waren sowohl Stemloop II als auch Stemloop III deletiert worden (s. Abb. 13). Die *in vitro* transkribierte RNA von Del SL I war nicht infektiös.

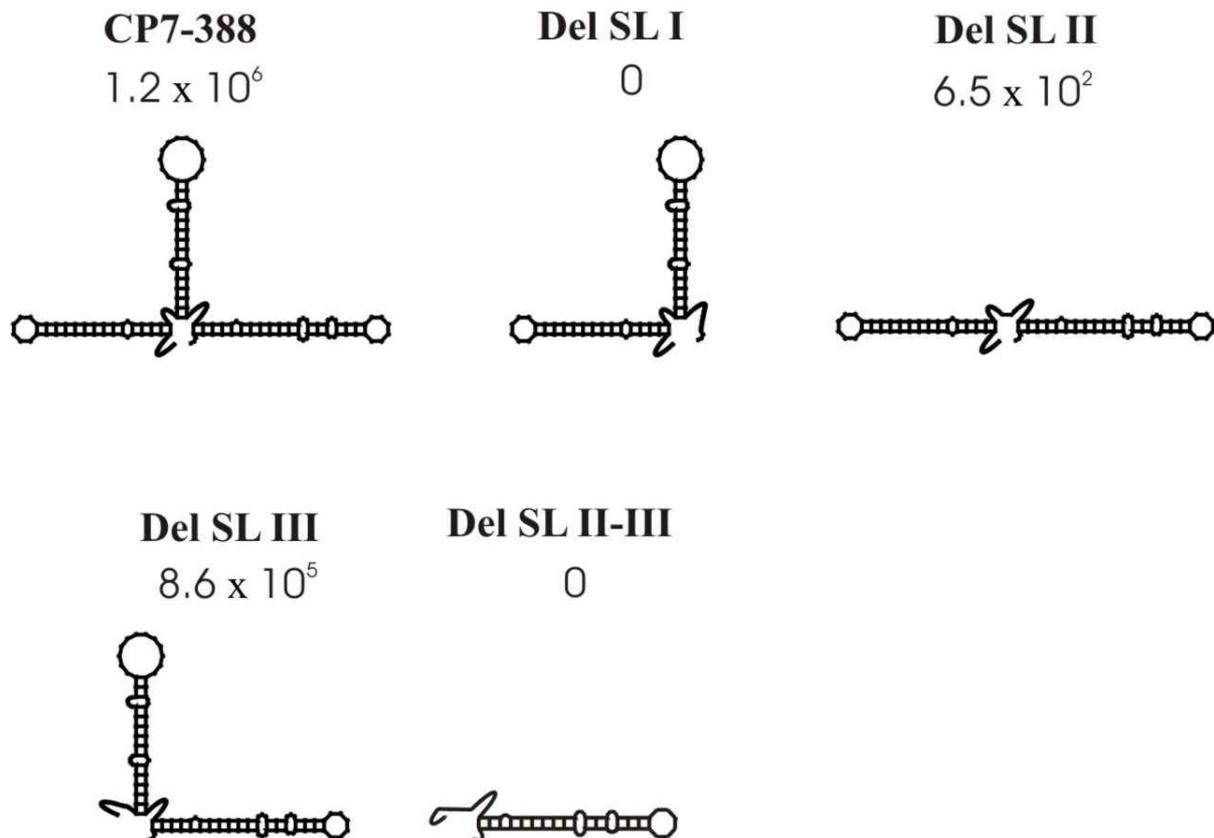


Abb. 13: Schematische Darstellung der RNA-Sekundärstrukturen der 3`NTR von den Stemloopdeletionsmutanten Del SL I, Del SL II, Del SL III und Del SL II-III sowie CP7-388.

Die spezifische Infektiosität (PFU/ μ g RNA) der Deletionsmutanten ist unter dem Namen des Konstrukts angegeben.

Dass Del SL I nicht infektiös ist, steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Mutanten mit 4-Basen-Deletionen innerhalb von SL I. Bei der Deletionsmutante Del SL III war keine signifikante Abweichung hinsichtlich der

spezifischen Infektiosität im Vergleich zu CP7-388 festzustellen.

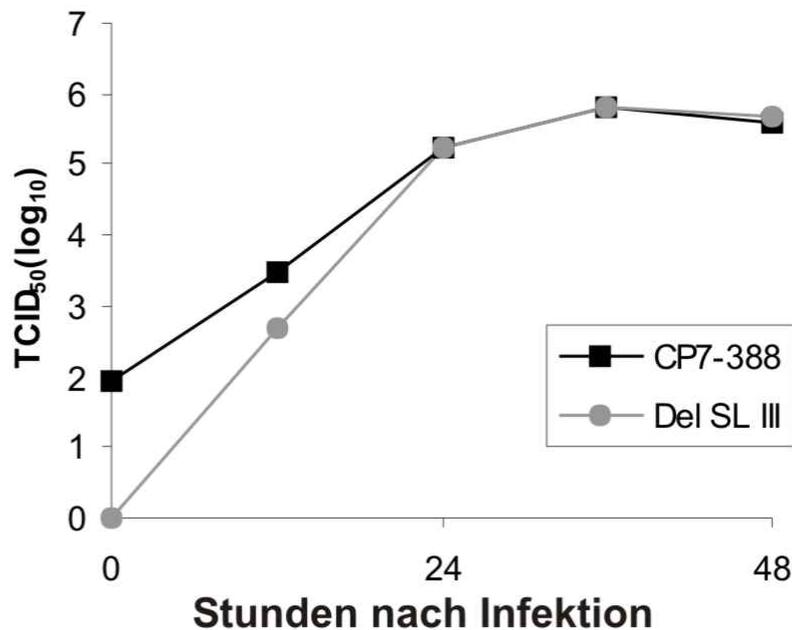


Abb. 14: Wachstumskinetik von Del SL III und CP7-388.

Die virale Replikation wurde über einen Zeitraum von 48h analysiert. Die MDBK-Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 infiziert. Beide in diesem Experiment eingesetzten Virussuspensionen entstammten der zweiten Gewebekulturpassage nach Transfektion.

Dies zeigt, dass SL III zur effizienten Replikation von BVDV nicht benötigt wird. Bei der Analyse der Wachstumskinetik zeigte Del SL III ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu CP7-388 (s. Abb. 14). Auch hinsichtlich Plaquegröße und RNA-Synthese ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Del SL III und CP7-388 (s. Abb. 15).

Bei der Deletionsmutante Del SL II lag die spezifische Infektiosität der RNA nur knapp über dem Detektionslimit (s. Abb. 13). Da nach einmaliger Passage in Zellkultur die Titer an infektiösem Virus bei 4×10^5 TCID₅₀/ml lagen, lag es nahe anzunehmen, dass hier zusätzliche Mutationen aufgetreten waren. Bei der Bestimmung der Sequenz der 3'NTR der nach biologischer Klonierung erhaltenen Viren wurden in der direkten Nähe der Deletionsstelle

Punktmutationen identifiziert (s. Abb. 16). Alle analysierten Pseudorevertanten haben immer noch eine 53 nt große Deletion. Um Auswirkungen der Abwesenheit von SL II näher zu charakterisieren, wurden die Veränderungen von 3 Pseudorevertanten in den Gesamtklon CP7-388 eingeführt.

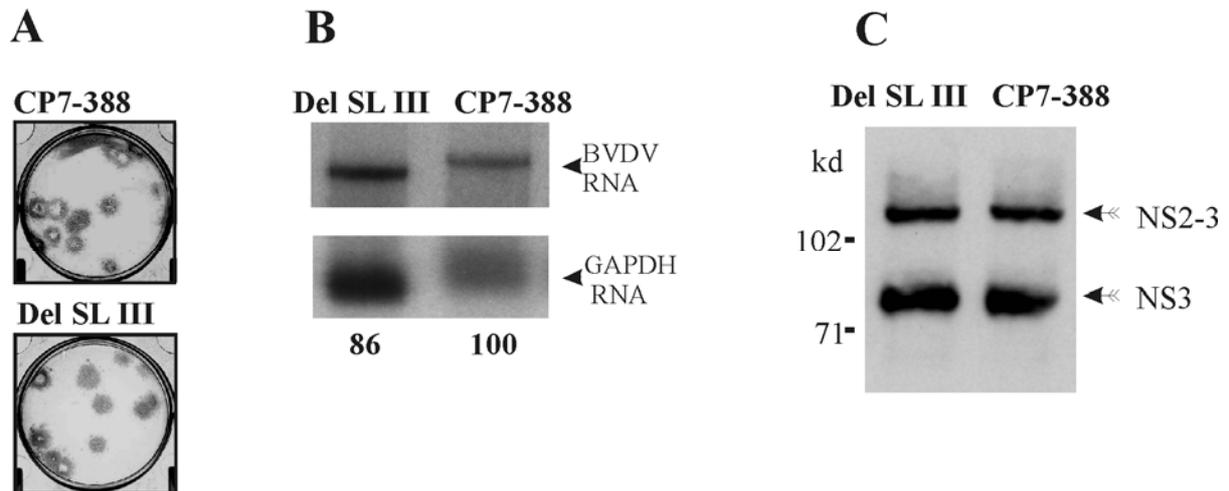


Abb. 15: Phänotypische Charakterisierung von Del SL III.

A: Plaquesassay von Del SL III und CP7-388.

Der Plaquesassay wurde wie bei Abb. 6 beschrieben durchgeführt.

B: Northern-Blot-Analyse von Del SL III und CP7-388.

Die Northern-Blot-Analyse wurde analog zu Abb. 7 durchgeführt; davon abweichend lag die MOI bei 0,1 und die Gesamtzell-RNA wurde 24h p.i präpariert. Die relativen Mengen an viraler genomischer RNA sind unter dem Blot angegeben (in Prozent des Wertes des parentalen Virus CP7-388).

C: Western Blot Analyse von Del SL III und CP7-388.

Der Western Blot wurde wie in Abb. 8 beschrieben durchgeführt.

Die spezifische Infektiosität dieser rekonstruierten Pseudorevertanten lag bei $2,3 \times 10^5$ - $1,1 \times 10^6$ PFU/ μ g RNA und war somit nur geringfügig oder nicht signifikant gegenüber der von CP7-388 erniedrigt (s. Abb. 17). Alle Pseudorevertanten produzierten im Vergleich zu dem parentalen Konstrukt deutlich kleinere Plaques (s. Abb. 17).

| | | | | |
|--------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | 57 | | | 86 |
| | I | SL II | | I |
| CP7-388 | <u>AATTTAGTTG</u> | <u>AGATTAGTAG</u> | <u>TGATATATAG</u> | |
| Del SL II | AATTTAG... | | | |
| Del SL II R1 | AATTTAG... | | | |
| Del SL II R2 | AATTTA A ... | | | |
| Del SL II R3 | AATTTA T ... | | | |
| Del SL II R4 | AATTTA C ... | | | |
| Del SL II R5 | AATTTAG... | | | |
| Del SL II R6 | AATTT GT ... | | | |
| | | | | |
| | 87 | | | 126 |
| | I | SL II | | I |
| CP7-388 | <u>TTATCTACCT</u> | <u>CAAGCTAACA</u> | <u>CTACACTCAA</u> | TGCACACAGC |
| Del SL II | | | | TGCACACAGC |
| Del SL II R1 | | | | C GCACACAGC |
| Del SL II R2 | | | | TGCACACAGC |
| Del SL II R3 | | | | TGCACACAGC |
| Del SL II R4 | | | | TGCACACAGC |
| Del SL II R5 | | | | A GCACACAGC |
| Del SL II R6 | | | | TGCACACAGC |

Abb. 16: Sequenzalignment von CP7-388, Del SL II und Del SL II R1-6. Das cDNA-Alignment zeigt den Sequenzbereich von SL II, welcher bei CP7-388 durch unterstrichene Nukleotide hervorgehoben wurde, und der umgebenden einzelsträngigen Regionen. Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf Abb. 4. Nukleotidaustausche der Pseudorevertanten sind mit weißer Schrift vor schwarzem Hintergrund dargestellt.

Zur weiteren Analyse der rekonstruierten Pseudorevertanten wurde eine Charakterisierung der Mutanten bezüglich ihrer Wachstumskinetik durchgeführt; hierbei wurden MDBK-Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert und das freigesetzte Virus über einen Zeitraum von 72 h titriert (s. Abb. 18A).

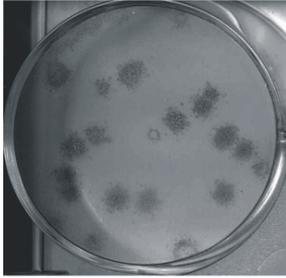
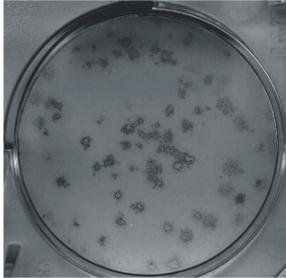
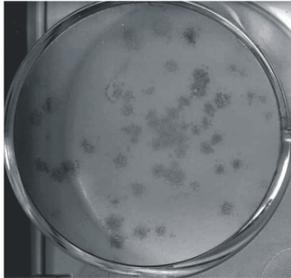
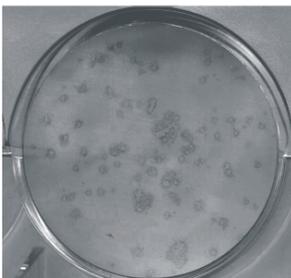
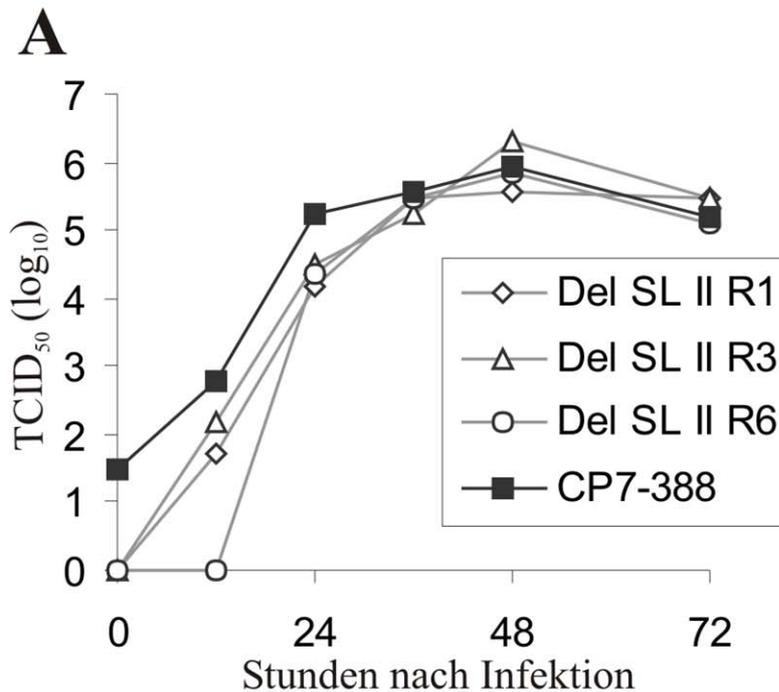
| | | |
|------------------------|---|--|
| | CP7-388 | Del SL II R1 |
| |  |  |
| Plaquegröße in mm (%): | 3.2 ± 0.34 (100%) | 1.1 ± 0.54 (35%) |
| Infektiosität: | $1.2 \cdot 10^6$ | $1.1 \cdot 10^6$ |
| | Del SL II R3 | Del SL II R6 |
| |  |  |
| Plaquegröße in mm (%): | 1.6 ± 0.49 (48%) | 1.0 ± 0.31 (32%) |
| Infektiosität: | $7.6 \cdot 10^5$ | $2.3 \cdot 10^5$ |

Abb. 17: Plaqueassays von Del SL II R1, Del SL II R3 und Del SL II R6. Die Plaqueassays wurden wie in Abb. 6 beschrieben durchgeführt. Neben der Plaquegröße ist die spezifische Infektiosität (in PFU/ μ g RNA) der *in vitro* transkribierten RNA aufgeführt.

Während der ersten 24 h nach Infektion zeigten die Mutanten ohne SL II niedrigere Titer als das parentale Virus CP7-388. Zu späteren Zeitpunkten erreichten die Deletionsmutanten sehr ähnliche Titer wie CP7-388. Alle Viren wuchsen zu Titern von mindestens 5×10^5 TCID₅₀/ml.

Eine Analyse der viralen RNA-Synthese 24 h p.i. bei einer MOI von 0,1 ergab, dass die Mutanten zwischen 32 und 38 % der RNA-Menge von CP7-388 bildeten (s. Abb. 18B).



B

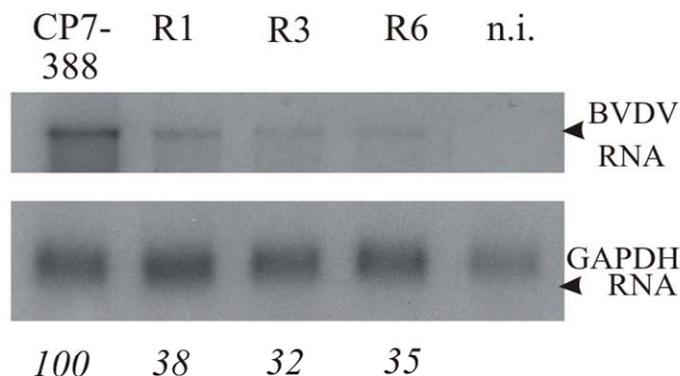


Abb. 18: Charakterisierung der Pseudorevertanten von Del SL II.

A: Wachstumskinetik der rekonstruierten Pseudorevertanten Del SL II R1, R3 und R6. Die MDBK-Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 infiziert. Die zur Infektion herangezogenen Überstände stammten aus der zweiten Gewebekulturpassage nach Transfektion. Das Virus im Zellkulturüberstand wurde über einen Zeitraum von 72 h bestimmt.

B: Northern-Blot-Analyse der rekonstruierten Pseudorevertanten Del SLII R1, R3, und R6.

Die Northern-Blot-Analyse wurde wie bei Abb. 7 beschrieben durchgeführt, allerdings lag die MOI bei 0,1 und die Gesamtzell-RNA wurde 24 h p.i. präpariert. Die relativen Mengen an viraler genomischer RNA sind unter dem Blot angegeben (in Prozent des Wertes des parentalen Konstruktes CP7-388). Nicht infizierte (n.i.) Zellen dienten als Negativkontrolle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Konstrukte, in welchen entweder SL II oder SL III deletiert worden war, in replikationskompetenten Viren resultierten. Phänotypische Unterschiede zum parentalen Virus CP7-388 waren nur bei den Pseudorevertanten von Del SL II zu beobachten. Die Tatsache, dass die Deletion von SL I zu einem vollständigen Verlust der Replikationskompetenz führte, ist in Übereinstimmung mit den bei den 4-Basen-Deletionen gewonnenen Erkenntnissen.

Um die Bedeutung von SL II und SL III weitergehend zu analysieren wurde eine Deletionsmutante konstruiert, welche eine Deletion von sowohl SL II als auch SL III aufwies (Del SL II-III). In drei unabhängigen Experimenten war es nicht möglich, Viren nach Transfektion mit von dieser cDNA hergestellten RNA zu erhalten. Auch eine Passage der transfizierten Zellen resultierte nicht in der Bildung von infektiösem Virus. Demnach führt eine gleichzeitige Deletion beider Stemloops zu einem replikationsinkompetenten Konstrukt, wohingegen die Anwesenheit von einem der beiden Stemloops zusammen mit SL I für eine effiziente virale Replikation ausreichend war.

4. Diskussion

Es ist bekannt, dass die nichttranslatierten Regionen von Plusstrang-RNA-Viren *cis*-aktive Signale enthalten, welche für Translation, Transkription, Replikation und wahrscheinlich auch für die Verpackung des viralen Genoms wichtig sind. In der genomischen RNA von Pestiviren beträgt die Länge der 5'NTR zwischen 380 und 400 nt, wohingegen die 3'NTR in der Länge zwischen 188 und 276 nt variiert. Bei der Betrachtung der 3'NTR von Pestiviren fällt auf, dass die am weitesten 3'-wärts gelegenen 70 Nukleotide einen hohen Grad an Konservierung aufweisen, wobei die letzten 56-60 nt eine stabile Stemloopstruktur bilden, welche als SL I bezeichnet wird. Der verbleibende variable Teil der 3'NTR von Pestiviren (3'V), faltet sich in einer Weise, dass zwei im Vergleich zu SL I weniger stabile Stemloopstrukturen ausgebildet werden. Mehrere Analysen wurden mit BVDV-Replikons durchgeführt, um die *cis*-aktiven Elemente der 3'NTR zu charakterisieren (Isken et al., 2003, Isken et al., 2004, Yu et al., 1999). Den meisten dieser Replikons fehlt der Genombereich, welcher für die Strukturproteine sowie für die Nichtstrukturproteine p7 und NS2 kodiert. Diese Replikons sind geeignet, die Rolle von RNA-Signalen für Translation und RNA-Replikation zu untersuchen. Andererseits kann mit diesen Konstrukten die Bedeutung von strukturellen Elementen, welche einen Einfluss auf die anderen Schritte des viralen Lebenszyklus haben (z.B. Verpackung des viralen Genoms), nicht untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente waren dazu bestimmt, die Rolle von Sequenz- und Strukturelementen der 3'NTR im Kontext eines replizierenden Virus zu studieren. In die 3'NTR wurden mehrere Deletionen eines infektiösen BVD-cDNA-Klons eingeführt, um deren phänotypische Auswirkungen zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, dass SL I sowie der 3' terminale Bereich der Einzelstrangregion zwischen SL I und SL II essentielle Elemente für die virale Replikation

darstellen, wohingegen nach Transfektion von mutierten RNAs, deren Deletionen im variablen Bereich (3'V) der 3'NTR liegen, sowie von Mutanten, bei denen entweder SL II oder SL III komplett fehlten, effizient replizierende Viren isoliert werden konnten. Die Fähigkeit letztgenannter Viren, zu hohen Titern zu wachsen, war nicht oder nur wenig beeinträchtigt. Dies zeigt, dass die Deletion von SL II oder SL III sowie des 5'-terminalen Anteils der Einzelstrangregion zwischen SL I und SL II keinen deutlichen negativen Effekt auf RNA-Replikation, Translation, Verpackung von Virusgenomen oder auf Viruspartikelbildung hatte.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse, dass sowohl alle 4-Basen-Deletionen innerhalb von SL I und im 3' terminalen Bereich der Einzelstrangregion zwischen SL I und SL II als auch die komplette Deletion von SL I die Fähigkeit zur viralen Replikation vollständig unterbinden, unterstreichen die essentielle Rolle dieses Bereichs für die virale Replikation. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Daten, die in einer Analyse im BVDV-Replikonsystem gewonnen worden waren (Yu et al., 1999). In der erwähnten Studie führten Mutationen im Bereich von SL I und der Einzelstrangregion zwischen SL I und SL II ebenfalls zu kompletter oder partieller Inhibition der Replikation.

Die Einzelstrangregion zwischen SL I und SL II ist bei allen Pestiviruspezies hochkonserviert (Avalos-Ramirez et al., 2001, Becher et al., 1998). Es wurde nahe gelegt, dass diese Region, ähnlich wie Stemloop I, entscheidend in die Replikation eines BVDV-Replikons involviert ist (Yu et al., 1999). Unsere Studien zeigen, dass Deletionen im 5' terminalen Teil dieser Einzelstrangregion keine oder nur geringgradig negative Effekte auf die virale Replikation hatten. Ähnlich der von uns gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Replikation von BVDV, wurde für mehrere andere Plusstrang-RNA-Viren gezeigt, dass die 3' terminalen Genombereiche von essentieller Bedeutung für die Replikation sind. Von dem mit BVDV verwandten Hepatitis-C-Virus ist

bekannt, dass die hochkonservierte 3' X Region und der poly(U/UC)-Bereich der 3' NTR unverzichtbare Elemente für die virale Replikation darstellen (Friebe & Bartenschlager, 2002, Yi & Lemon, 2003). Des Weiteren wurde die Unverzichtbarkeit der 3' terminalen Sequenzen auch für GB Virus B sowie für Flaviviren wie das Frühsommer-Meningoencephalitis-Virus (FSME) und das Dengue-Virus gezeigt (Bukh et al., 1999 Mandl, 1998, Men et al., 1996).

Für Flaviviren und HCV wurde berichtet, dass virale und zelluläre Faktoren an die terminalen Regionen des Genoms binden; diesen Faktoren werden wichtige Funktionen bezüglich der viralen Replikation zugeschrieben (Blackwell & Brinton, 1995, Blackwell & Brinton, 1997, Chen et al., 1997, Cui et al., 1998, Ito & Lai, 1997, Tsuchihara et al., 1997). Außerdem wurde berichtet, dass eine Gruppe zellulärer Faktoren, die sogenannten NFAR-Proteine, in die RNA-Replikation eines BVDV-Replikons einbezogen sind. Es wurde gezeigt, dass diese Proteine an die 3' V-Region binden (Isken et al., 2003, Isken et al., 2004). Das Ergebnis, dass ein Konstrukt, bei welchem SL II und SL III deletiert war und dem damit fast die ganze 3' V Region fehlte, nicht infektiös war, kann mit dem Fehlen von Elementen, welche für die Bindung der NFAR-Proteine notwendig sind, erklärt werden.

Im Gegensatz zu Mutationen im SL I und in der Einzelstrangregion zwischen SL I und SL II wurden alle 4-Basen-Deletionen in den basengepaarten, Loop- oder Bulkregionen von SL II und SL III gut toleriert. Auch die Mutante M12, deren Deletion in der einzelsträngigen Region zwischen SL II und SL III liegt, erwies sich als replikationskompetent. Überraschenderweise resultierten aus der Deletion von SL II effizient replizierende Pseudorevertanten. Die Analyse dieser Pseudorevertanten im Vergleich mit CP7-388 zeigte, dass der Austausch von einzelnen oder zweier Nukleotiden in der unmittelbaren Nähe der Deletionsstelle zu einer gegenüber dem parentalen Virus CP7-388 nur geringgradig reduzierten spezifischen Infektiosität führte. Man kann vermuten, dass diese Punktmutationen entweder wichtige strukturelle Elemente oder

essentielle Sequenzmotive wiederherstellen. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass ein Virus, welchem der komplette Stemloop II fehlt, sich hinsichtlich spezifischer Infektiosität, Plaquegröße, Wachstumskinetik sowie der Ausbeute an viraler RNA oder viralen Proteinen nicht oder nur geringgradig vom parentalen Virus CP7-388 unterscheidet (s. Abb. 17 und 18). In früheren Studien wurde gezeigt, dass Punktmutationen, welche sowohl die Sequenz als auch die strukturelle Integrität von SL II betrafen, die Replikationseffizienz eines BVDV-Replikons deutlich verschlechterten, aber nicht zu einem vollständigen Verlust der Replikationskompetenz führten (Isken et al., 2004).

Für SL III lieferte die vorliegende Studie klare Beweise, dass ein Virus, dem dieser Stemloop fehlt, sich hinsichtlich spezifischer Infektiosität, Wachstumskinetik, Plaquegröße oder der viralen RNA- oder Proteinsynthese nicht vom parentalen Virus CP7-388 unterscheidet. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu einem veröffentlichten Bericht, dem zufolge die Anwesenheit der 3' V inklusive SL II und SL III ein ausschlaggebendes Merkmal für die korrekte Terminierung der Translation und für die effiziente Replikation eines BVDV-Replikons ist (Isken et al., 2004). In der genannten Studie war die RNA-Replikation von Replikons mit Mutationen, welche die Struktur von SL III veränderten, stark eingeschränkt. Weiterhin wurde von Isken et al. postuliert, dass die 3' V die Translationseffizienz von BVDV-Replikons deutlich beeinflusst (Isken et al., 2004). Im Kontext eines vollständigen BVDV-Genoms war die Proteinsynthese der Mutante Del SL III allerdings nicht reduziert (s. Abb. 15). Dies unterstreicht die Wichtigkeit, die im Replikon-System gewonnenen Erkenntnisse im Kontext eines replizierenden Virus zu untersuchen, um Aussagen über die Relevanz solcher Erkenntnisse treffen zu können.

Die beobachteten Unterschiede könnten auch auf verschiedene Sequenzen in der 3' NTR zurückzuführen sein. Das von Isken et al. verwendete BVDV-Replikon DI9C (Isken et al., 2003, Isken et al., 2004) besteht aus fusionierten

cDNA-Elementen der BVDV-Stämme CP7, CP9 und NADL, und es enthält chimäre 5' und 3'NTRs (Meyers et al., 1996). Der Gebrauch verschiedener Zelllinien könnte ebenfalls ausschlaggebend für die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung von SL III sein. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie, in der ausschließlich bovine MDBK-Zellen verwendet wurden, wurden die Experimente mit den BVDV-Replikons in „Baby-Hamster-Kidney“ (BHK)-21 Zellen durchgeführt, welche für Pestiviren nicht empfänglich sind. Außerdem sollte bedacht werden, dass BHK-21 Zellen, welche bislang nur zur Charakterisierung von BVDV-Replikons herangezogen wurden, die RNA-Replikation von *in vitro* transkribierter BVDV-RNA voller genomischer Länge nur in geringem Umfang unterstützen (Becher, persönliche Mitteilung). In einer anderen Studie konnte eine subgenomische Mutante generiert werden, welche in MDBK-Zellen effizient replizierte, deren Replikation in BHK-Zellen jedoch unter dem Detektionslimit lag (Grassmann et al., 2001). Demnach wird die Replikation von BVDV-Subgenomen in BHK-21 Zellen von Faktoren beeinflusst, welche sich von denen unterscheiden, die an der Replikation genomischer RNA in natürlichen Wirtszellen beteiligt sind.

Ferner waren 3'NTR Deletionsmutanten, die entweder keinen deutlichen Effekt auf die virale Replikation hatten (M10) oder durch einen vollständigen Verlust der RNA-Replikationskapazität bei erhaltener initialer Proteintranslation am *in vitro* generierten RNA-Transkript (M5) charakterisiert waren, wichtige Hilfsmittel bei Studien zur RNA-Rekombination von Pestiviren (Gallei et al., 2004). Die Mutante M5 wurde im Kontext von NCP7-393 in Kotransfektionsexperimenten mit einer zweiten, subgenomischen RNA eingesetzt, um zu beweisen, dass die RNA-Rekombination auch zwischen zwei replikationsinkompetenten Partnern auftritt. Die Mutation von M10 wurde als genetischer Marker verwendet, um Kontaminationen auszuschließen.

In der vorliegenden Studie zur Bedeutung einzelner Abschnitte der 3'NTR von BVDV-CP7 war es gelungen, Mutanten zu generieren, welche eine

langsamere Wachstumskinetik und eine Reduktion der Plaquegröße sowie der viralen RNA-Akkumulation zeigten. Am deutlichsten waren diese Einschränkungen bei den rekonstruierten Pseudorevertanten von M3 (s. Abb. 11 und 12). Diese Mutanten stellen interessante Kandidaten für die Entwicklung von BVDV-Lebendimpfstoffen dar. Durch Mutationen in der 5'NTR von BVDV-CP7 konnten bereits Viren erzeugt werden, welche eine reduzierte Plaquegröße und Wachstumskinetik im Vergleich zum parentalen Konstrukt zeigten (Becher et al., 2000); diese Mutanten wurden in Tierversuchen eingesetzt und wiesen eine Attenuierung bei erhaltener Immunogenität auf (Makoschey et al., 2004). Es wäre interessant, ausgewählte Mutanten mit Mutationen in der 3'NTR in Tierversuchen hinsichtlich Attenuierung und Immunogenität zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der vorliegenden Studie über die 3'NTR von BVDV CP7-388 die Notwendigkeit von SL I und dem 3'-terminalen Teil der einzelsträngigen Region zwischen SL I und SL II im Kontext eines vollständigen Genoms gezeigt werden konnte. Dies deckt sich mit aus dem Replikonsystem gewonnenen Erkenntnissen. Im Gegensatz zu im Replikonsystem gewonnenen Daten, welche essentielle Elemente im SL III nahe legen, konnte SL III in der vorliegenden Studie komplett deletiert werden, ohne dass es zu einem Verlust der viralen Replikationsfähigkeit kam. Viren, denen SL III fehlte, zeigten weiterhin keine deutlichen Unterschiede zum parentalen Virus CP7-388. Die Deletion von SL II führte zum Auftreten effizient replizierender Pseudorevertanten, die sich nur geringgradig vom parentalen Virus CP7-388 unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Wichtigkeit, die Rolle von *cis*-aktiven Elementen im Kontext eines kompletten, replikationskompetenten Virusgenoms zu untersuchen.

5. Literaturverzeichnis

- Ahlquist, P. & Kaesberg, P. (1979). Determination of the length distribution of poly(A) at the 3' terminus of the virion RNAs of EMC virus, poliovirus, rhinovirus, RAV-61 and CPMV and of mouse globin mRNA. *Nucleic Acids Res.* **Nov 10;7**, 1195-204.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J. & Becher, P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* **286**, 456-465.
- Baker, J. C. (1987). Bovine viral diarrhea virus: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 1449-1458.
- Baroth, M., Orlich, M., Thiel, H.-J. & Becher, P. (2000). Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology* **278**, 456-466.
- Becher, P. unpublished data.
- Becher, P., Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo Rosales, S., König, M., Schweitzer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H. & Thiel, H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel Pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* **311**, 96-104.
- Becher, P., König, M., Paton, D. & Thiel, H.-J. (1995). Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* **209**, 200-206.
- Becher, P., König, M. & Thiel, H.-J. (2001a). Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung. *Tierärztl. Praxis* **29 (G)**, 266-275.
- Becher, P., Kosmidou, A., König, M. & Thiel, H.-J. (1999a). Variabilität von Pestiviren und deren Bedeutung. In *Bericht des 23. Kongreß der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft*, pp. 184. Bad Nauheim.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. & Thiel, H.-J. (1999b). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* **262**, 64-71.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., König, M. & Thiel, H.-J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* **78**, 1357-1366.
- Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.* **72**, 5165-5173.
- Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H.-J. (2000). Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus result in altered growth characteristics. *J. Virol.* **74**, 7884-7894.
- Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H.-J. (2001b). RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* **75**, 6256-6264.
- Becher, P. & Thiel, H.-J. (2002). Genus *Pestivirus (Flaviviridae)*. In *The Springer Index of Viruses*, pp. 327-331. Edited by C. A. Tidona & G. Darai. Heidelberg, Germany: Springer -Verlag.
- Bielefeldt Ohmann, H. (1988a). BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta Vet Scand.* **29**, 77-84.
- Bielefeldt Ohmann, H. (1988b). In situ characterization of mononuclear leukocytes in skin and digestive tract of persistently bovine viral diarrhea virus-infected clinically healthy calves and calves with mucosal disease. *Vet Pathol.* **Jul;25**, 304-9.
- Bielefeldt Ohmann, H. & Bloch, B. (1982). Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch Virol.* **71**, 57-74.

- Blackwell, J. L. & Brinton, M. A. (1995). BHK cell proteins bind to the 3' stem-loop structure of the West Nile virus genome RNA. *J. Virol.* **69**, 5650-5658.
- Blackwell, J. L. & Brinton, M. A. (1997). Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J. Virol.* **71**, 6433-6444.
- Brinton, M., Fernandez, A. & Dispoto, J. (1986). The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* **Aug;153**, 113-21.
- Brownlie, J., Clarke, M. C. & Howard, C. J. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet.Rec.* **114**, 535-536.
- Buck, K. W. (1996). Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Adv. Virus Res.* **47**, 159-251.
- Bukh, J., Apgar, C. & Yanagi, M. (1999). Toward a surrogate model for hepatitis C virus: An infectious molecular clone of the GB virus-B hepatitis agent. *Virology* **Sep 30 262**, 470-8.
- Casaro, A. P. E., Kendrick, J. W. & Kennedy, P. C. (1971). Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* **32**, 1543-1562.
- Cay, B., Chappuis, G., Coulibaly, C., Dinter, Z., Edwards, S., Greiser-Wilke, I., Gunn, M., Have, P., Hess, G., Juntti, N., Liess, B., Mateo, A., Mc Hugh, P., Moennig, V., Nettleton, P. & Wensvoort, G. (1989). Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: Report of an international workshop. *Vet. Microbiol.* **20**, 123-129.
- Chen, C.-J., Kuo, M.-D., Chien, L.-J., Hsu, S.-L., Wang, Y.-M. & Lin, J.-H. (1997). RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J. Virol.* **71**, 3466-3473.
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. & Purchio, A. F. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* **165**, 191-199.
- Collett, M. S., Wiskerchen, M. A., Welniak, E. & Belzer, S. K. (1991). Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. Virol.* **Suppl. 3**, 19-27.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. & Dubovi, E. J. (1988). Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea infections. *J. Virol.* **62**, 2823-2827.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. & Dubovi, E. J. (1990a). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* **51**, 1388-1394.
- Corapi, W. V., Elliott, R. D., French, T. W. & Dubovi, E. J. (1990b). Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **196**, 590-596.
- Coria, M. F. & McClurkin, A. W. (1978). Specific immunotolerance in an apparently healthy bull persistently infected with BVD virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **172**, 449-451.
- Cui, T., Sugrue, R. J., Xu, Q., Lee, K. W., Chan, Y.-C. & Fu, J. (1998). Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology* **246**, 409-417.
- Darbyshire, J. H. (1960). A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet. Rec.* **72**, 331-333.
- Decker, C. & Parker, R. (1995). Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Opin. Cell Biology* **7**, 3965-72.
- Deng, R. & Brock, K. V. (1993). 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1949-1957.
- Doyle, L. G. & Heuschele, W. P. (1983). Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **183**, 1257-1259.

- Dreher, T. (1999). FUNCTIONS OF THE 3'-UNTRANSLATED REGIONS OF POSITIVE STRAND RNA VIRAL GENOMES. *Annu Rev Phytopathol.* **37**, 151-174.
- Evans, M., Rice, C. & Goff, S. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **Aug 31;101**, 13038-43.
- Friebe, P. & Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol.* **June 76**, 5326-38.
- Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H.-J. & Becher, P. (2004). RNA recombination in the absence of viral replication. *J. Virol.* **78**, 6271-6281.
- Gillespie, J. H., Baker, J. A. & McEntee, K. (1960a). A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* **50**, 73-79.
- Gillespie, J. H., Sheffy, B. E. & Baker, J. A. (1960b). Propagation of hog cholera virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **105**, 679-681.
- Grassmann, C., Isken, O., Tautz, N. & Behrens, S. (2001). Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol.* **Sep;75**, 7791-802.
- Gray, E. & Nettleton, P. (1987). The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J Gen Virol.* **Sep;68**, 2339-46.
- Hamblin, C. & Hedger, R. S. (1979). The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhea / mucosal disease virus in African wildlife. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **2**, 295-303.
- Heinz, F. X., Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M. & Thiel, H.-J. (2000). Family Flaviviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 859-878. Edited by C. M. F. M.H.V. van Regenmortel, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, and R.B. Wickner. San Diego: Academic Press.
- Hershey, J., Matthews, M. & Sonenberg, N. (1996). Translational Control. *Cold Spring Harbour Lab. Press.*
- Hofmann, M. A., Brechtbühl, K. & Stäuber, N. (1994). Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch. Virol.* **139**, 217-229.
- Isken, O., Grassmann, C., Sarisky, R., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P. & Behrens, S. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO* **3;22**, 5655-65.
- Isken, O., Grassmann, C., Yu, H. & Behrens, S. (2004). Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA* **10**, 1637-52.
- Ito, T. & Lai, M. M. C. (1997). Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3' untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J. Virol.* **71**, 8698-8706.
- Jacobson, A. & Peltz, S. (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* **65**, 693-739.
- Kahrs, R. F. (1973). Effects of bovine viral diarrhea on the developing fetus. *J. Am. Vet. Ass.* **163**, 877-888.
- Kao, C. C., Del Vecchio, A. M. & Zhong, W. (1999). De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant flaviviridae RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **253**, 1-7.
- Kolakofsky, D. & Weissmann, C. (1971). Possible mechanism for transition of viral RNA from polysome to replication complex. *Nat New Biol.* **May 12;231**, 42-6.

- Kuhn, R. J., Niesters, H. G., Hong, Z. & Strauss, J. H. (1991). Infectious RNA transcripts from Ross River virus cDNA clones and the construction and characterization of defined chimeras with Sindbis virus. *Viol.* **182**, 430-441.
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A. E. & Tautz, N. (2004). Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* **78**.
- Laude, H. (1977). Improved method for the purification of hog cholera virus grown in tissue culture. *Arch Virol.* **54**, 41-51.
- Lee, K. M. & Gillespie, J. H. (1957). Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* **18**, 953.
- Lemon, S. M. & Honda, M. (1997). Internal ribosome entry site within the RNA genomes of hepatitis C virus and other flaviviruses. *Semin. Virol.* **8**, 274-288.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **Jul 2;285**, 110-3.
- Lohr, C., Everman, J. & Ward, A. (1983). Investigation of dams and their offspring inoculated with a vaccine contaminated by bovine viral diarrhea virus. *Vet Med & Small Animal Clinician* **78**, 1263-1266.
- Loken, T., Krogsrud, J. & Bjerkas, I. (1991). Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Pathol.* **Feb;104**, 195-209.
- Makoschey, B., Becher, P., Janssen, M., Orlich, M., Thiel, H. & Luttkicken, D. (2004). Bovine viral diarrhea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity. *Vaccine* **Sep 3;22**, 3285-94.
- McClurkin, A. W., Coria, M. F. & Bolin, S. R. (1985). Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **186**, 568-569.
- Men, R., Bray, M., Clark, D., Chanock, C. M. & Lai, C.-J. (1996). Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J. Virol.* **70**, 3930-3937.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M. S. & Rice, C. M. (1998). Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* **72**, 4737-4745.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. & Kümmerer, B. (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* **70**, 8606-8613.
- Meyers, G. & Thiel, H.-J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* **47**, 53-118.
- Moennig, V., Frey, H.-R., Liebler, E., Polenz, P. & Liess, B. (1990). Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet. Rec.* **127**, 200-203.
- Moennig, V. & Plagemann, P. G. W. (1992). The pestiviruses. *Adv. Vir. Res.* **41**, 53-98.
- Pankraz, A. & Becher, P. unpublished data.
- Paton, D. J. (1995). Pestivirus diversity. *J. Comp. Pathol.* **112**, 215-236.
- Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J. & Tijssen, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**, 260-268.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation

- codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* **12**, 67-83.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N. D., Siddiqui, A. & Collett, M. S. (1995). Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**, 750-754.
- Potgieter, L. N. D., McCracken, M. D., Hopkins, F. M. & Guy, J. S. (1985). Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 151-153.
- Pritchard, W. R. (1963). The bovine viral diarrhea- mucosal disease complex. *Adv. Vet. Sci.* **8**, 1-47.
- Rebhuhn, W. C., French, T. W., Perdrietz, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G. & Karcher, L. F. (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* **3**, 42-46.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R. & Dubovi, E. J. (1994). Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* **205**, 66-74.
- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J. M. & Bredenbeek, P. J. (1997). Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.* **71**, 451-457.
- Roux, L., Simon, A. E. & Holland, J. J. (1991). Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Advances in virus research* **40**, 181-211.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Steck, F., Lazary, S., Fey, H., Wandeler, A., Huggler, C., Opilliger, G., Baumberger, H., Kaderli, R. & Martig, J. (1980). Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhea-mucosal disease. *Zentralbl. Vet. Med. (B)* **27**, 429-445.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. & Thiel, H.-J. (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* **71**, 5415-5422.
- Tellinghuisen, T., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. & Rice, C. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem.* **Nov 19;279**, 48576-87.
- Thiel, H.-J., Plagemann, P. G. W. & Moennig, V. (1996). Pestiviruses. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp. 1059-1073. Edited by B. N. Fields, Knipe, D.M. & P. M. Howley. Philadelphia, Pa.: Lippincott - Raven Publishers.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rügenapf, T. & Meyers, G. (1991). Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* **65**, 4705-4712.
- Tijssen, P., Pellerin, C., Lecomte, J. & Van Den Hurk, J. (1996). Immunodominant E2 (gp53): sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group II viruses indicate a close relationship to a subgroup of border disease viruses. *Virology* **217**, 356-361.
- Tsuchihara, K., Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., Yamamoto, N. & Shimotohno, K. (1997). Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3' X. *J. Virol.* **71**, 6720-6726.
- van Rijn, P. A., van Gennip, H. G. P., Leendertse, C. H., Brusckhe, C. J. M., Paton, D. J., Moormann, R. J. M. & van Oirschot, J. T. (1997). Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* **237**, 337-348.
- Vannier, P., Leforban, Y., Carnero, R. & Cariolet, R. (1988). Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine pestivirus pathogen for the pig. *Ann Rech Vet.* **19**, 283-290.

- VanOirschot, J. T. (1988). Description of the virus infection. In *Classical swine fever and related viral infections*, pp. 1-25. Edited by B. Liess. Boston: Martinus Nijhoff Publishing.
- Vassilev, V. B. & Donis, R. O. (2000). Bovine viral diarrhoea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res.* **69**, 95-107.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. & Thiel, H.-J. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol* **66**, 3677-3682.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rüménapf, T., Meyers, G. & Thiel, H.-J. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J. Virol* **64**, 3563-3569.
- Wengler, G. & Castle, E. (1986). Analysis of structural properties which possibly are characteristic for the 3'-terminal sequence of the genome RNA of flaviviruses. *J Gen Virol.* **Jun;67**, 1183-8.
- Wensvoort, G. & Terpstra, C. (1988). Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res Vet Sci.* **Sep;45**, 143-148.
- Yi, M. & Lemon, S. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol.* **Mar;77**, 3557-68.
- Yu, H., Grassmann, C. & Behrens, S. (1999). Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J.Virol.* **May; 73**, 3638-48.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M. & McCauley, J. (1996). Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol.* **Aug;77**, 1677-81.
- Zuker, M. (2000). Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol.* **Jun;10**, 303-10.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung von Sequenz- und Strukturelementen innerhalb der 3' nicht translatierten Region (NTR) von BVDV zu untersuchen. Hierzu wurden Deletionsmutanten im Kontext eines kompletten Virusgenoms hergestellt und ihre phänotypischen Eigenschaften *in vitro* charakterisiert.

Die 3'NTR von BVDV Stamm CP7 umfasst 188 Nukleotide. Durch Computervorhersagen und biochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die 3'NTR von CP7 zu 3 Stemloops (SL) faltet, welche durch einzelsträngige Regionen (ssr) getrennt werden. In der Analyse wurden die verschiedenen RNA-Sequenz- und RNA-Sekundärstrukturelemente der 3'NTR mittels 15 4-Basen-Deletionen sowie der Deletion kompletter SL hinsichtlich ihrer Bedeutung für die virale Replikation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die 3' terminale Stemloopstruktur SL I ein essentielles Element für die pestivirale Replikation darstellt. Alle diesen SL betreffenden 4-Basen-Deletionen sowie eine Mutante, bei der der komplette SL I deletiert worden war, führten mit Ausnahme der Mutante M3, von welcher replikationskompetente Pseudorevertanten mit deutlich eingeschränkter Replikationskapazität isoliert werden konnten, zu einem vollständigen Verlust der Replikationsfähigkeit. Mittels 4-Basen-Deletionen war es möglich zu ermitteln, dass der 3' terminale Teil der ssr, welche SL I und SL II trennt, ebenfalls essentiell für die Replikation ist, wohingegen Deletionen im 5' terminalen Teil der ssr zu keinem Verlust der Replikationsfähigkeit führten. Alle eingeführten 4-Basen-Deletionen in SL II, SL III und der ssr, die SLII und SLIII trennt, resultierten in infektiösen Viren, welche sich phänotypisch nicht wesentlich vom parentalen Virus unterschieden. Auch die Deletion von SL III resultierte in einem Virus, das keine Unterschiede zum parentalen Virus CP7-388 aufwies. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Studien im Replikon-System, in denen essentielle Sequenz- und Struktur motive im SL III postuliert wurden. Die Deletion von SL II führte zum

Auftreten von Pseudorevertanten, welche immer noch eine 58 nt lange Deletion beinhalten, bemerkenswerterweise aber zu hohen viralen Titern in Zellkultur wachsen. Eine Deletion von sowohl SL II als auch SL III resultierte in einem Verlust der Replikationsfähigkeit. Ob dies für Sequenzbereiche mit ähnlicher Funktion innerhalb von SL II und SL III spricht, oder rein sterische Gründe hat, mit der dieser Teil der 3'NTR die Replikationsinitiation am 3' Terminus ermöglicht, bleibt durch weiterführende Experimente zu klären.

7. Summary

The aim of this study was to evaluate the importance of sequence and structural elements within the 3' nontranslated region (3'NTR) of BVDV. To pursue this approach, deletion mutants were constructed in the context of an infectious full-length viral genome, and their phenotypic properties were characterised *in vitro*.

The 3'NTR of BVDV strain CP7 comprises 188 nucleotides. According to computer predictions and biochemical analyses the 3'NTR folds into three stable stemloop (SL) structures, which are separated by two short single-stranded regions (ssr). In the analysis regarding the 3'NTR of CP7 the different sequence and structural elements were examined concerning their importance for viral replication by introduction of 15 4-base deletion mutants and by deletion of complete stemloops. It was shown that the 3' terminal SL I contains essential elements for pestiviral replication. With the exception of mutant M3, from which replication competent pseudorevertants with severely restricted capability of replication could be isolated, all 4-base deletions introduced into SL I and also the deletion of SL I led to a loss of the ability of replication. By means of 4-base deletions it was also possible to show that the 3' terminal part of the ssr separating SL I and SL II is essential for viral replication, whereas deletions introduced into the 5' terminal part of the ssr did not lead to loss of viral replication. All 4-base deletions introduced into SL II, SL III, and the ssr separating SL II and SL III resulted in the recovery of infectious viruses, which did not show significant phenotypical differences compared to the parental virus CP7-388. The deletion of SL III also resulted in an efficiently replicating virus that displayed no significant differences compared to the parental virus. This is in contrast to published results obtained in the replicon system, which have implicated essential sequence and/or structural motives for viral replication within SL III. The deletion of SL II resulted in the emergence of pseudorevertants still carrying a 58 nt deletion, which were nevertheless still

capable to produce high viral titers in tissue culture. A deletion spanning from SL II to SL III resulted in a complete loss of viral replication. Whether this is due to sequence motives with similar function within SL II and SL III or to solely sterical reasons, by which the initiation of replication at the 3' V region of the 3' NTR is facilitated, remains to be investigated.

8 Abbildungsverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abb. 1: (Becher et al., 2001a; modifiziert)

A: Schematischer Genomaufbau von BVDV

B: Schematische Darstellung eines BVDV-Virions

Abb. 2: Alignment der 3`NTR von verschiedenen Pestivirusisolaten

Abb. 3: Squiggles Darstellung der Sekundärstruktur eines RNA-Strangs

Abb. 4: 3`NTR von BVDV CP7-388 und Positionen der 4-Basen-Deletionen

Abb. 5: Wachstumskinetik der 4-Basen-Deletionsmutanten M6-M15 und von CP7-388

Abb. 6: Plaqueassays von CP7-388 und ausgewählten 4-Basen-Deletionsmutanten

Abb. 7: Northern-Blot Analyse der Mutanten M6-M15 und CP7-388.

Abb. 8: Western-Blot Analyse der 4-Basen-Deletionsmutanten M6-M15 und CP7-388

Abb. 9: Sequenzalignment von CP7-388, M3 und M3R1-5

Abb. 10: Computer-Vorhersage der RNA-Sekundärstruktur für SL I von CP7-388, M3, M3R2 und M3R5

Abb. 11: Wachstumskinetik der rekonstruierten Pseudorevertanten M3R2 und M3R5

Abb. 12: Northern-Blot Analyse von M3R2 und M3R5

Abb. 13: Schematische Darstellung der RNA-Sekundärstruktur der 3`NTR von den Stemloopdeletionsmutanten Del SL I, Del SL II, Del SL II und Del SL II-III sowie CP7-388

Abb. 14: Wachstumskinetik von Del SL III und CP7-388

Abb. 15: Phänotypische Charakterisierung von Del SL III

A: Plaqueassay von Del SL III und CP7-388

B: Northern-Blot-Analyse von Del SL III und CP7-388

C: Western Blot Analyse von Del SL III und CP7-388

Abb. 16: Sequenzalignment von CP7-388, Del SL II und Del SL II R1-6

Abb. 17: Plaqueassays von Del SL II R1, Del SL II R3 und Del SL II R6

Abb. 18: Charakterisierung der Pseudorevertanten von Del SL II

A: Wachstumskinetik der rekonstruierten Pseudorevertanten Del SL II R1, R3 und R6

B: Northern-Blot-Analyse der rekonstruierten Pseudorevertanten Del SLII R1, R3, und R6

8.2 Tabellen

Tab. 1: Primer zur gerichteten Mutagenese der 3`NTR

A: Reverse Primer zur gerichteten Mutagenese

B: Primer zur Quickchange-Mutagenese

Tab. 2: Primer für die DNA-Sequenzierung

Tab. 3: Enzyme

Tab. 4: Chemikalien

Tab. 5: Vorgefertigte Systeme

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Geräte

Tab. 8: Zentrifugen

Tab. 9: Spezifische Infektiosität und Plaquephänotyp der 3`NTR-Mutanten

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| A | Adenosin |
| Abb. | Abbildung |
| Ak | Antikörper |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BDV | „Border Disease“-Virus |
| BVDV | Virus der bovinen Virusdiarrhöe |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytidin |
| ca. | circa |
| °C | Grad Celsius |
| cDNA | „copy“-DNA |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| DNA | Desoxyribunokleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| <i>E. Coli</i> | <i>Escherichia Coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EtOH | Ethanol |
| Fa. | Firma |
| g | Gramm |
| G | Guanosin |
| h | Stunde |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IgG | Immunglobulin G |
| IU | „international units“- internationale Einheiten |
| IRES | „internal ribosomal entry site“ |
| kb | Kilobasen |
| kd | Kilodalton |
| KSPV | Virus der klassischen Schweinepest |
| l | Liter |
| m | milli |
| M | molar |
| μ | mikro |
| mA | Milliampère |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| mCi | Millicurie |
| MD | „mucosal disease“ |
| min | Minute |
| m.o.i. | „multiplicity of infection“- Multiplizität der Infektion |
| mRNA | „messenger RNA“- Boten-RNA |
| n | nano |
| n.i. | nicht infiziert |

| | |
|--------------------|--|
| NS | Nichtstrukturprotein |
| nt | Nukleotidtriphosphat |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| NTR/NTRs | nichttranslatierte Region/-en |
| ncp/nzp | „noncytopathogenic“- nicht zytopathogen |
| ORF | „open reading frame“- offenes Leseraster |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| p.i. | post infectionem |
| p.t. | post transfectionem |
| RdRp | „RNA-dependent RNA polymerase“- RNA-abhängige RNA-Polymerase |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rNTP | Ribonukleosidtriphosphat |
| Rt | Raumtemperatur (20°C) |
| RT-PCR | reverse Transkription-PCR |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SL | „Stemloop“ |
| s.o. | siehe oben |
| ss | „single stranded“- einzelsträngig |
| ssr | „single stranded region“- einzelsträngige Region |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TCID ₅₀ | “tissue culture infective dose ₅₀ “- Dosis infektiöser Einheiten, bei welcher 50% der Gewebekulturzellen infiziert werden |
| TEMED | N,N,N,N`-Tetramethylethylendiamin |
| TLS | „tRNA like structures“- tRNA-ähnliche Strukturen |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Uridin |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| W | Watt |
| zp | zytopathogen |
| zpE | zytopathischer Effekt |
| z.B. | zum Beispiel |

10. Publikationen, Vorträge und Poster

10.1 Publikationen

1. Gallei A, **Pankraz A**, Thiel HJ, Becher P.:
RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *J Virol.* 2004 Jun;78(12):6271-81; PMID: 15163720
2. Lackner, T., Müller, A., **Pankraz, A.**, Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A. E. & Tautz, N.
Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* 2004 Oct; 78 (19):10765-75; PMID: 15163720
3. **Pankraz A**, Thiel HJ, Becher P.: Essential and nonessential elements in the 3` nontranslated region of bovine viral diarrhea virus. *J Virol.* 2005 Jul;79(14):9119-27; PMID: 15994806

10.2 Kongressbeiträge

1. **Alexander Pankraz**, Heinz-Jürgen Thiel, Paul Becher:
Essential and Nonessential Elements in the 3` Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus.
11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg 2004
2. Andreas Gallei, **Alexander Pankraz**, Heinz-Jürgen Thiel, Paul Becher:
RNA Recombination in the Absence of Viral RNA-dependent RNA Polymerase.
11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg 2004
3. Paul Becher, **Alexander Pankraz**, Heinz-Jürgen Thiel, Andreas Gallei:
RNA Recombination in vivo in the Absence of Viral Replication.
Seventh International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, San Francisco 2004
4. **Alexander Pankraz**, Heinz-Jürgen Thiel, Paul Becher:

Essential and Nonessential Elements in the 3' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GFV), Tübingen 2004

5. Andreas Gallei, **Alexander Pankraz**, Heinz-Jürgen Thiel, Paul Becher:
RNA Recombination in vivo in the Absence of Viral Replication.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GFV), Tübingen 2004

6. **Alexander Pankraz**, Heinz-Jürgen Thiel, Paul Becher:

Deletions in the 3' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus Define Requirements for Viral Replication.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GFV), Berlin 2003

11. Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von PD Dr. Paul Becher am Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt. Diese Studie wurde zum Teil von der Firma Intervet International BV gefördert.

Mein Dank gilt insbesondere:

- PD Dr. Paul Becher für die Möglichkeit zur Promotion, seine umfassende Einarbeitung in die Thematik und Methodik, seine Unterstützung in wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Bereichen, die rege Diskussion wissenschaftlicher Fragestellungen sowie für ein kollegiales und äußerst freundliches Arbeitsverhältnis
- Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Unterstützung und Förderung, das lockere und konstruktive Arbeitsumfeld und die entgegengebrachte Hilfe bei der Korrektur von Manuskripten
- Der leider verstorbenen Michaela Orlich für eine umfassende Einarbeitung in die molekulare Virologie sowie die Hilfe bei der Planung Studie
- Dr. Andreas Gallei, Simone Preis und Martina Willebrandt für die kollegiale und durch stete Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre im Labor „two-thirty“
- Allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Virologie insbesondere Dr. Matthias König, HD Dr. Norbert Tautz, Prof. Dr. Tillmann Rügenapf, Dr. Thomas Krey, Dr. Tobias Lackner, Kerstin Goebler, Manuela Heimann und Renate Neidhardt für rege Diskussionen, zahllosen Hilfestellungen und der Bereitstellung diverser Arbeitsmaterialien
- Meinen Eltern für ihre Förderung, ihr Verständnis und ihre Geduld
- Nina Kneifel für ihre Unterstützung und Motivation

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5250-1



9 783835 952508 ①